



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL

2019

REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS VEGETALES. EFECTO DEL PROCESADO
SOBRE LA EXTRACCIÓN, ESTABILIDAD Y BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS
ANTIOXIDANTES.

María Esperanza Dalmau Estelrich



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL

2019

Doctorado en Ciencia y Tecnología Química

REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS VEGETALES. EFECTO DEL PROCESADO
SOBRE LA EXTRACCIÓN, ESTABILIDAD Y BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS
ANTIOXIDANTES.

María Esperanza Dalmau Estelrich

Directora: Carmen Rosselló Matas

Directora: Susana Simal Florindo

Tutor: Antoni Femenia Marroig

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

La tesis doctoral titulada **“REVALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS VEGETALES. EFECTO DEL PROCESADO SOBRE LA EXTRACCIÓN, ESTABILIDAD Y BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES”** se presenta en formato de compendio de artículos, los cuales se enlistan a continuación:

- Dalmau, M.E., Bornhorst, G.M., Eim, V., Rosselló, C., Simal, S., 2017. Effects of Freezing, Freeze Drying and Convective Drying on In Vitro Gastric Digestion of Apples. *Food Chem.* 215, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.134>. Índice de impacto (2017): 4.946. Q1 (1/133) Food science & Technology.

- Dalmau, M.E., Llabrés, P.J., Eim, V.S., Rosselló, C., Simal, S., 2019. Influence of freezing on the bioaccessibility of beetroot (*Beta vulgaris*) bioactive compounds during in vitro gastric digestion. *J. Sci. Food Agric.* 99, 1055–1065. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9272>. Índice de impacto (2018): 2.422. Q1 (9/56) Agriculture, Multidisciplinary.

- Dalmau, M.E., Eim, V., Rosselló, C., Cárcel, J.A., Simal, S., 2019. Effects of convective drying and freeze-drying on the release of bioactive compounds from beetroot during in vitro gastric digestion. *Food Funct.* <https://doi.org/10.1039/C8FO02421A>. Índice de impacto (2018): 3.241. Q1 (31/135) Food science & Technology.

Asimismo, se incluye un artículo que se encuentra en revisión, el cual se presenta a continuación:

- Dalmau, E., Rosselló, C., Eim, V., Ratti, C., Simal, S. Ultrasound-assisted aqueous extraction of biocompounds from orange byproduct: Experimental kinetics and modeling. *J. Food Eng.* En revisión. Índice de impacto (2018): 3.625. Q1 (26/135) Food science & Technology.



Universitat
de les Illes Balears

Dra. Susana Simal, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título Revalorización de subproductos vegetales. Efecto sobre la extracción, estabilidad y bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes, presentada por Maria Esperanza Dalmau Estelrich para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma

**SIMAL
FLORINDO
SUSANA -
43049715V**

Firmado digitalmente
por SIMAL FLORINDO
SUSANA - 43049715V
Fecha: 2019.09.12
16:49:17 +02'00'

Palma de Mallorca



Universitat
de les Illes Balears

Dra. Carmen Rosselló, de la Universitat de les Illes Balears

DECLARO:

Que la tesis doctoral que lleva por título Revalorización de subproductos vegetales. Efecto sobre la extracción, estabilidad y bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes, presentada por Maria Esperanza Dalmau Estelrich para la obtención del título de doctor, ha sido dirigida bajo mi supervisión.

Y para que quede constancia de ello firmo este documento.

Firma **ROSSELLO
MATAS MARIA
CARMEN -
42999130D** Firmado digitalmente
por ROSSELLO MATAS
MARIA CARMEN -
42999130D
Fecha: 2019.09.12
16:55:30 +02'00'

Palma de Mallorca

*“Lo importante es no dejar nunca de hacer preguntas.
No perder jamás la bendita curiosidad”
Albert Einstein*

Als meus pares per ser els meus pilars...

A la meva padrina...

El primer de tot m'agradaria agrair a totes les persones que, d'una o altra forma, han estat presents aquests darrers anys i sense les quals aquest treball no hauria estat possible.

A la Dra. Carmen Rosselló i la Dra. Susana Simal per la seva direcció i supervisió en tot moment. Gràcies per confiar en mi des de l'inici, per enriquir-me dia darrera dia amb la vostra experiència i estímul constant, i per donar-me plena llibertat i flexibilitat per fer feina en el que m'agrada.

A la Dra. Valeria Eim, per ser mi tercer co-director de tesis, per las tardes interminables de prácticas en el laboratorio, por tus sabios consejos en el ámbito académico, pero muchísimo más sabios en el ámbito personal. Gracias por tanto... gracias por hacer simple lo que siempre pensaba que era complicado.

Al Dr. Antoni Femenia per introduir-me al grup d'Enginyeria Agroalimentaria ara ja fa deu anys i per els seus savis consells.

A la Dra. Gail Bornhorst por dejarme trabajar codo a codo junto a ella al inicio de este trabajo y por su ayuda constante. Y a la Dra. Cristina Ratti por llegar en los últimos suspiros de la tesis y con su alegría hacerme ver el lado positivo en un momento de gran estrés.

Al Govern de les Illes Balears, per la beca FPI concedida per la realització de la present tesis doctoral, en el marc d'un programa operatiu cofinançat pel Fons Social Europeu. I al personal dels Serveis Científicotècnics (SCT-UIB) per la seva ajuda donada durant tot el doctorat.

Al Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y fondos del FEDER por los proyectos: "Aplicación de los ultrasonidos de potencia (UdP) en la intensificación de los procesos de secado a baja temperatura (DPI 2012-37466-C03-02) " y "Revalorización integral de subproductos en función de sus usos potenciales: Extracción de compuestos de interés mediante aplicación de US de potencia y estudios de bioaccesibilidad in vitro (RTA 2015-00060-C04-03)".

A Reyes, Simó y África por acompañarme en mis primeros pasos de la tesis y hacerme más fácil mi adaptación al grupo. A Xesca, Xisca, Rafa y Óscar por acompañarme en este viaje, por sus consejos y su apoyo moral, pero por encima de todo por aguantar mis salidas de tiesto, solo puedo decir gracias.

A nen Pedro Juan per haver-me ajudat a una bona part del treball experimental, va ser un plaer treballar i compartir moments amb tu. A nen Joan, per haver format part de manera

especial a l'inici de la tesis, gràcies pels capvespres de conversacions, per animar-me a seguir i per descobrir i fer-me veure de tot el que era capaç.

A mi compañera de laboratorio y despacho, pero sobre todo amiga Mónica... por tener la paciencia de trabajar conmigo durante estos años, por compartir no solo experimentos sino también risas y preocupaciones, por escucharme y estar cerca siempre que lo he necesitado y sobre todo por traerme chocolatinas y nuestras amigas las galletas de avena y chocolate.

Un gracias sumamente especial a mi grupo de "Yogurines": Carme, Cristina, Beatriz, Gustavo, Marco, Miquel, Raúl y Patricia gracias por haber compartido mi día a día en el grupo durante este último tiempo, por hacerme recordar que nunca debo perder la alegría y las ganas de superarme y gracias también por haber aguantado mi mal humor y mis pataletas. Siempre seréis mis niños mimados... los de la madre superiora...

Als meus amics, perquè a pesar de no entendre molt bé el que he fet amb tanta dedicació durant aquests quatre anys de doctorat, han estat sempre a prop per animar-me durant les hores on no veia el final.

Un gràcies enorme a la meva amiga, la meva germana Joana, per compartir aquests quatre durs i plàcids anys. Per aquelles anades i vingudes plenes de nirvis, rialles i paraules d'ànim mútues. Gràcies per tenir sempre les paraules adequades durant els mals moments però també per saber-me posar de peus de terra en els bons. En definitiva, estàs present en cada una de les fulles d'aquesta tesis, sense la teva ajuda aquest treball no hagués arribat al seu fi, gràcies per tant...

A la meva padrineteta i al meu padrinet, per sempre voltros, per sempre junts, de la forma que sempre vos recordo. Gràcies per ser el que som, el cements del present son els cements del passat. PER SEMPRE PADRINS.

A tota la meva família, per estimar-me i donar-me coratge per aconseguir els meus reptes. En especial al meu fillol, Tòfol, que durant un dia de piscina compartit, sense voler i amb la seva alegria i espontaneïtat amb va donar una gran lliçó de vida: "Madrina, ara ets aquí, gaudeix d'aquest moment, el que has de fer després ja es farà, però, després, no ara". Gràcies Tòfol per fer tornar al present la nina del passat.

Als meus pares, els meus pilars, sense vosaltres res hauria estat possible. Gràcies per inculcar-me els valors que sempre estan al meu costat, per acompanyar-me a les meves aventures a pesar de no entendre molt bé el que faig, però en gran mesura gràcies per cuidar-me i estimar-me a pesar del meu mal caràcter i les meves males contestacions. Sempre junts, sempre tres, sempre units...



**Govern
de les Illes Balears**

Conselleria d'Innovació, Recerca i Turisme
Direcció General d'Innovació i Recerca

Invertim en el seu futur



Unió Europea
Fons Social Europeu



**MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD**



Unión Europea
Fondo Europeo
de Desarrollo Regional

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	19
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	21
ÍNDICE DE TABLAS.....	22
RESUMEN	23
RESUM.....	27
ABSTRACT	31
1. INTRODUCCIÓN	37
1.1. RESIDUOS DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	37
1.2. ECONOMÍA CIRCULAR. RESIDUO CERO EN EL SECTOR AGROALIMENTARIO	37
1.3. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LOS ALIMENTOS	39
1.3.1. <i>Compuestos bioactivos de interés</i>	39
1.3.2. <i>Procesos de extracción sólido-líquido</i>	55
1.4. PROCESADO DE ALIMENTOS.....	63
1.4.1. <i>Congelación</i>	63
1.4.2. <i>Secado</i>	66
1.5. EFECTO DEL PROCESADO DE ALIMENTOS SOBRE LA LIBERACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	73
1.5.1. <i>Digestión de los alimentos</i>	73
1.5.2. <i>Efecto del procesado en la liberación de los nutrientes</i>	86
1.6. MICROESTRUCTURA DE LOS ALIMENTOS.....	91
1.6.1. <i>Técnicas microscópicas</i>	92
1.6.2. <i>Análisis de imágenes</i>	93
1.7. MODELIZACIÓN Y SIMULACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN Y DE LA BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS	95
2. OBJETIVOS.....	101
3. MATERIALES Y MÉTODOS	105
3.1. MATERIA PRIMA	105
3.1.1. <i>Albedo y flabelo de naranja</i>	105
3.1.2. <i>Manzana</i>	106
3.1.3. <i>Remolacha</i>	107
3.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....	108
3.2.1. <i>Equipos de extracción sólido-líquido</i>	108
3.2.2. <i>Congelación</i>	109
3.2.3. <i>Liofilización</i>	109
3.2.4. <i>Secado convectivo</i>	110
3.2.5. <i>Digestión gástrica in vitro</i>	111
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	112
3.3.1. <i>Análisis químico general</i>	112
3.3.2. <i>Extracción de la fibra dietética. Residuo insoluble en alcohol</i>	113
3.3.3. <i>Caracterización de la fracción de fibra dietética</i>	114
3.3.4. <i>Extracción de compuestos antioxidantes</i>	116
3.3.5. <i>Caracterización de la fracción fenólica</i>	116
3.3.6. <i>Análisis microestructural y morfológico</i>	120
3.4. MODELIZACIÓN	122
3.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	123
3.6. DISEÑO EXPERIMENTAL	123
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	131
CAPÍTULO I	131

<i>Ultrasound-assisted aqueous extraction of biocompounds from orange byproduct: Experimental kinetics and modeling</i>	131
CAPÍTULO II	157
<i>Effects of freezing, freeze-drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples</i>	157
CAPÍTULO III	169
<i>Influence of freezing on the bioaccessibility of beetroot (Beta vulgaris) bioactive compounds during in vitro digestion</i>	169
CAPÍTULO IV	183
<i>Effects of convective drying and freeze-drying on release of bioactive compounds from beetroot during in vitro digestion</i>	183
5. CONCLUSIONES	203
6. BIBLIOGRAFÍA	213

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

INTRODUCCIÓN

FIGURA 1.1: ESTRUCTURA DE LA CELULOSA (GONZÁLEZ-CENTENO, 2013).....	41
FIGURA 1.2: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE HEMICELULOSAS.	42
FIGURA 1.3: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE PECTINAS	43
FIGURA 1.4: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR (LODISH ET AL., 2004)	44
FIGURA 1.5: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES ÁCIDOS FENÓLICOS	47
FIGURA 1.6: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES ESTILBENOS	48
FIGURA 1.7: ESTRUCTURA QUÍMICA GENÉRICA DE LOS LIGNANOS	48
FIGURA 1.8: ESTRUCTURA QUÍMICA GENÉRICA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS FLAVONOIDES	49
FIGURA 1.9: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES FLAVONOLES.....	50
FIGURA 1.10: ESTRUCTURA QUÍMICA GENÉRICA DE LOS FLAVONONOLES Y FLAVONAS	51
FIGURA 1.11: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES FLAVANOLES MONOMÉRICOS	52
FIGURA 1.12: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PRINCIPALES FLAVANONAS	53
FIGURA 1.13: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS PRINCIPALES ANTOCIANIDINAS	54
FIGURA 1.14: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS PRINCIPALES ISOFLAVONOIDES.....	54
FIGURA 1.15: CLASIFICACIÓN DE LAS ONDAS ACÚSTICAS EN FUNCIÓN DE LA FRECUENCIA	57
FIGURA 1.16: CRECIMIENTO DE LAS BURBUJAS DE CAVITACIÓN EN EL SENO DE UN LÍQUIDO SOBRE EL QUE SE APLICAN ULTRASONIDOS DE POTENCIA (CÁRCEL, 2003).	60
FIGURA 1.17: FORMACIÓN DE MICROINYECCIONES EN UNA INTERFASE SÓLIDO-LÍQUIDO COMO CONSECUENCIA DEL FENÓMENO DE CAVITACIÓN PRODUCIDO POR LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS DE POTENCIA (GONZÁLEZ-CENTENO, 2013).	61
FIGURA 1.18: EFECTO DE LA CONGELACIÓN SOBRE LOS TEJIDOS VEGETALES (MUÑOZ-DELGADO J., 1985).....	65
FIGURA 1.19: ETAPAS DEL PROCESO DE SECADO	70
FIGURA 1.20: REGIONES ESPECÍFICAS DEL TRACTO GASTROINTESTINAL HUMANO.....	74
FIGURA 1.21: MECANISMO DE SECRECIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO EN UNA CÉLULA PARIETAL (BARRETT, 2006)	78
FIGURA 1.22: DEFINICIÓN DE BIODISPONIBILIDAD, COMO LA SUMA DE BIOACCESIBILIDAD Y BIOACTIVIDAD. CAMBIOS FÍSICOQUÍMICOS QUE TIENEN LUGAR EN CADA ETAPA	79
FIGURA 1.23: ÁRBOL DE DECISIÓN PARA LA SELECCIÓN DE UN MODELO DE DIGESTIÓN IN VITRO (ALMINGER ET AL., 2014).....	81
FIGURA 1.24: DESCRIPCIÓN GENERAL Y DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO ESTANDARIZADO DE DIGESTIÓN IN VITRO (BRODKORB ET AL., 2019).	84

MATERIALES Y MÉTODOS

FIGURA 3.1: NARANJA NAVELINA	105
FIGURA 3.2: MANZANA <i>GRANNY SMITH</i>	106
FIGURA 3.3: ESQUEMA DEL ACONDICIONAMIENTO DE LA MANZANA <i>GRANNY SMITH</i>	107
FIGURA 3.4: REMOLACHA <i>BETA VULGARIS</i>	107
FIGURA 3.5: EQUIPO EXPERIMENTAL I UTILIZADO PARA LOS EXPERIMENTOS DE EXTRACCIÓN MECÁNICA	108
FIGURA 3.6: EQUIPO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA LOS EXPERIMENTOS ACÚSTICOS	109
FIGURA 3.7: SECADERO CONVECTIVO DE VEGETALES A ESCALA DE LABORATORIO	110
FIGURA 3.8: PRINCIPIO QUÍMICO DEL MÉTODO ABTS (HUANG ET AL., 2005).....	118
FIGURA 3.9: PRINCIPIO QUÍMICO DEL MÉTODO CUPRAC (HUANG ET AL., 2005).....	119
FIGURA 3.10: PRINCIPIO QUÍMICO DEL MÉTODO FRAP (HUANG ET AL., 2005).....	120
FIGURA 3.11: CONVERSIÓN DE LAS IMÁGENES DEL MICROSCOPIO EN IMÁGENES BINARIAS MEDIANTE EL SOFTWARE IMAGE J.	121
FIGURA 3.12: DISEÑO EXPERIMENTAL I PARA EL ESTUDIO DE LA EXTRACCIÓN ASISTIDA CON ULTRASONIDOS DE POTENCIA DE COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE RESIDUOS DE NARANJA EN FASE ACUOSA	124
FIGURA 3.13: DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EL ESTUDIO DEL EFECTO DE DISTINTOS PROCESADOS SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS ANTIOXIDANTES DE DIFERENTES PRODUCTOS.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

TABLA 1.1: COMPOSICIÓN DE LA SALIVA HUMANA (NIKIFORUK, 1985).....	75
TABLA 1.2: COMPONENTES PRINCIPALES DEL JUGO GÁSTRICO HUMANO	76
TABLA 1.3: ESTUDIOS DE BIOACCESIBILIDAD DE NUTRIENTES.....	80
TABLA 1.4: REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PRINCIPALES SISTEMAS DE SIMULACIÓN IN VITRO DE LA DIGESTIÓN	82
TABLA 1.5: COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRE DE FLUIDOS DE DIGESTIÓN SIMULADOS. LOS VOLÚMENES SE CALCULAN PARA UN VOLUMEN FINAL DE 500 ML PARA CADA FLUIDO SIMULADO (BRODKORB ET AL., 2019).....	85
TABLA 1.6: EFECTO DEL PROCESADO SOBRE LA BIOACCESIBILIDAD DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	88

MATERIALES Y MÉTODOS

TABLA 3.1: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA PIEL DE NARANJA <i>NAVELINA</i> POR CADA 100 G ("USDA FOOD COMPOSITION DATABASES," N.D.)	105
TABLA 3.2: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MANZANA <i>GRANNY SMITH</i> POR CADA 100 G DE PORCIÓN COMESTIBLE ("USDA FOOD COMPOSITION DATABASES," N.D.)	106
TABLA 3.3: COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA REMOLACHA <i>BETA VULGARIS</i> POR CADA 100 G DE PORCIÓN COMESTIBLE ("USDA FOOD COMPOSITION DATABASES," N.D.)	107

RESUMEN

El sector agroalimentario debe hacer frente a la creciente presión legislativa y social sobre la mitigación del impacto ambiental de sus actividades y, en este sentido, está abordando grandes retos encaminados a contribuir a la sostenibilidad ambiental. Entre ellos, destaca la adopción del modelo económico de economía circular en sus sistemas de producción, mediante el cual, entre otros fines, se pretende evitar la generación de desperdicios y residuos.

Los residuos y subproductos alimentarios constituyen fuentes potenciales de compuestos bioactivos, como pueden ser los compuestos antioxidantes, de gran interés para las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

El presente trabajo tiene como objetivos evaluar el potencial de residuos y subproductos vegetales como fuente de compuestos antioxidantes, proponer el uso de una metodología emergente y sostenible como es la de los ultrasonidos de potencia, para su extracción, y estudiar del efecto del procesado sobre la bioaccesibilidad de estos compuestos. Para ello se plantearon dos estudios. El primero se centró en evaluar el efecto de la aplicación de energía acústica en el proceso de extracción acuosa de compuestos antioxidantes de subproductos de naranja, y el segundo se dirigió hacia la evaluación del efecto de diferentes técnicas de procesado (congelación, liofilización y secado convectivo) sobre la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes de productos con distinta porosidad (manzana, con una porosidad intermedia; y remolacha, con una estructura más compacta), mediante la utilización de una metodología de digestión in vitro estática que consistió en una etapa bucal seguida de una etapa gástrica.

Se ha validado el uso de residuos de naranja como fuente de compuestos antioxidantes y, además, se ha mejorado el proceso de extracción mediante la aplicación de ultrasonidos de potencia. Se estudiaron las cinéticas de extracción acústica, así como el efecto de la temperatura sobre las mismas, y se compararon con las correspondientes a la extracción convencional mediante agitación mecánica. El uso de ultrasonidos de potencia permitió utilizar el agua como disolvente de extracción, obteniendo rendimientos de extracción (40-80%) similares a los propuestos en la bibliografía para la extracción con disolventes orgánicos.

Los rendimientos de extracción del contenido en polifenoles totales, flavonoides totales y actividad antioxidante (método ABTS), después de 10 min a 25 °C y densidad acústica de 790 W/L, fueron más elevados (28, 44 y 157% superiores, respectivamente) que los rendimientos obtenidos a las mismas temperaturas mediante extracción con agitación mecánica.

Las curvas de extracción de los contenidos de polifenoles y flavonoides totales, y de la actividad antioxidante (método ABTS), de los subproductos de naranja fueron simuladas adecuadamente mediante el modelo de Weibull modificado obteniendo valores del error relativo medio inferiores al 5%, tanto en extracción con agitación mecánica como con ultrasonidos, dentro del rango de temperaturas 5-25 °C. Se pudo concluir que la energía de activación del proceso disminuyó con la aplicación de ultrasonidos respecto a los experimentos control (32% con 520 W/L y 63% con 790 W/L para contenido en polifenoles totales; 68% con 520 W/L y 68% con 790 W/L para contenido en flavonoides totales; 31% con 520 W/L y 38% con 790 W/L para actividad antioxidante (ABTS) y que la tasa de extracción disminuyó con el tiempo de extracción (β en todos los experimentos fue inferior a 1).

A continuación, se evaluaron los efectos de la aplicación de distintas técnicas de procesado (congelación, liofilización y secado convectivo) sobre la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes durante un proceso de digestión in vitro. Estos efectos fueron diferentes según la estructura de la matriz alimentaria. La microestructura y la composición inicial de ambos vegetales, manzana y remolacha se vieron modificadas tanto por la congelación como por el secado. Estas modificaciones estructurales dieron lugar a cambios de comportamiento de dichos materiales durante el proceso de digestión in vitro. Se comprobó que, en general, el procesado contribuyó a la mejora de la bioaccesibilidad de compuestos con propiedades antioxidantes presentes tanto en la manzana como en la remolacha (bioaccesibilidad ~ 50% y ~ 60% mayores, respectivamente, que en muestras sin procesar).

La bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes en las muestras de manzana procesada fue superior (58, 55 y 47% en muestras congeladas, liofilizadas y secadas por secado convectivo, respectivamente) que en la muestra fresca (32%). Un comportamiento similar se pudo observar en el caso de la remolacha donde la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes en las muestras procesadas fue un 20% mayor que en la muestra fresca.

El modelo de Weibull permitió describir las transferencias de materias que tuvieron lugar durante el proceso de digestión in vitro, la pérdida de compuestos bioactivos de la matriz sólida (con un ERM<5.3% en manzana y un ERM<7.1% en remolacha), y la ganancia de compuestos antioxidantes, en el caso de remolacha, por el jugo gástrico con un ERM<8.7%.

La aplicación del análisis de imagen permitió realizar un análisis cuantitativo del efecto del secado y de la digestión in vitro sobre la microestructura de la matriz alimentaria. El proceso de secado provocó un aumento del número de células por unidad de área, mientras que el

proceso de digestión provocó una disminución del número de células por unidad de área, indicando que el proceso de secado provocó colapso celular y el proceso de digestión in vitro provocó lisis celular.

En conclusión, este trabajo contribuye a validar del uso de residuos/subproductos de naranja como fuente de compuestos antioxidantes mejorando su proceso de extracción acuosa mediante la aplicación de ultrasonidos de potencia, así como, a demostrar el efecto del procesado mediante congelación y secado, sobre la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes presentes en diferentes matrices alimentarias, como la manzana y la remolacha.

RESUM

El sector agroalimentari ha de fer front a la creixent pressió legislativa i social sobre l'atenuació de l'impacte ambiental de les seves activitats i en aquest sentit, està abordant grans reptes encaminats a contribuir a la societat ambiental. Entre ells, destaca l'adopció del model econòmic de economia circular als seus sistemes de producció, mitjançant el qual, entre d'altres fins, es pretén evitar la generació de rebuïjos i residus.

Els residus i subproductes alimentaris constitueixen fonts potencials de composts bioactius, com poden ser els composts antioxidants, de gran interès per les indústries alimentària, cosmètica y farmacèutica.

El present treball té com objectius avaluar el potencial dels residus i subproductes vegetals com a font de composts antioxidants, proposar l'ús d'una metodologia emergent i sostenible com es la dels ultrasons de potència, per la seva extracció, y estudiar l'efecte del processat sobre la bioaccessibilitat d'aquest compostos. Per això, es varen plantejar dos estudis. El primer es va centrar en avaluar l'efecte de l'aplicació d'energia acústica als processos d'extracció aquosa de composts antioxidants de subproductes de taronja, i el segon, es va dirigir cap a l'avaluació de l'efecte de diferents tècniques de processat (congelació, liofilització i assecatge convectiu) sobre la bioaccessibilitat dels composts antioxidants de productes amb porositat diferent (poma, amb una porositat intermedi; y remolatxa, amb una estructura més compacta), mitjançant la utilització d'una metodologia de digestió in vitro estàtica que va consistir en una etapa bucal seguida d'una etapa gàstrica.

S'ha validat l'ús de residus de taronja com a font de composts antioxidants i, a més, s'ha millorat el procés d'extracció mitjançant l'aplicació d'ultrasons de potència. Es varen estudiar les cinètiques d'extracció acústica, així com l'efecte de la temperatura sobre les mateixes, i es varen comparar amb les corresponents a la extracció convencional mitjançant agitació mecànica. L'ús d'ultrasons de potència va permetre utilitzar aigua com a dissolvent d'extracció, obtenint rendiments d'extracció (40-80%) semblants als proposats a la bibliografia per l'extracció amb dissolvents orgànics.

Els rendiments d'extracció del contingut en polifenols totals, flavonoides totals i activitat antioxidants (mètode ABTS), després de 10 min a 25 °C i una densitat acústica de 790 W/L varen ser més elevats (28, 44 y 157% superiors, respectivament) que el rendiments obtinguts amb les mateixes temperatures mitjançant extracció amb agitació mecànica.

Les corbes d'extracció dels continguts de polifenols i flavonoides totals i de l'activitat antioxidant (mètode ABTS) dels subproductes de taronja varen ser simulades satisfactòriament mitjançant el model de Weibull modificat obtenint valors de l'error relatiu mitja inferiors al 5% tant a l'extracció amb agitació mecànica com amb ultrasons, dins l'interval de temperatures 5-25 °C. Es va poder concloure que l'energia d'activació va disminuir amb l'aplicació d'ultrasons respecte als experiments control (32% amb 520 W/L y 63% amb 790W/L pel contingut en polifenols totals; 68% amb 520 W/L y 68% amb 790 W/L pel contingut en flavonoides totals; 31% amb 520 W/L y 38% amb 790 W/L per l'activitat antioxidant (ABTS) i que el rendiment d'extracció va disminuir amb el temps d'extracció (β va ser inferior a 1 a tots els experiments).

A continuació, es varen avaluar els efectes de l'aplicació de les diferents tècniques de processat (congelació, liofilització i assecatge convectiu) sobre la bioaccessibilitat dels composts antioxidants durant el procés de digestió in vitro. Aquests efectes varen ser diferents segons l'estructura alimentària. La microestructura i la composició inicial d'ambdós vegetals, poma i remolatxa, es varen veure modificades tant per la congelació com per l'assecatge. Aquestes modificacions estructurals varen donar lloc a canvis de comportament de les mostres durant el procés de digestió in vitro. Es va comprovar que, en general, el processat va contribuir a la millora de la bioaccessibilitat de composts amb propietats antioxidants presents tant a la poma com a la remolatxa (bioaccessibilitat ~50% i ~60% superiors, respectivament, que a les mostres sense processar).

La bioaccessibilitat dels composts antioxidants de les mostres de poma processada va ser superior (58, 55 i 47% en mostres congelades, liofilitzades i assecades per assecatge convectiu, respectivament) que a la mostra fresca (32%). Un comportament semblant es va poder observar en el cas de la remolatxa on la bioaccessibilitat de composts antioxidants de les mostres processades va ser un 20% superior que a la mostra fresca.

El model de Weibull va permetre descriure les transferències de massa que varen tenir lloc durant el procés de digestió in vitro, la disminució de composts bioactius de la matriu sòlida (amb un ERM<5.3% en poma i un ERM<7.1% en remolatxa), y un augment de composts antioxidants, en el cas de la remolatxa, en el suc gàstric amb un ERM<8.7%.

L'aplicació d'anàlisis d'imatge va permetre un anàlisis quantitatiu de l'efecte de l'assecatge i de la digestió in vitro sobre la microestructura de la matriu alimentària. El procés d'assecatge va provocar un augment del nombre de cèl·lules per unitat d'àrea, mentre que el procés de digestió va provocar una disminució del nombre de cèl·lules per unitat d'àrea, tot

indicant que el procés d'assecatge va provocar col·lapse cel·lular i el procés de digestió in vitro va provocar lisis cel·lular.

Per concloure, aquest treball contribueix a validar l'ús dels residus/subproductes de taronja com a font de composts antioxidants millorant el seu procés d'extracció aquosa mitjançant l'aplicació d'ultrasons de potència, així com, a demostrar l'efecte del processat mitjançant la congelació i assecatge, sobre la bioaccessibilitat del composts antioxidants presents a diferents matrius alimentàries, com la poma i la remolatxa.

ABSTRACT

The agri-food industry must face the growing legislative and social pressure about the mitigation of the environmental impact of its activities and, in this regard, it is addressing major challenges aimed to contribute to environmental sustainability. Among them, the adoption of the economic model of circular economy in its production systems stands out, through which, among other purposes, it is intended to avoid the generation of residues and wastes.

Food residues and by-products constitute potential sources of bioactive compounds, such as antioxidant compounds, of great interest to the food, cosmetic and pharmaceutical industries.

The purpose of this work is to evaluate the potential of plant residues and by-products as a source of antioxidant compounds, to propose the use of an emerging and sustainable methodology such as power ultrasound for their extraction, and to study the effect of processing on the bioaccessibility of these compounds. For this, two studies were proposed. The first one was focused on assessing the effect of the application of acoustic energy in the aqueous extraction of antioxidant compounds from orange by-products; and the second one was addressed to the evaluation of the effect of different processing techniques (freezing, lyophilization and convective drying) on the bioaccessibility of antioxidant compounds from products with different porosity (apple, with an intermediate porosity; and beetroot, with a more compact structure), through the use of a static *in vitro* digestion methodology which consisted of an oral stage followed by a gastric stage.

The use of orange by-products as a source of antioxidant compounds has been validated, furthermore, the extraction process has been improved by applying power ultrasound. The kinetics of acoustic extraction and the temperature effect on them were studied, and compared to those of conventional extraction by mechanical agitation. The use of power ultrasound allowed the use of water as solvent, obtaining extraction yields (40-80 %) similar to those proposed in the literature for the extraction with organic solvents.

The extraction yields of total polyphenols, total flavonoids contents, and antioxidant activity (ABTS method), after 10 min at 25 ° C and acoustic density of 790 W/L, were higher (28, 44 and 157 % higher, respectively) that the yields obtained at the same temperature by mechanical agitation assisted extraction.

The extraction curves of total polyphenols and total flavonoids contents, and antioxidant activity (ABTS method) from orange by-products were adequately simulated by using the modified Weibull model, obtaining mean relative error (ERM) figures lower than 5 %, both in mechanical and acoustic assisted extraction processes, within the temperature range of 5-25 °C. It was concluded that the activation energy of the process decreased with the application of ultrasound compared to control experiments with mechanical agitation (32% at 520 W/L and 63% at 790 W/L for total polyphenol content; 68% at 520 W/L and 68% at 790 W/L for total flavonoid content; 31% at 520 W/L and 38% at 790 W/L for antioxidant activity (ABTS) and the extraction rate decreased with the extraction time (β was less than 1 in all experiments).

Next, the effects of the application of different processing techniques (freezing, lyophilization and convective drying) on the bioaccessibility of the antioxidant compounds during *in vitro* digestion were evaluated. These effects were different depending on the structure of the food matrix. The microstructure and the initial composition of both apple and beetroot samples changed after freezing and drying processes. These structural modifications resulted in changes in the behavior of these samples during the *in vitro* digestion process. It was observed that, in general, processing contributed to the improvement of the bioaccessibility of compounds with antioxidant properties present in both apple and beetroot (bioaccessibilities ~ 50% and ~ 60% higher, respectively, than in untreated samples).

Bioaccessibility of antioxidant compounds in processed apple samples was higher (58, 55 and 47% in frozen, lyophilized and dried by convective drying samples, respectively) than in the raw sample (32%). A similar behavior was observed in the case of beetroot, bioaccessibility of antioxidant compounds in processed samples being 20% higher than in the raw sample.

The Weibull model allowed the description of both mass transfers that took place during the *in vitro* digestion process, the loss of bioactive compounds from the solid matrix (with an ERM <5.3 % in apple digestion and ERM <7.1 % in beetroot digestion), and the gain of antioxidant compounds, in the case of beetroot digestion with gastric juice with ERM <8.7 %.

The application of image analysis allowed a quantitative analysis of the effects of both drying and *in vitro* digestion. Drying process promoted increases in the number of cells per area unit, which indicated that cell collapses took place, however *in vitro* digestion promoted decreases in the number of cells per area unit, which indicated that cell ruptures took place.

In conclusion, this work contributes to the validation of the use of orange residues and by-products as a source of antioxidant compounds, improving the aqueous extraction process through the application of power ultrasound; and to demonstrate the effect of processing by freezing and drying, on the bioaccessibility of the antioxidant compounds present in different food matrix such as apple and beetroot.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Residuos de la industria alimentaria

La estrategia “Más alimento, menos desperdicio” impulsada por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente forma parte de la contribución del Gobierno de España para atajar el problema global que supone el desperdicio alimentario (Ministerio de agricultura, 2014).

En el marco de las instituciones internacionales y europeas que han abordado la problemática, no existe un consenso oficial sobre la definición de “desperdicio alimentario”, utilizándose indistintamente diversos términos como pérdidas, desperdicio, despilfarro o residuo. La FAO define el “desperdicio de alimentos” como el descarte de alimentos aptos para el consumo y la “pérdida de alimentos” como la disminución de la masa alimentaria comestible durante las etapas de producción, postcosecha, elaboración y distribución. La FAO estima que a nivel mundial se pierde o desperdicia 1/3 de la producción (FAO, 2012).

De acuerdo con la información publicada en el 2018 por el MAPAMA (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio ambiente), a nivel estatal, alrededor del 42% del desperdicio alimentario es doméstico, seguido del 39% en la industria agroalimentaria y del 14% en la restauración, siendo el resto imputable a la distribución y al sector primario.

Asimismo, los subproductos de la industria alimentaria constituyen un grave problema de generación de residuos por lo que gran número de las nuevas estrategias empresariales están basadas en los conceptos de “aprovechamiento o revalorización de residuos y subproductos” y de “economía circular en sistemas de producción”, ambos sustentados en políticas públicas orientadas a la mejora de la sostenibilidad y competitividad de las cadenas agroalimentarias.

Respecto a la gestión de residuos y subproductos, en España merece especial atención la reciente iniciativa “España circular 2030” y la estrategia “Más alimento, menos desperdicio”, dirigidas a reducir las pérdidas y el desperdicio alimentario en todos los eslabones de la cadena alimentaria.

1.2. Economía circular. Residuo cero en el sector agroalimentario

La economía circular es la corriente que tiene como objetivo conseguir la transición hacia una economía más sólida y sostenible. Con este modelo económico los recursos,

productos y alimentos se mantienen más tiempo en la cadena, o se pretende evitar la generación de desperdicios y residuos (Cerantola & Ortiz, 2018).

La economía circular representa un cambio drástico en los sistemas de producción y consumo actuales, orientándolos hacia sistemas regenerativos y restaurativos capaces de mantener el valor de los recursos naturales y de los productos, limitando de manera exponencial los consumos de materia prima y energía. A su vez, se evita la creación de residuos y efectos negativos derivados, atenuando los impactos negativos para el medioambiente, el clima y la salud (Cerantola & Ortiz, 2018).

Cabe destacar que el sector agroalimentario es uno de los principales motores de la economía española, ya que la industria de alimentación y bebidas representa el 16% del total de la industria manufacturera de España. La componen alrededor de 30000 empresas de las que un 96% son PYMES y microempresas. Además, la industria agroalimentaria española es uno de los sectores más expuestos a los retos y oportunidades de sostenibilidad, consecuencia de su dependencia directa y de su capacidad de actuación sobre los recursos naturales, siendo considerada por ello una industria de alto impacto. Las estrategias de la economía circular en el sector agroalimentario se pueden agrupar en cinco categorías (Secretaría técnica del laboratorio de Ecoinnovación, 2017):

- Gestión del agua, la energía y la materia orgánica para su reutilización u otro tipo de aprovechamiento, así como la sustitución de los combustibles fósiles.
- Producción agraria más limpia.
- Utilización de envases y embalajes alimentarios que no generen residuos.
- Desarrollo de nuevos productos alimentarios y para otros sectores a partir de subproductos y residuos generados.
- Realización de una economía colaborativa con la reventa de equipos y bienes, así como con el uso compartido de recursos.

Las empresas de la industria agroalimentaria tienen la capacidad y el compromiso de conducir a toda su cadena de valor hacia una gestión más sostenible que se base en un modelo de producción circular, en el que prospere el desarrollo de estrategias encaminadas a la reutilización y aprovechamiento de residuos y subproductos, la búsqueda de la eficiencia en la utilización de los recursos y el aprovechamiento de sinergias entre los distintos agentes de la

cadena de valor. La aplicación de prácticas circulares contribuye a un mejor posicionamiento de las empresas respecto de sus competidores, en lo que a reputación e imagen de marca se refiere, lo que a su vez puede derivar en que la demanda de sus productos aumente y dé como resultado un incremento de sus ingresos (Cerantola & Ortiz, 2018).

En conclusión, en la implementación de una economía circular en el sector agroalimentario tiene un importante papel el sector I+D+I, que contribuirá a alcanzar el objetivo de residuo cero en el sector agroalimentario.

1.3. Compuestos bioactivos de los alimentos

Los nutrientes son sustancias químicas extracelulares que la célula necesita para realizar sus funciones vitales. Las células transforman los nutrientes en constituyentes celulares a través de un proceso metabólico de biosíntesis denominado anabolismo, o bien, son degradados para la obtención de otras moléculas y/o energía.

A determinados compuestos, que forman parte de los vegetales, y presentan efectos beneficiosos para la salud, pero que no participan activamente en procesos metabólicos necesarios para el organismo se les suele denominar compuestos bioactivos.

1.3.1. Compuestos bioactivos de interés

Los compuestos bioactivos presentes en los alimentos son muchos y de características muy dispares. De entre estos compuestos destacan la fibra alimentaria, que desempeña funciones fisiológicas sumamente importantes como estimular la perístasis intestinal (Escudero & González, 2006), y los compuestos antioxidantes, que se encuentran dentro de la familia de los fitoquímicos que son compuestos que, además de tener papeles específicos en el crecimiento y supervivencia de las plantas, algunos de ellos son fisiológicamente activos cuando son consumidos (Coronado, Vega, Gutiérrez, Vázquez, & Radilla, 2015).

1.3.1.1. La fibra alimentaria o dietética

La definición de fibra alimentaria o dietética fue objeto de gran controversia a mediados del siglo XX. Finalmente, el Codex Alimentarius (Codex Alimentarius, 1985) definió la fibra alimentaria como polímeros de carbohidratos con diez o más unidades monoméricas, que no pueden ser hidrolizadas por las enzimas endógenas del intestino delgado de los seres humanos y que pertenecen a las siguientes categorías: (1) polímeros de carbohidratos comestibles que se sintetizan naturalmente en los alimentos que se consumen; (2) polímeros de carbohidratos que

se han obtenido a partir de materias primas alimentarias por medios físicos, enzimáticos o químicos; y (3) polímeros sintéticos de carbohidratos. En el caso de las categorías (2) y (3) se debe haber demostrado que tienen un efecto beneficioso para la salud (Codex Alimentarius, 2008).

La fibra dietética tiene un origen exclusivamente vegetal (Punna & Paruchuri, 2003), siendo los cereales, frutas, legumbres y hortalizas, las fuentes naturales principales de fibra en nuestra alimentación (Redondo-Cuenca, Villanueva-Suárez, & Mateos-Aparicio, 2008). Cabe indicar, no obstante, que la concentración y naturaleza de la fibra dietética difiere notablemente de un alimento a otro: mientras que los cereales son la fuente principal de celulosa y hemicelulosas, las frutas y hortalizas lo son de pectinas (Elleuch et al., 2011). La fibra dietética se caracteriza por tener una fracción soluble y otra insoluble. La naturaleza soluble e insoluble de las fibras dietéticas implica diferencias en su funcionalidad tecnológica y en sus efectos fisiológicos. Las fibras solubles se caracterizan por su capacidad para aumentar la viscosidad y reducir la respuesta glucémica y el colesterol plasmático, y las fibras insolubles se caracterizan por su porosidad, su baja densidad y su capacidad para aumentar el volumen de masa fecal y disminuir el tránsito intestinal (Elleuch et al., 2011).

En general, la fibra dietética que procede de frutas y hortalizas presenta una mejor calidad nutricional que la de los cereales. Ello se debe no sólo a la mayor proporción de fibra soluble y, consecuentemente, un mejor y más equilibrado ratio fibra insoluble/fibra soluble (FI/FS), sino también a un mayor contenido de fibra total sobre extracto seco, mejores propiedades funcionales de la fibra (mayor capacidad de retención de agua y lípidos, mayor poder de gelificación y mayor viscosidad), menor consumo de energía metabólica y presencia de gran cantidad de compuestos bioactivos asociados que pueden producir efectos saludables adicionales (Figuerola, Hurtado, Estévez, Chiffelle, & Asenjo, 2005; Marín, Soler-Rivas, Benavente-García, Castillo, & Pérez-Alvarez, 2007; Vergara-Valencia et al., 2007).

Los componentes de la fibra dietética y por consiguiente de la pared celular de los vegetales se describen en los apartados siguientes.

a) Componentes de la pared celular

La pared celular se define como una estructura rígida localizada en la zona más externa de las células de origen vegetal. Su composición química, así como el tipo de polisacáridos que la componen, varía considerablemente en función de la planta y el tipo de tejido. Aun así, los polisacáridos son los principales componentes de la pared celular primaria de frutas y

hortalizas, concretamente, la celulosa, hemicelulosas y pectinas. Por otra parte, la lignina también forma parte de la pared celular pero se encuentra mayoritariamente en las células que han desarrollado paredes celulares secundarias (Aboughe-Angone et al., 2008).

A continuación, se presentará una pequeña descripción de cada uno de los componentes principales de la pared celular.

Celulosa

La celulosa es un homopolímero de la pared celular que resulta de la unión lineal de monómeros de glucosa, mediante enlaces glucosídicos tipo β -1.4, formando cadenas de más de 15000 unidades. La estructura de este polisacárido consiste en microfibrillas unidas mediante puentes de hidrógeno, que a su vez interaccionan entre sí formando macrofibras de celulosa visibles mediante microscopía electrónica (Figura 1.1).

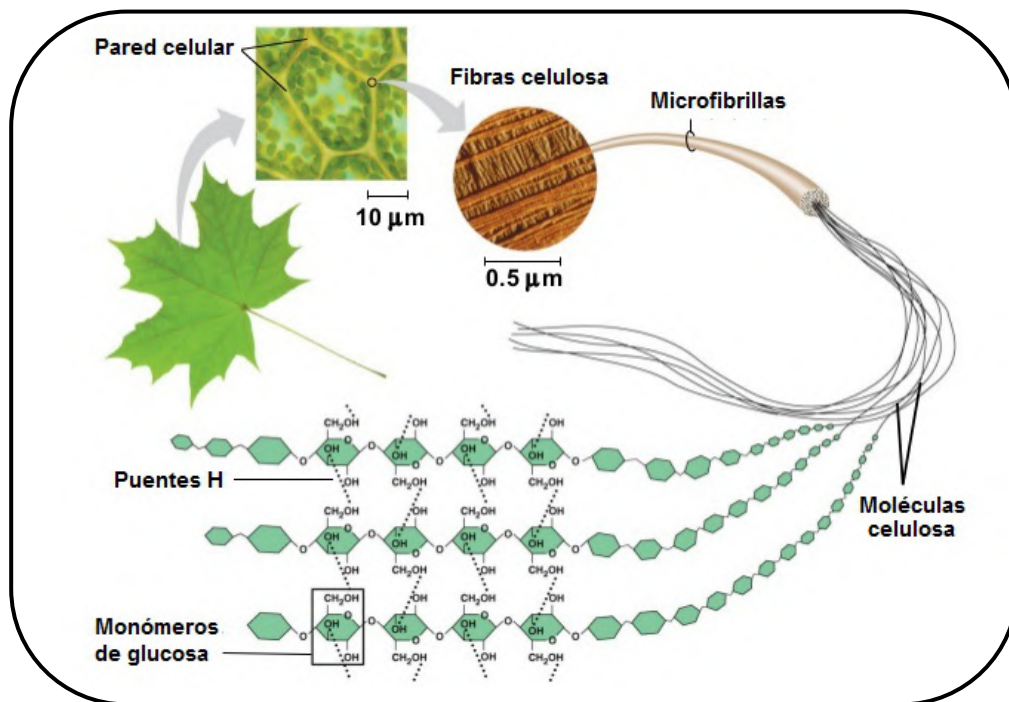


Figura 1.1: Estructura de la celulosa (González-Centeno, 2013)

Hemicelulosa

A diferencia de la celulosa, las hemicelulosas están constituidas por más de un tipo de monosacárido, lo que da lugar a diferentes heteropolímeros (Figura 1.2). De entre ellos, los xiloglucanos, destacan por su presencia mayoritaria en frutas y hortalizas (Derriche & Berrahmoune, 2007). Los xiloglucanos están formados por una cadena principal de glucosa con ramificaciones α -1.6 de xilosa, que a su vez pueden presentar sustituciones β -1.2 con unidades de galactosa, fucosa y/o arabinosa (Buckeridge, 2010). Un segundo tipo de polisacáridos

perteneciente al grupo de hemicelulosas son los xilanos ácidos o glucuronoxilanos, constituidos por una cadena principal de xilosa y ramificaciones de ácido glucurónico. También destacan los glucomananos, a menudo acetilados, formados únicamente por unidades de manosa y glucosa; y los arabinoxilanos que, con ramificaciones de arabinosa sobre una cadena principal de xilosa, son las principales hemicelulosas presentes en las paredes celulares de los cereales (Scheller & Ulvskov, 2010). En general, las hemicelulosas presentan enlaces β -1,4 entre los residuos de monosacáridos de la cadena principal y, en la pared celular, se encuentran ligadas a las microfibrillas de celulosa mediante puentes de hidrógeno.

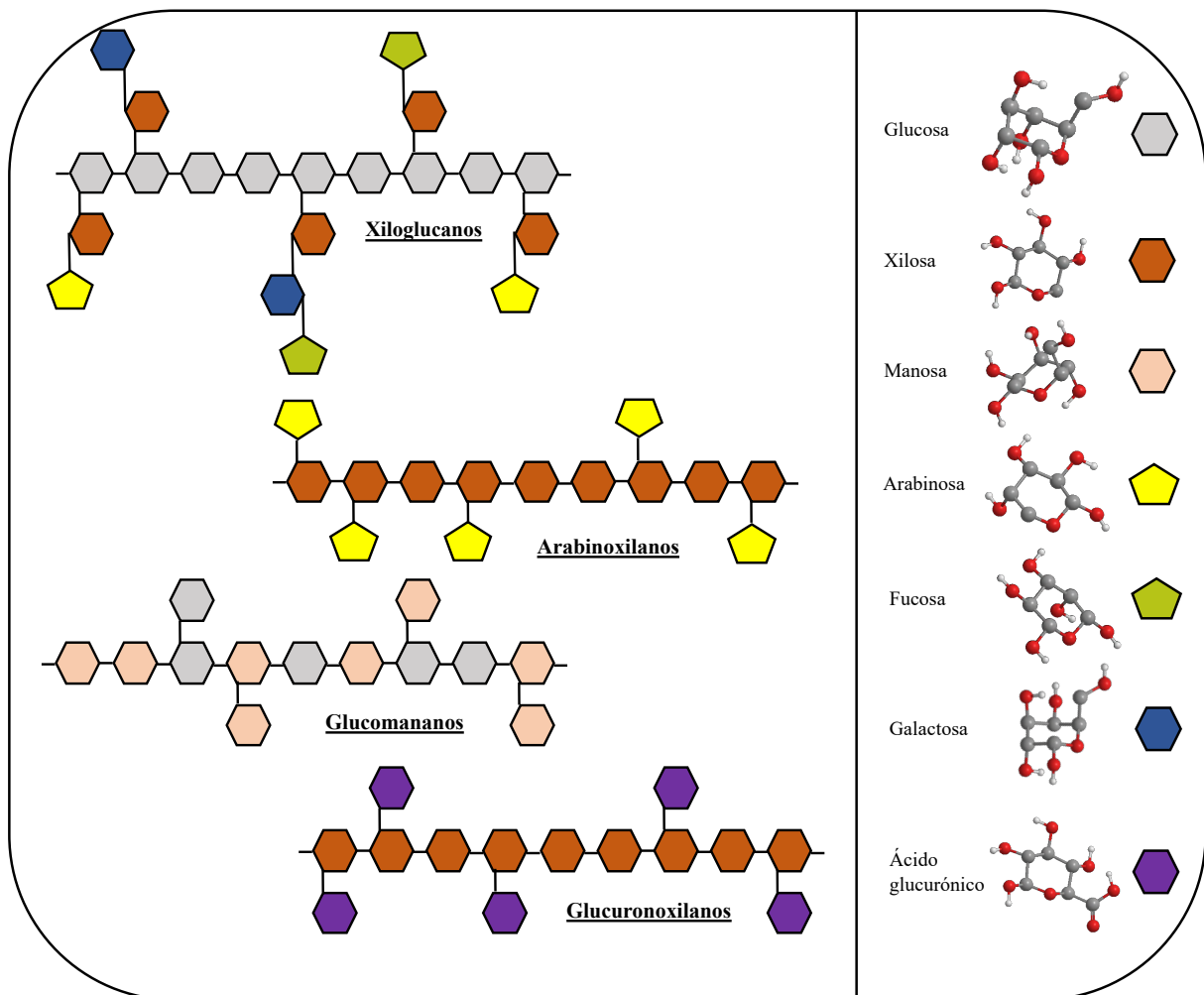


Figura 1.2: Representación esquemática de los principales tipos de hemicelulosas.

Pectinas

Las pectinas constituyen el grupo de polisacáridos más complejo de la pared celular. Las dos estructuras principales de las pectinas son los homogalacturonanos y los ramnogalacturonanos (Brett & Waldron, 1996) (Figura 1.3). Los homogalacturonanos consisten en largas cadenas lineales de residuos de ácido glucurónico unidos mediante enlaces

α -1.4, que pueden estar parcialmente metilesterificados o acetilados (Hilz, Bakx, Schols, & Voragen, 2005). Por su parte, los ramnogalacturonanos se caracterizan por la presencia de unidades de ramnosa intercaladas en la cadena principal de ácido galacturónico unidas mediante enlaces α -1.2. Las cadenas laterales, unidas a la posición C₄ de la ramnosa, están principalmente constituidas por arabinosa y galactosa (Arnous & Meyer, 2009).

La funcionalidad de las pectinas como agentes gelificantes y estabilizantes en la industria alimentaria está íntimamente relacionada con su estructura química, concretamente con el tamaño de la molécula, y el número y distribución de los ésteres metílicos. En función del grado de metilesterificación (DME) de los residuos de ácido glucurónico, las pectinas pueden clasificarse como pectinas de alto grado de metilesterificación (DME > 50%) o de bajo grado de metilesterificación (DME < 50%) (Guillotin, Van Loey, Boulenguer, Schols, & Voragen, 2007).

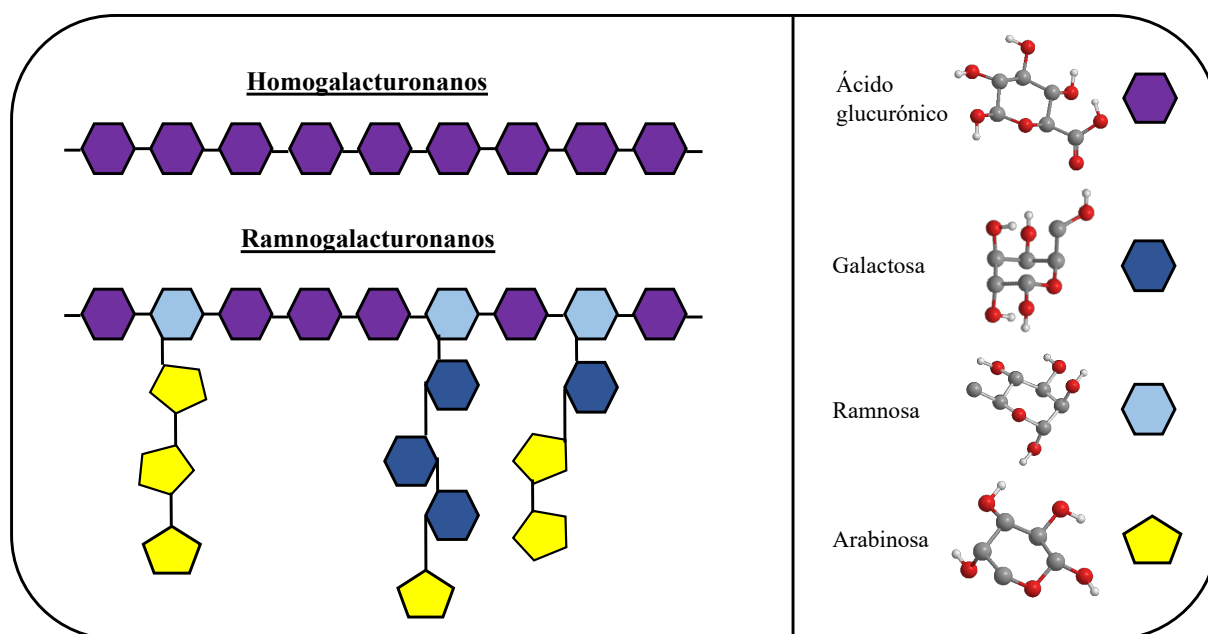


Figura 1.3: Representación esquemática de los principales tipos de pectinas

Las pectinas son el componente de la pared celular más susceptible a sufrir degradación, ya sea por activación enzimática o por β -eliminación (Fraeye et al., 2007). En ambos casos, los cambios químicos que tienen lugar pueden dar lugar a una reducción del contenido total de pectinas en el alimento, lo que puede quedar reflejado en las propiedades de la fibra alimentaria, tales como su solubilidad o su capacidad para absorber y/o retener agua y lípidos.

b) Polisacáridos de la pared celular y fibra dietética

En la Figura 1.4 se representa una de las hipótesis más aceptadas para explicar la macroestructura de la pared celular de la mayoría de las plantas. Este modelo propone una red macromolecular constituida por macrofibras de celulosa unidas directamente a hemicelulosas, actuando éstas, juntamente con las pectinas, como matriz del sistema (Carpita & Gibeaut, 1993).

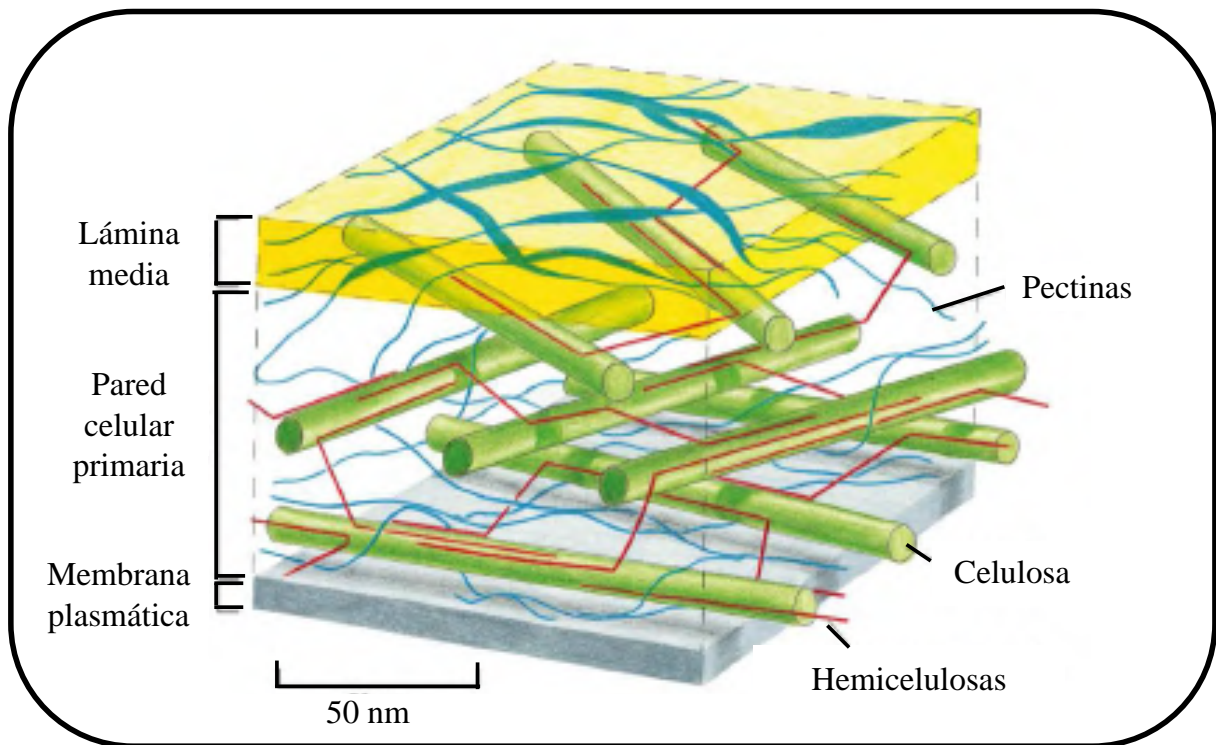


Figura 1.4: Esquema representativo de la estructura de la pared celular (Lodish et al., 2004)

La fibra alimentaria puede clasificarse en dos fracciones según el grado de solubilidad en agua de los polisacáridos de la pared celular. La fracción denominada fibra soluble está constituida mayoritariamente por pectinas, mientras que la celulosa, hemicelulosa y lignina forman parte principalmente de la fibra insoluble (McKee & Latner, 2000). Cabe destacar que ambas fracciones comparten la capacidad para retener grandes cantidades de agua y cationes en su estructura macromolecular (Jiménez-Escrig & Sánchez-Muniz, 2000). Además, la fibra soluble presenta una elevada capacidad de gelificación y retención de lípidos, por lo que incrementa la viscosidad de la matriz donde se encuentra (Vergara-Valencia et al., 2007). Por otra parte, la fibra insoluble se caracteriza por tener una elevada porosidad y baja densidad. Estas propiedades asociadas a cada una de las fracciones de la fibra justifican su funcionalidad tecnológica y sus efectos fisiológicos y/o nutricionales en el cuerpo humano. De acuerdo con varios autores, para beneficiarse de los efectos y propiedades asociadas a las fracciones soluble

e insoluble de la fibra alimentaria, el balance entre ambas fracciones debe estar equilibrado, lo que se traduce en una ratio de variación fibra insoluble/fibra soluble comprendido entre 1.0 y 2.3 (Griguelmo-Miguel & Martín-Belloso, 1999).

c) Interés de la fibra alimentaria a nivel industrial

La fibra alimentaria es apreciada no sólo por sus efectos fisiológicos beneficiosos para la salud (Kendall, Esfahani, & Jenkins, 2010), sino también por sus importantes propiedades funcionales y tecnológicas en el ámbito de la industria alimentaria (Matos-Chamorro & Chambilla-Mamani, 2010).

La fibra soluble contribuye a la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes, ya que inhibe la absorción de macronutrientes, tales como el colesterol y/o la glucosa (Isken, Klaus, Osterhoff, Pfeiffer, & Weickert, 2010), gracias a su viscosidad y a su capacidad para unirse a biomoléculas orgánicas. Por su parte, la fibra insoluble está implicada en la aceleración del tránsito gastrointestinal (Redondo-Cuenca et al., 2008). Su elevada capacidad de retención de agua, su baja densidad y viscosidad, y su escasa fermentación a nivel del intestino grueso, contribuye a aumentar la motilidad del bolo alimenticio a través del sistema digestivo, a incrementar el volumen de masa fecal y a estimular su evacuación (Tosh & Yada, 2010).

Las propiedades fisicoquímicas de la fibra descritas anteriormente se utilizan en la industria alimentaria para mejorar la viscosidad, textura y vida útil de sus productos. En este marco, se han diseñado y comercializado nuevos alimentos funcionales que incorporan concentrados de fibra, no calóricos y económicos, para el reemplazo parcial de otros constituyentes como la harina, la grasa o el azúcar. Su función tecnológica y nutricional se basa en su elevada capacidad de retención de agua y aceite y en su contribución a la mejora de la estabilidad de emulsiones (Beltrán, 2016).

1.3.1.2. Compuestos antioxidantes

Los compuestos antioxidantes tienen como función principal impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias, principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones de oxidación se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano ya que pueden inhibir la reacción en cadena generada por los radicales libres. Los compuestos antioxidantes pueden actuar como especies capaces de: (i) capturar moléculas que inician la peroxidación, (ii) actuar como quelantes de iones metálicos para que no puedan generar especies reactivas o

descomponer los peróxidos, (iii) inactivar $*O_2^-$ evitando la formación de peróxidos, (iv) romper la reacción en cadena autooxidativa, y/o reducir las concentraciones localizadas de O_2 (Asimi, Sahu, & Pal, 2013). La efectividad antioxidante de estos compuestos depende de sus características químicas y de su posición en el alimento (proximidad a los fosfolípidos de membrana, interfaces de emulsión o en la fase acuosa) (Watanabe et al., 2000). Los antioxidantes tienen diversas propiedades biológicas, como los efectos antiinflamatorios y anticancerígenos; reducen la incidencia de enfermedades coronarias y contribuyen al mantenimiento de la salud intestinal mediante la modulación del balance microbiano intestinal (Bartoszek & Polak, 2012; Cardona, Andrés-Lacueva, Tulipani, Tinahones, & Queipo-Ortuño, 2013; Hamrouni-Sellami et al., 2013; Machmudah et al., 2012; Toro-Funes et al., 2012). Los principales tipos de compuestos con actividad antioxidante son: vitaminas (vitamina C y vitamina E), carotenoides (carotenos y xantofilas) y polifenoles (no-flavonoides y flavonoides).

Los compuestos fenólicos en los alimentos se originan como metabolitos secundarios en las plantas (Naczki & Shahidi, 2004). A concentraciones bajas, actúan como antioxidantes y protegen a los alimentos de procesos de rancidez oxidativa (Karakaya, 2004) actuando como inhibidores de las reacciones activadas por radicales libres. Es conocido que los compuestos fenólicos reducen el riesgo de cáncer, enfermedades cardíacas y diabetes; inhiben la agregación plaquetaria plasmática, la actividad de la ciclooxigenasa (COX) y la liberación de histamina, y también presentan propiedades antibacterianas, antivirales, antiinflamatorias y antialérgicas (Oak, El Bedoui, & Schini-Kerth, 2005; Shetty, 2004; Yang, Landau, Huang, & Newmark, 2001; Yao et al., 2004).

En general, los polifenoles se dividen en dos grupos principales: flavonoides y no flavonoides. Los compuestos no flavonoides incluyen moléculas estructuralmente simples como los ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos) y estilbenos, y moléculas altamente complejas como oligómeros de estilbeno y ligninas (Cheynier, 2005). Los compuestos fenólicos flavonoides, incluye más de 9000 compuestos identificados (Martens & Mithöfer, 2005; Pietta, 2000) que comparten la misma estructura genérica, el núcleo de flavan, que consiste en dos anillos aromáticos unidos por un anillo de pirano.

a) Compuestos fenólicos no-flavonoides

Entre los compuestos fenólicos no-flavonoides destacan los ácidos fenólicos, los estilbenos y lignanos.

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos (Figura 1.5) se pueden clasificar según su estructura en derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico.

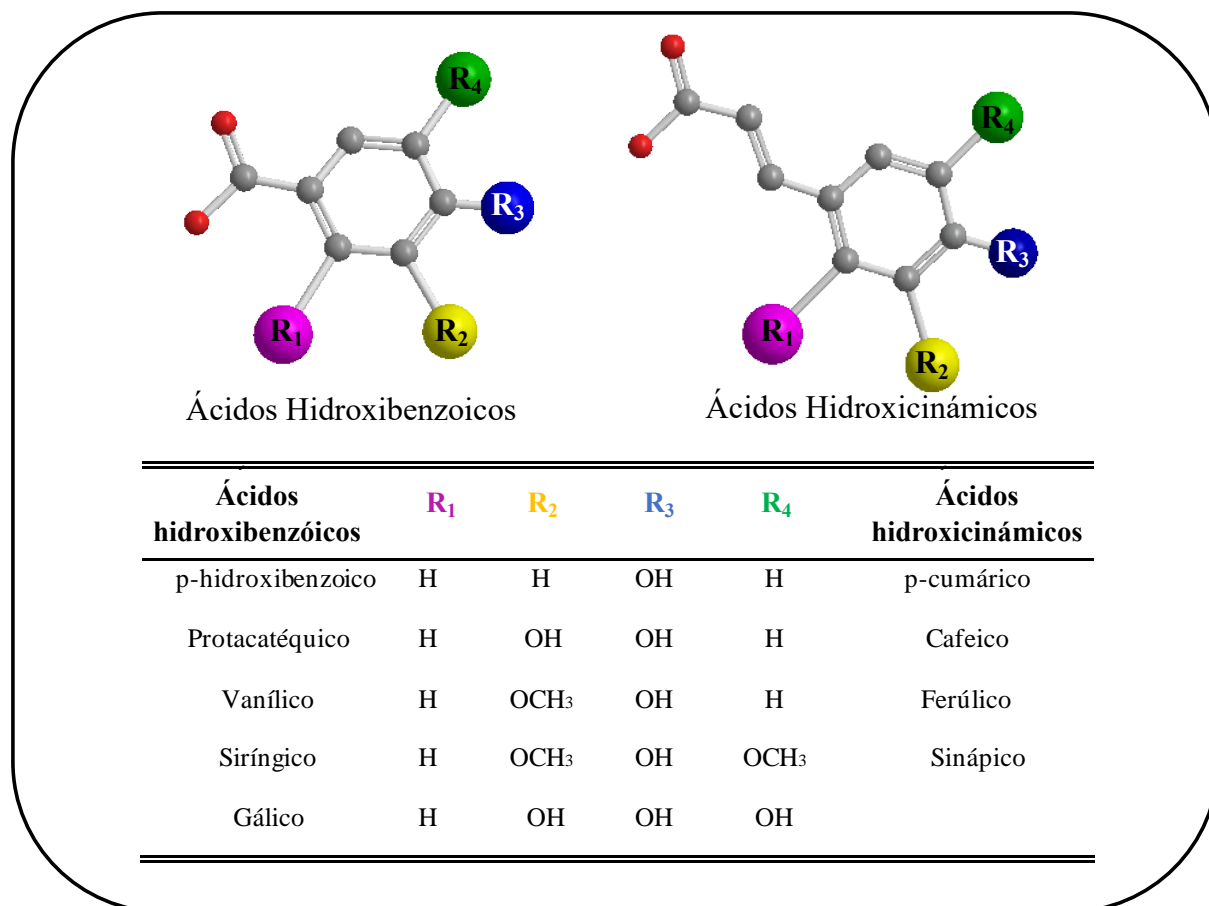


Figura 1.5: Estructura química de los principales ácidos fenólicos

Estos compuestos consisten en un anillo de benceno unido a un grupo carboxílico (ácidos benzoicos) o a un ácido propenoico (ácidos cinámicos). En muchas frutas y verduras, los compuestos derivados del ácido cinámico (especialmente el ácido caféico) están presentes como derivados del éster (ácido clorogénico) y muestran un alto potencial como antioxidantes (Sova, 2012). Los ácidos hidroxibenzoicos incluyen los ácidos gálicos, p-hidroxibenzoico, protocatéquico, vanílico y siríngico. Los ácidos hidroxicinámicos más importantes son el caféico, ferúlico, p-cumárico y sinápico (Abramovic, 2015).

Estilbenos

Los estilbenos (Figura 1.6) son compuestos fenólicos (Nunes, Rodrigues, Vinha, Alves, & Oliveira, 2018) que muestran dos anillos aromáticos unidos por un puente de etano, y existen en forma monomérica (resveratrol, oxyresveratrol) y oligomérica como oligómeros de

estilbenos (dímeros, trímeros o polímeros de resveratrol) u otros estilbenos. (piceida, astringina, etc.) (Charles, 2013). Los estilbenos son importantes debido a sus efectos beneficiosos para la salud.

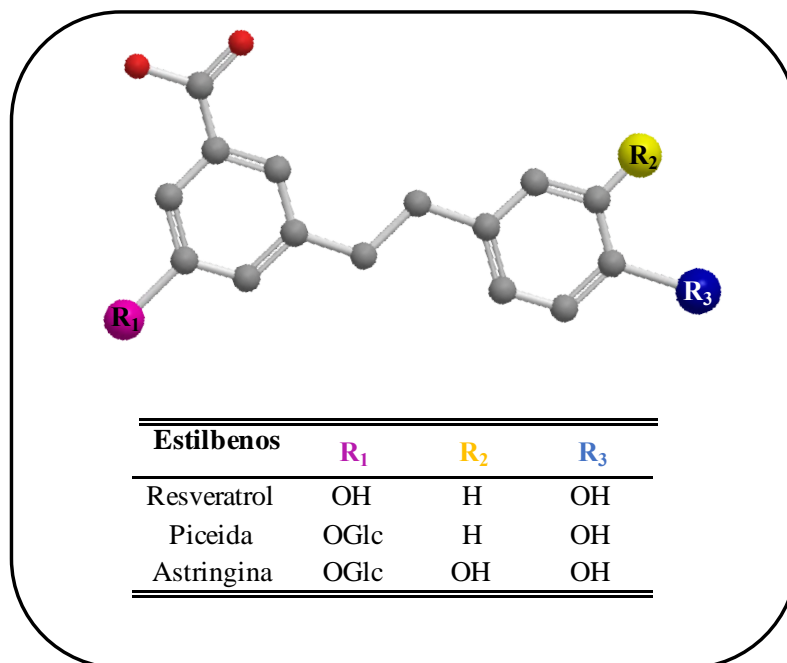


Figura 1.6: Estructura química de los principales estilbenos

Lignanos

Los lignanos (Figura 1.7) son un grupo de compuestos fenólicos, que se presentan en altas concentraciones en la linaza y otras semillas (Landete, 2011), raíces, hojas, frutos y partes leñosas de plantas vasculares (Ekiert, Szopa, Ekiert, Krzek, & Dzik, 2013) y granos (Gerstenmeyer, Reimer, Berghofer, Schwartz, & Sontag, 2013). Las estructuras de los lignanos están construidas en unidades C6-C3 (un esqueleto de propilbenceno) derivadas de unidades de cinamilo.

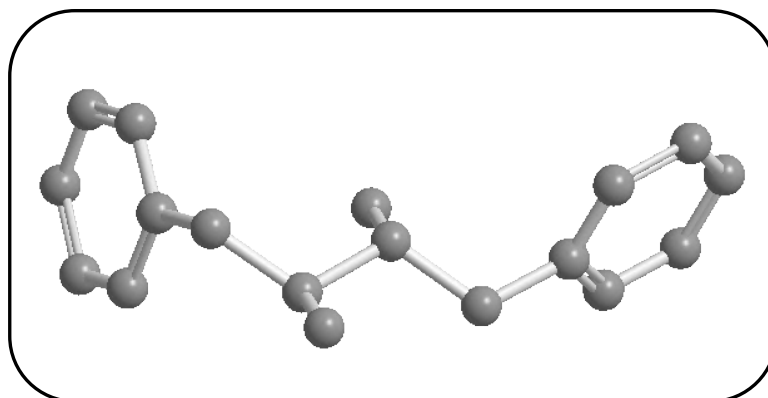


Figura 1.7: Estructura química genérica de los lignanos

b) Compuestos fenólicos flavonoides

Los compuestos fenólicos flavonoides comparten la misma estructura genérica (Figura 1.8): el núcleo de flavan, que consiste en dos anillos aromáticos (A y B) unidos por un anillo de pirano (C). Las diferencias en la ubicación del enlace del anillo B con el anillo C permiten diferenciar entre los flavonoides (2-fenilbenzopiranos), los isoflavonoides (3-fenilbenzopiranos) y los neoflavonoides (4-fenilbenzopiranos). El grupo 2-fenilbenzopirano, más abundante con diferencia, puede dividirse adicionalmente en 3-hidroxi flavonoides (flavonoles, flavanoles, antocianidinas, flavonoles) y flavonoides sin sustituyente en C₃ (flavononas y flavonas). Las flavonas difieren de las flavanonas por un doble enlace C₂-C₃ (Andersen & Jordheim, 2010).

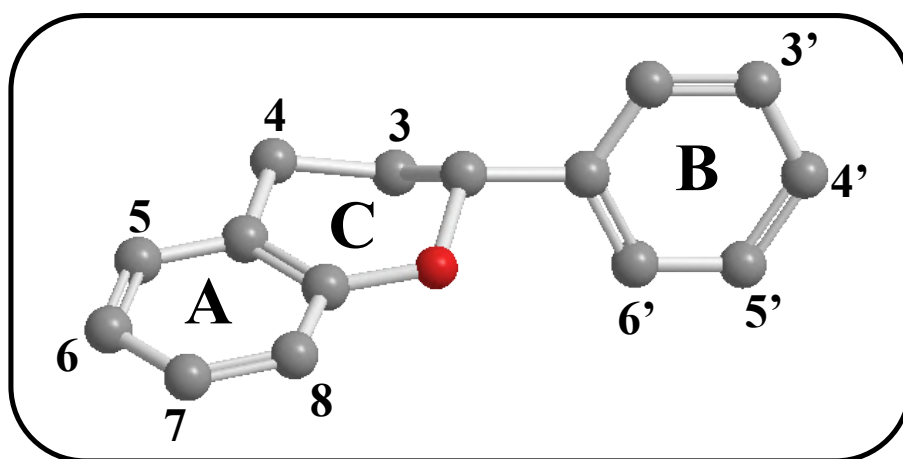


Figura 1.8: Estructura química genérica de los compuestos fenólicos flavonoides

Flavonoles

Los flavonoles (Figura 1.9) se identifican por la ubicación del grupo alcohol en el anillo C. En general, los restos de azúcares más frecuentes en los flavonoles son la glucosa, ramnosa, galactosa y arabinosa (Rahman, 2012). Los principales flavonoles de la dieta son la quercetina, miricetina, rutina, isoramnetina y kaempferol.

Uno de los flavonoles más importantes es la quercetina. La quercetina, 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona, está presente en frutas y verduras. En las hojas y otras partes de las plantas aparece como agliconas y glucósidos, en los cuales uno o más grupos de azúcares se unen a grupos fenólicos por un enlace glicosídico. En general, los glucósidos de quercetina contienen un grupo de azúcar en la posición 3, como por el ejemplo la rutina que presenta el disacárido rutinosa en dicha posición (Wach, Pyrzyńska, & Biesaga, 2007).

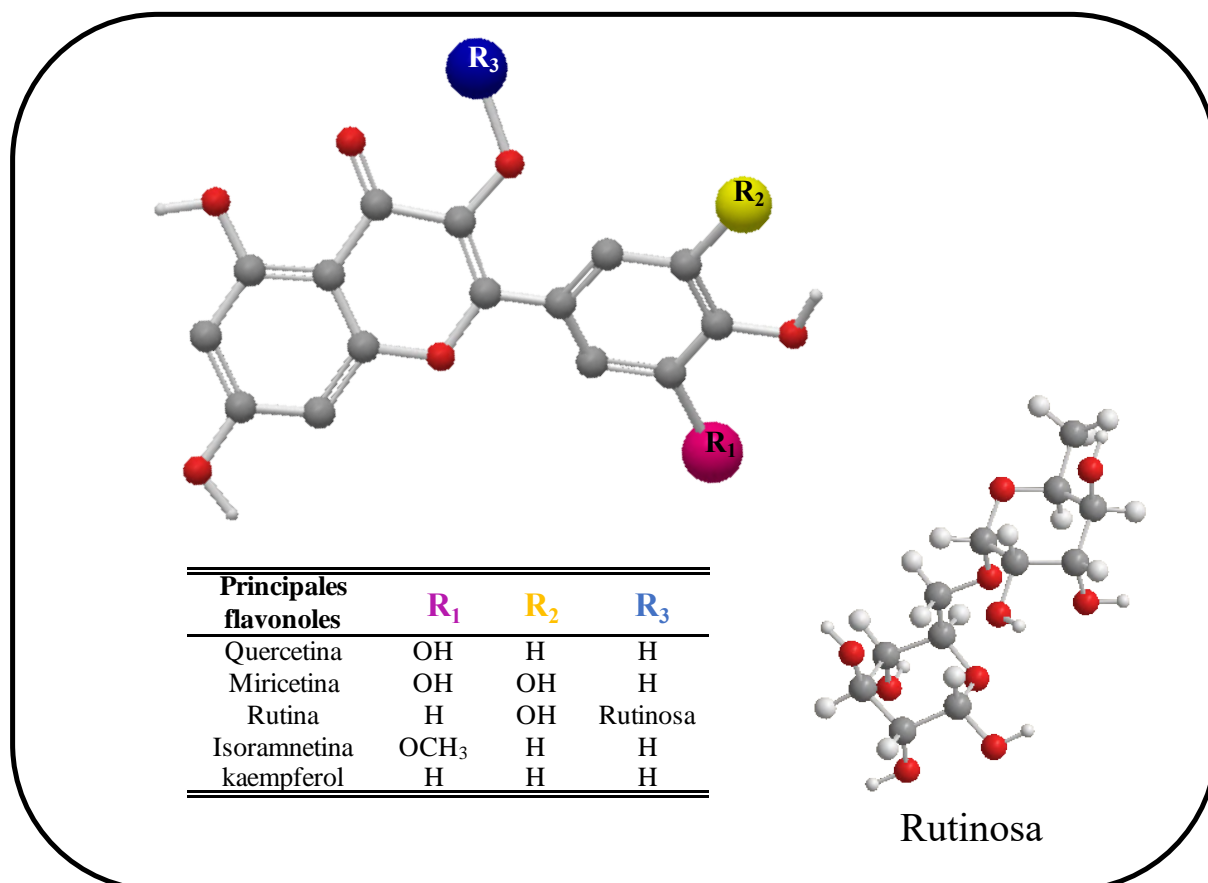


Figura 1.9: Estructura química de los principales flavonoles.

Flavanonoles y flavonas

Las flavonas y los flavanonoles (Figura 1.10) se caracterizan por la presencia de un enlace C₂-C₃ saturado y un átomo de oxígeno (grupo carbonilo) en la posición 4. Los flavanonoles difieren de las flavonas al tener un grupo hidroxilo en la posición 3 y a menudo se les llama 3-hidroxifononas o dihidroflavonoles (Shahidi & Naczki, 2004). Las flavonas se pueden encontrar en todas las partes de las plantas: tallo, hojas, brotes, corteza, duramen, espinas, raíces, rizomas, flores, frutos, semillas y también en los exudados o resinas de raíces y hojas (Singh, Kaur, & Silakari, 2014).

Flavonoles

Estos compuestos fenólicos representan la subfamilia más compleja de flavonoides, dado que pueden encontrarse como unidades monoméricas simples llamadas catequinas, o formando oligómeros y/o polímeros conocidos como taninos condensados.

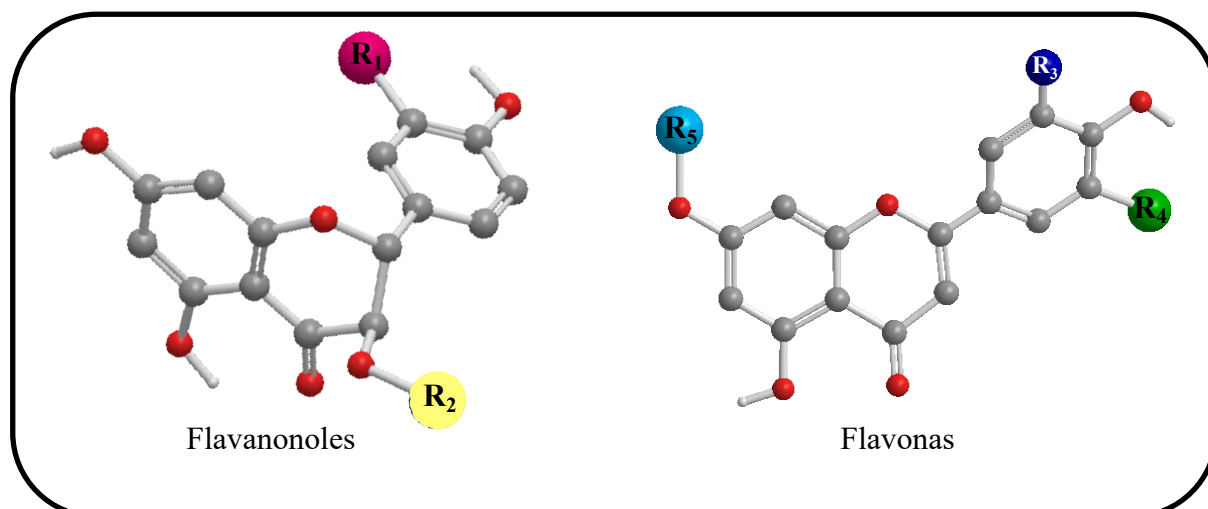


Figura 1.10: Estructura química genérica de los flavanonoles y flavonas

La estructura básica del grupo de las catequinas presenta dos carbonos quirales, lo que proporciona cuatro formas isoméricas ortohidroxiladas en las posiciones C₃' y C₄' del anillo B: la (+)/(-) catequina y la (+)/(-)-epicatequina. La presencia de un tercer grupo hidroxilo en el C₅' origina los flavanoles (+)/(-)-galocatequina y (+)/ (-)-epigalocatequina (Figura 1.11). Adicionalmente, estos monómeros pueden presentarse esterificados con ácido gálico en la posición C₃, dando lugar a los correspondientes 3-galatos.

De acuerdo con su estructura, los taninos pueden dividirse en dos clases de macromoléculas, denominadas taninos hidrolizables y taninos condensados. Los taninos hidrolizables tienen una masa molecular que oscila entre 500 y 5000 Da (Arapitsas, 2012). Además de su carácter astringente (Shahat & Marzouk, 2013), tienen una importante actividad antioxidante (Figuroa-Espinoza, Zafimahova, Alvarado, Dubreucq, & Poncet-Legrand, 2015). Los taninos condensados o proantocianidinas son polímeros de alto peso molecular con una masa molecular de hasta 30000 Da. Éstos se forman a partir del acoplamiento oxidativo de unidades flavanol entre las posiciones C₄ del heterociclo central (posición electrófila) y el C₆ y/o C₈ del monómero adyacente (posición nucleófila) (Sarni-Manchado & Cheynier, 2006). El término proantocianidina se refiere a la capacidad de los taninos condensados para transformarse en antocianidinas por calentamiento en medio ácido (reacción de Bate-Smith) a partir de la ruptura del enlace interflavánico.

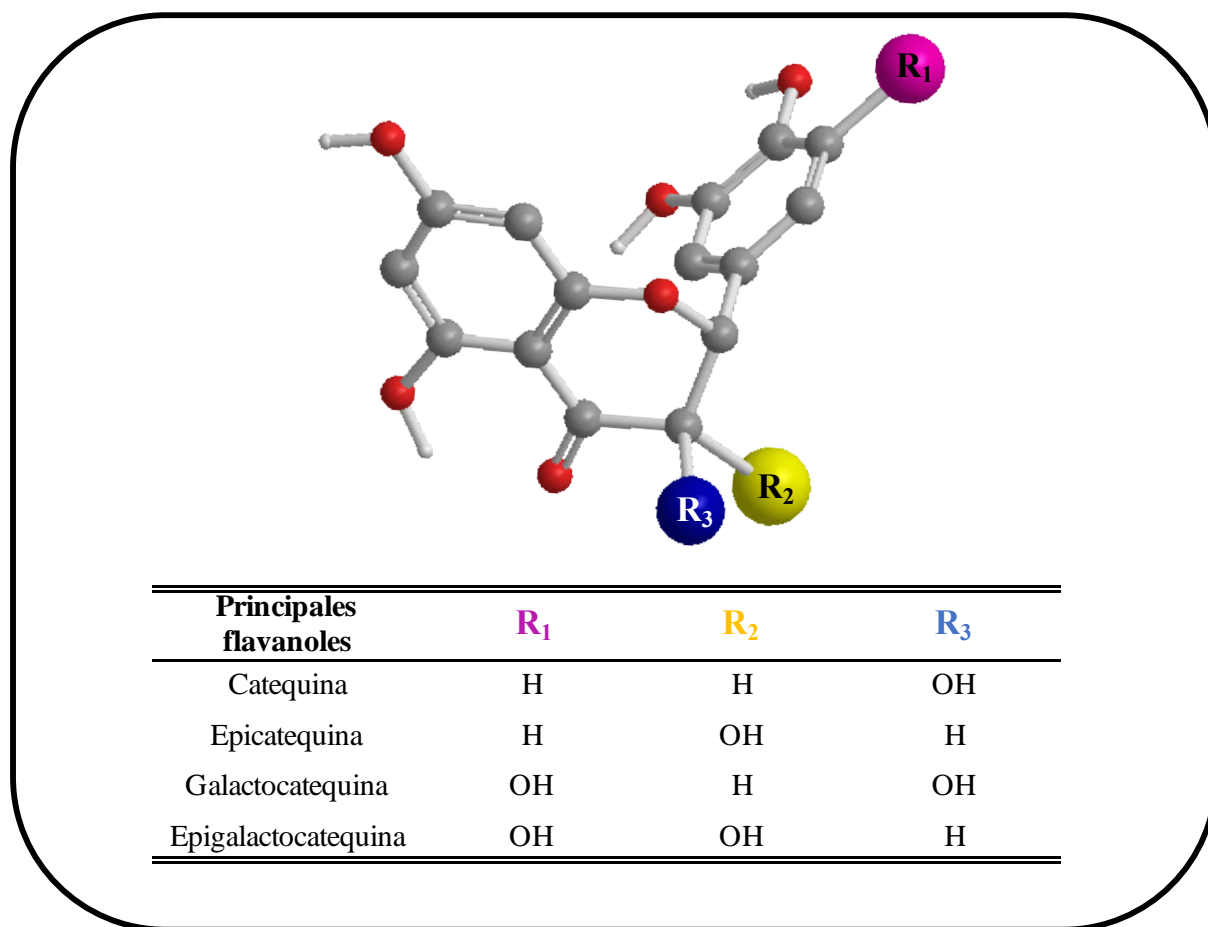


Figura 1.11: Estructura química de los principales flavanoles monoméricos

Flavanonas

Las flavanonas (Figura 1.12) abarcan una amplia gama de compuestos con sustituciones O y/o C en el anillo A o B, por ejemplo, hidroxilo, metoxi, metilendioxi, O y C-glucósido, C-metilo, C-bencilo, sustituyentes C-hidroximetilo, C-formilo, C-isoprenilo (incluidos los anillos de furano o dihidrofurano), conjugaciones con estilbeno, anastatina, ácido fenólico y diarilheptanoides.

Las flavanonas están presentes en aproximadamente 42 familias de plantas superiores, especialmente en *Compositae*, *Leguminosae* y *Rutaceae* (Iwashina, 2000). Dependiendo del tipo de planta, las flavanonas se pueden encontrar en todas las partes de la planta, desde la parte vegetativa hasta los órganos generativos: tallo, ramas, corteza, flores, hojas, raíces, rizomas, semillas, frutas, cáscaras, etc. Las concentraciones más altas de flavanonas se encuentran en la cáscara en comparación con la parte carnosa de los frutos cítricos (Nogata et al., 2006). Entre las flavanonas, las agliconas de naringenina y hesperetina y sus glucósidos tienen un particular interés debido a su alta prevalencia en los alimentos.

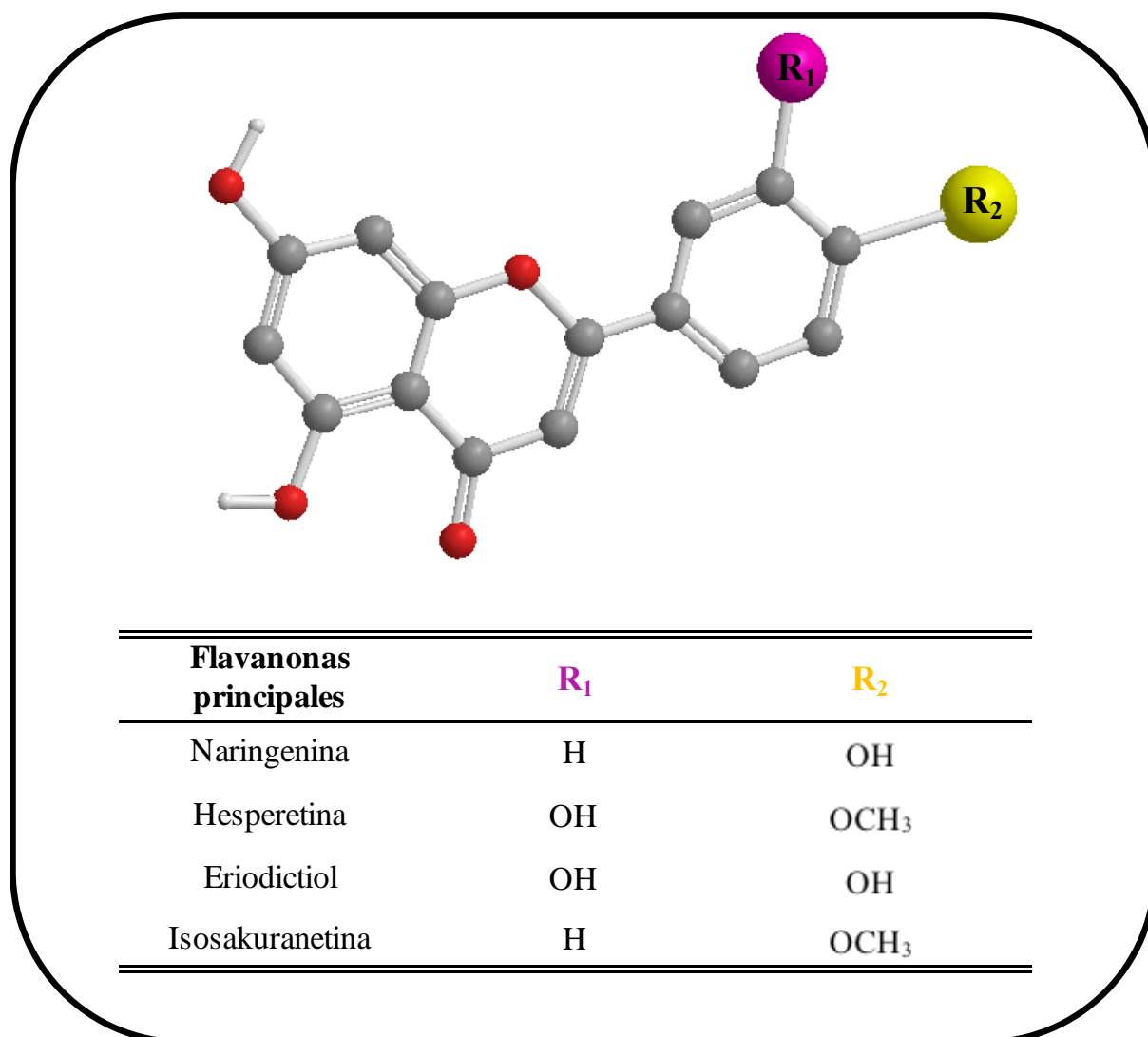


Figura 1.12: Estructura química de las principales flavanonas

Antocianidinas

Las antocianinas son uno de los grupos de pigmentos responsables del color en algunas frutas y flores (Cavalcanti, Santos, & Meireles, 2011; Zhang et al., 2015). Las antocianidinas (Figura 1.13) cuando se unen a una o más unidades glicosídicas se denominan antocianinas.

Las antocianidinas están unidas a una o más unidades glicosídicas, que son polihidroxiglicosiladas y polimetoxidasivados de sales de 2-fenilbenzopirilio. Las unidades glicosídicas pueden estar unidas a la antocianidina por enlaces α o β , y siempre en la posición 3 del aglicón. Cuando hay azúcares adicionales presentes en la molécula de antocianina, se unen a las posiciones 5 y 7, y con menor frecuencia a 3' y 5'. Los azúcares encontrados en las antocianinas pueden ser hexosas (glucosa y galactosa) y pentosas (xilosa, arabinosa) (Osorio et al., 2012). Las moléculas de antocianina son inestables y se degradan fácilmente (Reque et al.,

2014) debido al efecto de altas temperaturas y pH, y con la presencia de luz, oxígeno, disolventes, iones metálicos, ácido ascórbico, sulfito y enzimas (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez, & Galán-Vidal, 2009; Cavalcanti et al., 2011).

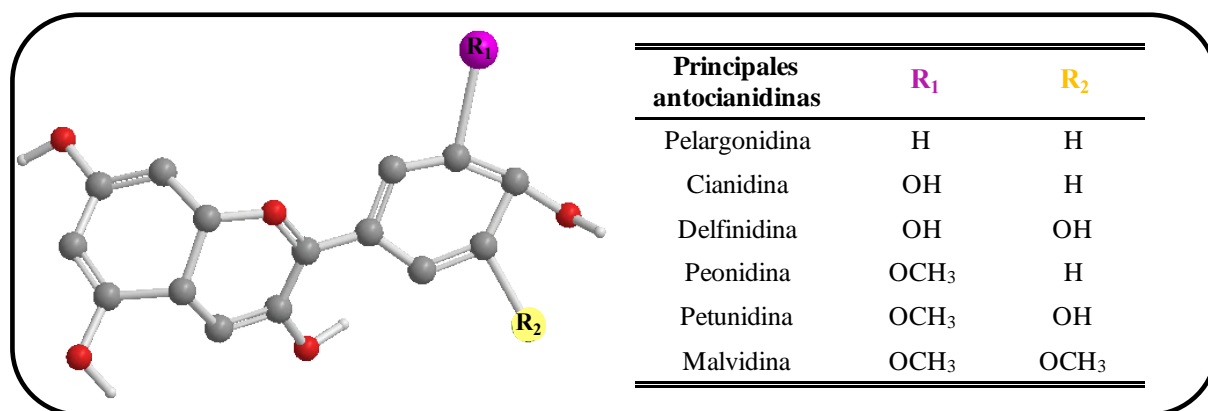


Figura 1.13: Estructura química de las principales antocianidinas

Isoflavonoides

Los isoflavonoides (Figura 1.14) son un grupo de compuestos heterociclos de oxígeno que pertenecen a la familia de los fitoestrógenos (Xiao, Cao, Wang, Zhao, & Wei, 2009). Los isoflavonoides más comunes son la daidzeína, la genisteína y la gliciteína (Herrera et al., 2015), que se producen en las legumbres, especialmente en la soja (Balisteiro, Rombaldi, & Genovese, 2013), y en las plantas aparecen de forma glicosidada.

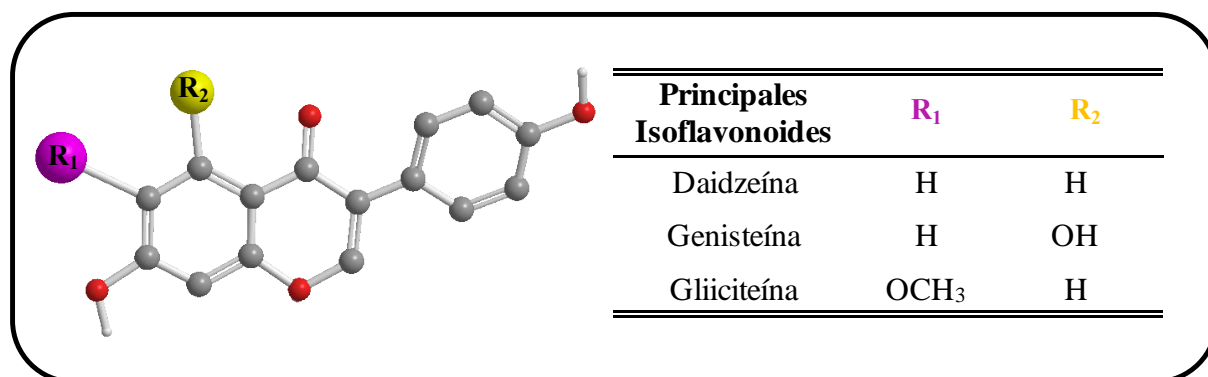


Figura 1.14: Estructura química de los principales isoflavonoides

c) Interés de los compuestos antioxidantes a nivel industrial

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas del deterioro de la calidad de los alimentos y de la generación de malos olores y sabores; provoca la alteración de la textura y el color, y disminuye tanto su valor nutricional como vida útil (Alamed, Chaiyasit, McClements, & Decker, 2009). Se han desarrollado numerosos métodos de control de la velocidad y alcance de la oxidación de los lípidos en los alimentos, pero la adición de

antioxidantes es uno de los más efectivos. Los antioxidantes se han convertido en un grupo indispensable de aditivos alimentarios principalmente debido a su capacidad de prolongar la vida útil de los productos alimenticios sin ningún efecto adverso en sus cualidades sensoriales o nutricionales, tanto que según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), “los antioxidantes son sustancias que se utilizan para conservar los alimentos al retardar el deterioro, la rancidez o la decoloración debido a la oxidación por radicales libres” (Shahidi, Janitha, & Wanasundara, 1992). Los antioxidantes para uso en sistemas alimentarios deben ser baratos, inocuos y efectivos en bajas concentraciones; no deben tener olor, sabor o color propio; deben ser fáciles de incorporar y tener una buena solubilidad en el producto al que tienen que ser incorporados (Kiokias, Varzakas, & Oreopoulou, 2008).

Se ha demostrado que los compuestos fenólicos contribuyen a la mejora del color, sabor, aroma y estabilidad oxidativa del producto (Naczka & Shahidi, 2004). Concretamente, los antocianos se utilizan como colorantes alimentarios naturales, dada su elevada solubilidad en agua y la amplia gama de colores que pueden proporcionar en función del pH del alimento (Bordignon-Luiz, Gauche, Gris, & Falcão, 2007; Lapornik, Prošek, & Golc Wondra, 2005).

Por otra parte, debido a la creciente preocupación de los consumidores sobre la posible toxicidad de los antioxidantes sintéticos incorporados a los alimentos para prevenir su oxidación durante el almacenamiento y/o procesado, son numerosos los estudios que promueven la sustitución de los mismos por compuestos fenólicos de origen vegetal como antioxidantes naturales saludables (Babbar, Oberoi, Uppal, & Patil, 2011).

1.3.2. Procesos de extracción sólido-líquido

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 (Grigoras, Destandau, Lazar, & Elfakir, 2012). En las últimas décadas, este proceso juega un papel determinante en el aislamiento de compuestos antioxidantes de origen vegetal para su posterior utilización en la preparación de suplementos dietéticos o nutracéuticos, ingredientes funcionales y/o aditivos para productos alimentarios, farmacéuticos o cosméticos (Cacace & Mazza, 2003).

1.3.2.1. Fundamentos

La extracción sólido-líquido es un proceso controlado por la transferencia de materia mediante el cual el compuesto de interés pasa desde la matriz del alimento (sólido) hasta el seno

de la fase líquida. Dicho transporte tiene lugar en dos etapas: una primera etapa de lavado, en la que se produce una rápida transferencia del compuesto de interés (solute) desde la superficie del sólido al disolvente; y una segunda etapa más lenta de transferencia del soluto desde el interior del sólido principalmente mediante difusión (Sturzoiu, Stroescu, Guzun, & Dobre, 2011). En la mayoría de sistemas de extracción de la industria alimentaria, puede asumirse que la segunda etapa es el paso limitante del proceso (Cacace & Mazza, 2003; Hojnik, Škerget, & Knez, 2008), 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 (Cissé et al., 2012). Como consecuencia de esta resistencia natural, el proceso de extracción sólido-líquido es lento, poco eficiente y presenta un elevado consumo de disolvente, lo que dificulta su uso a nivel industrial (Shirsath, Sonawane, & Gogate, 2012; Virot, Tomao, Le Bourvellec, Renard, & Chemat, 2010).

No existe una metodología estandarizada y aplicable a la recuperación de todos los compuestos bioactivos de interés ya que el proceso de extracción sólido-líquido es una operación heterogénea y multicomponente (Naczk & Shahidi, 2004), cuyo rendimiento es función de las condiciones de operación, del disolvente utilizado, de la materia prima ~~de partida~~ y de las características hidrófilas o lipófilas de los compuestos que se desea extraer (Grigoras et al., 2012).

Como consecuencia de la investigación e innovación tecnológica en este campo, en las últimas décadas se han desarrollado toda una serie de técnicas de carácter más eficiente que la extracción convencional para mejorar la recuperación de compuestos bioactivos presentes en los tejidos de origen vegetal (He et al., 2016). Entre estas técnicas cabe mencionar la extracción asistida por microondas o por ultrasonidos de potencia, la extracción con fluidos supercríticos o la extracción acelerada con disolventes presurizados, entre otras (Bimakr, Ganjloo, & Noroozi, 2019; Gadjalova & Mihaylova, 2019; Palsikowski, Besen, Santos, da Silva, & da Silva, 2019; Varghese & Pare, 2019). Todas estas metodologías se caracterizan por acortar el tiempo de extracción, reducir el consumo de disolvente y energía, incrementar el rendimiento del proceso y mejorar la calidad de los extractos (Wang & Weller, 2006).

De entre ellas, la extracción asistida por ultrasonidos de potencia es una de las técnicas más ampliamente utilizada tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial, debido a su efectividad y a que su equipamiento es relativamente barato y fácil de utilizar (Cheung, Siu, & Wu, 2013). Además, los ultrasonidos pueden ser utilizados prácticamente con cualquier

disolvente y permiten la extracción de compuestos termolábiles a temperaturas bajas o moderadas (Wang & Weller, 2006).

1.3.2.2. 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 (Robles-Ozuna & Ochoa-Martínez, 2012).

Las ondas acústicas pueden clasificarse en función de su frecuencia (Figura 1.15), denominándose ondas subsónicas aquéllas que se encuentran por debajo de los 20 Hz; ondas sónicas, las que presentan frecuencias comprendidas entre 20 Hz y 20 kHz, rango que aproximadamente delimita el campo de audición humano; y ondas ultrasónicas o ultrasonidos, que son aquéllas que superan los 20 kHz de frecuencia (Povey & Mason, 1998).

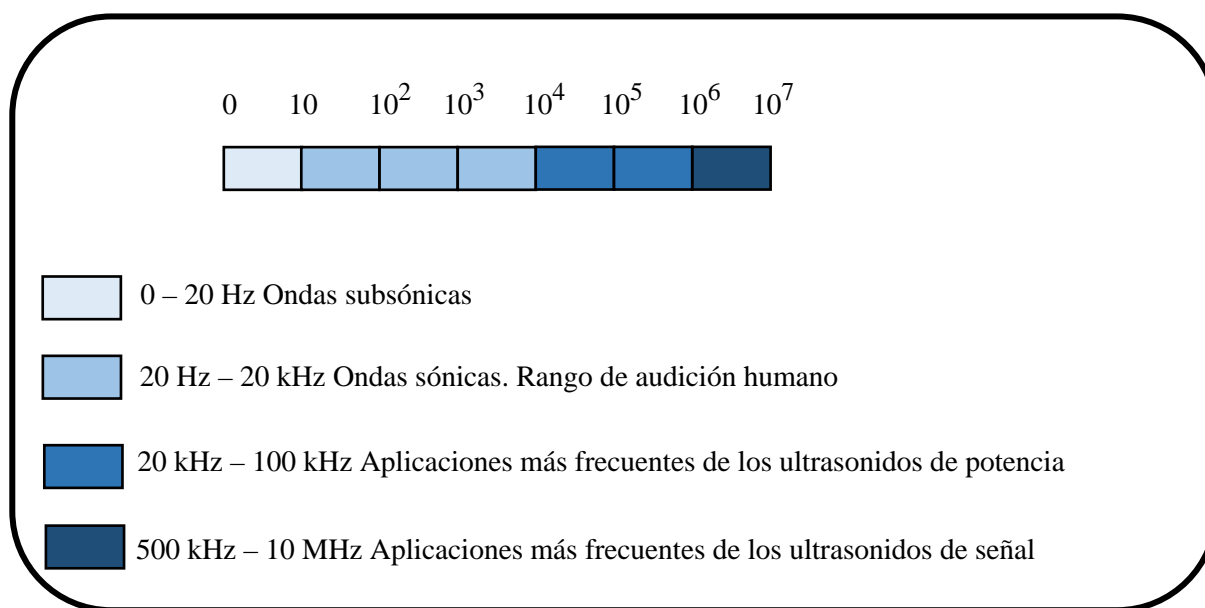


Figura 1.15: Clasificación de las ondas acústicas en función de la frecuencia

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 físicos, mecánicos, químicos y/o bioquímicos en el sistema. De ahí, su uso en el control de procesos y en el análisis no invasivo de materiales. Ejemplos de ello serían la imagen médica, los sondeos

submarinos o la monitorización de la composición y/o propiedades de los alimentos durante su procesado y/o almacenamiento (Robles-Ozuna & Ochoa-Martínez, 2012). Estas aplicaciones diagnósticas se basan en el estudio de la variación de las propiedades de las ondas acústicas (velocidad, atenuación) a su paso por un medio físico concreto (Cárcel, García-Pérez, Benedito, & Mulet, 2012).

Por otra parte, se definen los ultrasonidos de potencia, 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, Moharram, Shaltout, Asker, & Youssef, 2012).

Al igual que cualquier tipo de onda, los ultrasonidos se caracterizan por una serie de parámetros, entre los que destacan principalmente la frecuencia, la intensidad y potencia acústicas, y la atenuación (García-Pérez, 2007). La frecuencia (Hz) se define como el número de vibraciones o ciclos completados por la onda por unidad de tiempo. Por su parte, se entiende por intensidad de una onda acústica (W/m²), la energía media transmitida por unidad de tiempo a través de la unidad de área perpendicular a la dirección de propagación de la onda. La potencia acústica (W) es la energía total irradiada por la fuente ultrasónica por unidad de tiempo, y puede calcularse a partir de la intensidad acústica y el área de la superficie radiante. Por último, la atenuación se define como la disminución de la intensidad de la onda durante su propagación por un medio, al aumentar la distancia a la fuente que la produce. Este fenómeno puede ser consecuencia de la reflexión, dispersión y/o difracción de la onda, así como de la conversión de parte de la energía cinética en calor.

Los efectos atribuidos a los ultrasonidos de potencia pueden ser muy diferentes en función del medio físico sobre el que se apliquen (Cárcel et al., 2012). En el caso de medios líquidos, la mayoría de los efectos están asociados al fenómeno de cavitación, que consiste en la formación, crecimiento e implosión de nano y/o 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; Virot et al., 2010). 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 los ciclos de compresión, los ultrasonidos ejercen una

presión positiva sobre el líquido y las moléculas tienden a aproximarse. Mientras que, durante los ciclos de descompresión, se produce el efecto contrario, generándose una presión negativa que tiende a separar las moléculas. Alcanzado un cierto umbral de intensidad ultrasónica, la disminución de presión durante el ciclo de descompresión puede vencer las fuerzas de atracción entre moléculas vecinas, pudiendo aparecer cavidades en el seno del líquido a partir de núcleos de gas preexistentes (Esclapez, García-Pérez, Mulet, & Cárcel, 2011).

El intercambio de gas entre el líquido y las burbujas de cavitación es proporcional al área de transferencia. Durante los ciclos de descompresión o presión negativa, el flujo de gas se produce desde el líquido hacia la burbuja, haciendo que ésta se expanda. No obstante, durante el ciclo de compresión o presión positiva, el flujo de gas tiene lugar en dirección opuesta y la burbuja se contrae. Si el flujo de gas del sistema burbuja-líquido es similar en ambas direcciones, las oscilaciones de tamaño son regulares, apareciendo la denominada cavitación estable. Ésta suele darse cuando la intensidad ultrasónica no es muy elevada y/o cuando las ondas acústicas son de frecuencia alta. No obstante, bajo condiciones de elevada intensidad y baja frecuencia ultrasónicas, la cantidad de gas que gana la burbuja en el ciclo de expansión es mayor que la pérdida durante el ciclo de compresión, apareciendo la cavitación transitoria. En ella, la burbuja crece progresivamente en cada ciclo (Figura 1.16) hasta que, alcanzado el tamaño crítico en resonancia con la frecuencia ultrasónica aplicada, la burbuja implosiona (Cárcel, 2003; Patist & Bates, 2008). Ello genera un punto localizado de elevada energía, donde se estima que las condiciones de presión pueden alcanzar valores de 1000 atm (Bhaskaracharya, Kentish, & Ashokkumar, 2009).

Además, la implosión de las burbujas de cavitación provoca un gran número de efectos mecánicos en el sistema, tales como microcorrientes, turbulencia y colisiones intermoleculares a alta velocidad (Shirsath et al., 2012). Adicionalmente, en el caso de sistemas sólido-líquido, tiene lugar la formación de microinyecciones (Figura 1.17) como consecuencia de la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación en posiciones cercanas a la interfase sólido-líquido. Las microinyecciones pueden alterar de forma significativa las características y estructura del sólido, pues pueden provocar el descamado y erosión de su superficie, así como la formación de microfisuras, con la consecuente dispersión de partículas, el descubrimiento de nuevas superficies activas y el incremento de transferencia de materia entre las dos fases (Vilkhu, Mawson, Simons, & Bates, 2008; Ye, Feng, Xiong, & Xiong, 2011).

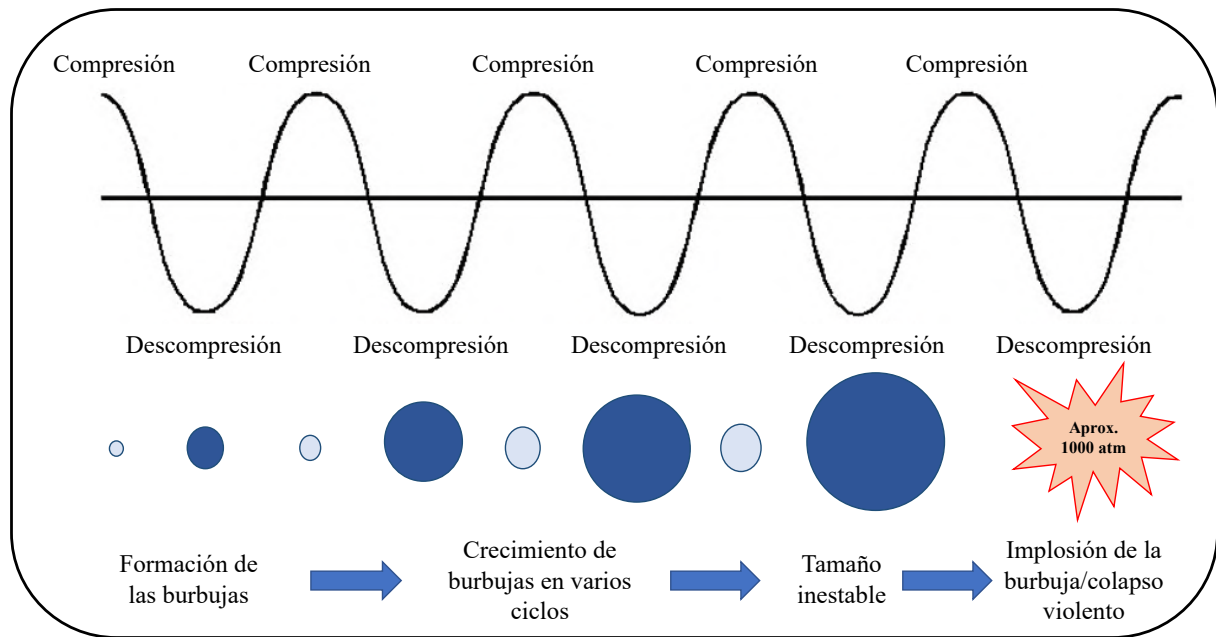


Figura 1.16: Crecimiento de las burbujas de cavitación en el seno de un líquido sobre el que se aplican ultrasonidos de potencia (Cárcel, 2003).

La intensidad de la cavitación, así como sus efectos, depende de las características del medio y de las variables del proceso (frecuencia e intensidad ultrasónicas y temperatura) (Cárcel et al., 2012).

El equipo necesario para la aplicación de ultrasonidos de potencia está constituido por tres elementos fundamentales: un generador, un transductor y un emisor (García-Pérez, 2007). El generador transforma la señal eléctrica de la red a la frecuencia deseada. El transductor, que suele ser un cuerpo vibrante, es la fuente que genera los ultrasonidos a partir de la señal eléctrica de alta frecuencia que recibe del generador. El emisor, por su parte, es el elemento que transmite la energía acústica generada por el transductor al medio que se desea tratar (Patist & Bates, 2008).

Entre los equipos de aplicación de ultrasonidos en medio líquido destacan principalmente los baños y los sistemas tipo sonda. Los baños de ultrasonidos son posiblemente los sistemas de aplicación de ultrasonidos de potencia más utilizados, debido a que se trata de equipos simples, compactos y económicos, con los transductores colocados en la base del recipiente y con el sistema de generación-emisión incluido en el mismo. Sus principales limitaciones son la poca potencia que, comparados con otros sistemas, suministran al medio; la dificultad en el control de temperatura; y la variación de la intensidad ultrasónica en función de la posición dentro del baño. En los equipos tipo sonda, se utiliza una sonda metálica como emisor del sistema para aplicar al medio líquido la vibración generada por el transductor. El

material utilizado para su fabricación debe tener una alta resistencia a la erosión que provoca el fenómeno de cavitación.

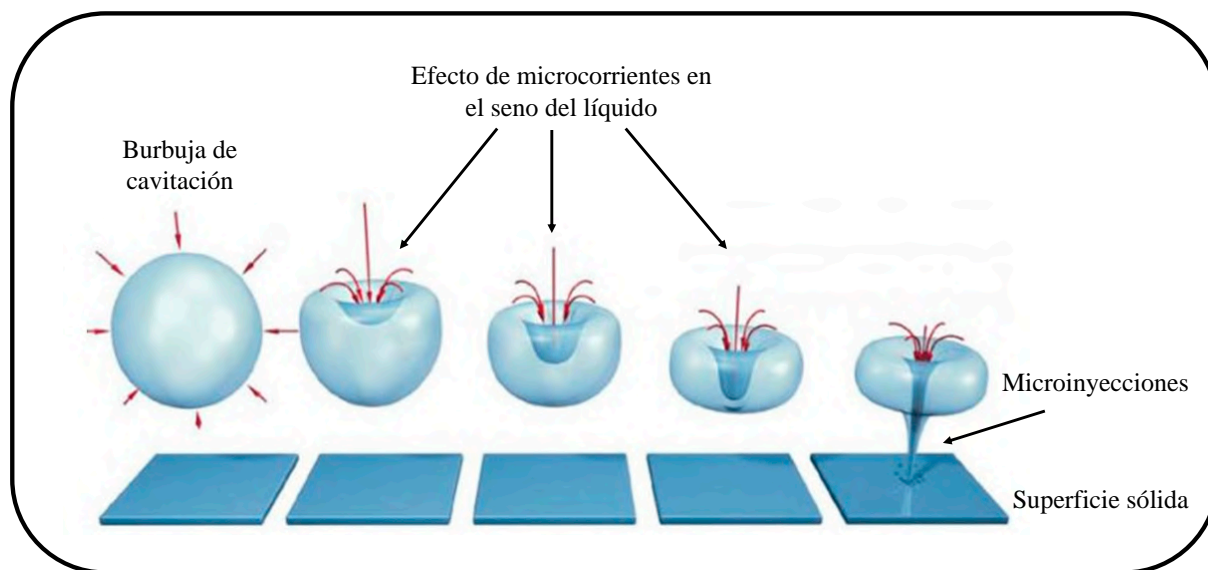


Figura 1.17: Formación de microinyecciones en una interfase sólido-líquido como consecuencia del fenómeno de cavitación producido por la aplicación de ultrasonidos de potencia (González-Centeno, 2013).

Al propagarse los ultrasonidos por un medio, se transmite energía acústica que puede ser disipada en forma de calor debido a los rozamientos producidos entre moléculas y al trabajo realizado al desplazarlas en un medio sujeto a fuerzas de cohesión contrarias al desplazamiento de las mismas (García-Pérez, 2007). La absorción de los ultrasonidos y, consecuentemente, el calentamiento del medio depende de las características viscosas del mismo, así como de la frecuencia y potencia ultrasónicas aplicadas (Cárcel, 2003).

Otro aspecto importante es la caracterización de la intensidad del campo acústico que realmente actúa sobre el sistema, dado que la potencia nominal del equipo no se corresponde con su potencia real de trabajo. Los métodos calorimétricos, basados en la medida de la generación de calor que se produce en un medio al aplicar ultrasonidos, son los más utilizados.

1.2.2.3. Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos asistida acústicamente

Una de las aplicaciones más importantes de los ultrasonidos de potencia en la industria alimentaria es la intensificación de procesos de extracción sólido-líquido para la obtención de componentes bioactivos de origen vegetal (Vilkhu et al., 2008).

La extracción convencional presenta ciertas limitaciones en cuanto al tiempo y temperatura de trabajo, el consumo de energía y el volumen de disolvente utilizado. La aplicación de ultrasonidos de potencia permite, en muchos casos, mejorar el proceso y también

acelerarlo, gracias a los efectos derivados del fenómeno de cavitación (Esclapez et al., 2011). Según Mason et al. (2011), son cuatro los mecanismos interconectados a través de los cuales los ultrasonidos de potencia incrementan la eficacia del proceso de extracción sólido-líquido:

- Rotura de las paredes celulares: como consecuencia de la formación de microinyecciones a raíz de la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación en la zona próxima a la interfase sólido-líquido. La rotura de las paredes celulares aumenta la permeabilidad del tejido vegetal, libera el material intracelular y reduce el tamaño de partícula, incrementando progresivamente la superficie sólida en contacto con el disolvente de extracción.
- Incremento de la solubilidad de los analitos: provocada por el incremento localizado de la temperatura en la zona de implosión de las burbujas de cavitación.
- Mejora de la penetración del disolvente en la matriz del soluto: como consecuencia del aumento localizado de presión, así como de la rotura y erosión de la superficie, originadas por las microinyecciones, se mejora la penetración del disolvente en la matriz del sólido.
- Mejora de la difusión: gracias a que los ultrasonidos provocan microcorrientes que favorecen la continua renovación de la capa de disolvente en contacto con la superficie del sólido.

La conjunción de todos estos cuatro sucesos da lugar al incremento de la transferencia de materia desde la matriz del sólido vegetal hasta el seno del disolvente, al mismo tiempo que permite, con respecto a la extracción convencional, trabajar a temperaturas inferiores y reducir el tiempo del proceso.

La influencia de variables tales como el tipo de disolvente (Dranca & Oroian, 2016; Grigoras et al., 2012; Heleno et al., 2016), la temperatura de trabajo (González-Centeno, Comas-Serra, Femenia, Rosselló, & Simal, 2015; Machmudah et al., 2012; Um, Han, & Lee, 2018), el tamaño de partícula (Aguiló-Aguayo, Walton, Viñas, & Tiwari, 2017; Khan, Abert-Vian, Fabiano-Tixier, Dangles, & Chemat, 2010; XuJie & Wei, 2008) o el ratio sólido-líquido (Cissé et al., 2012; Moorthy, Maran, Surya, Naganyashree, & Shivamathi, 2015; Xu et al., 2014), han sido las más estudiadas en procesos acústicos de extracción. El trabajo realizado por Heleno et al. (2016) evaluó el efecto del disolvente de extracción (etanol, hexano y limoneno) en la extracción de ergosterol asistida por ultrasonidos de potencia de la matriz *Agarius*

bisporus. El estudio concluyó que el tipo de disolvente utilizado en el proceso de extracción afectó significativamente en el rendimiento de extracción, obteniendo un mayor rendimiento de extracción de ergosterol utilizando etanol como disolvente. Um et al. (2018) evaluaron el efecto de la temperatura (30, 40 y 50 °C) en el proceso de extracción acústica de compuestos antioxidantes de rosa china (*rugose rose*) mediante la determinación del contenido total en polifenoles y flavonoides y la actividad antioxidante. Este estudio concluyó que la temperatura de extracción afectó significativamente en la extracción de compuestos antioxidantes, siendo 40 °C la temperatura de extracción óptima. El estudio realizado por Aguiló-Aguayo et al. (2017) evaluó el efecto del tamaño de partícula (>450, 355-250, 150-120 y <90 µm) en la extracción de β-glucanos de subproductos de champiñón. Observaron que el tamaño de partícula afectó significativamente en el rendimiento de extracción de β-glucanos, siendo el intervalo de tamaño de partícula 355-250 µm con el que se obtuvo un mayor rendimiento de extracción. Finalmente, Xu et al. (2014) evaluaron el efecto del ratio sólido-líquido sobre la extracción acústica de pectinas de la piel de uva. Se evaluaron cinco ratios sólido-líquido (1/30, 1/40, 1/50, 1/60 y 1/70), concluyendo que dicho parámetro fue determinante en el proceso de extracción de pectinas y observaron que los rendimientos más elevados se obtuvieron con las ratios 1/50, 1/60 y 1/70 sin diferencias significativas entre ellos.

1.4. Procesado de alimentos

Los métodos de conservación implican operaciones a las que se somete el alimento con el objetivo de aumentar la vida útil y seguridad de los alimentos para su consumo. Los métodos más comúnmente utilizados para la conservación de alimentos se basan en tratamientos térmicos mediante aplicación de frío o calor.

1.4.1. Congelación

La congelación es una operación unitaria en la que la temperatura del alimento se reduce por debajo de su punto de congelación, con lo que una proporción del agua que contiene cambia de estado formando cristales de hielo.

Fundamentos

La inmovilización del agua en forma de hielo y el aumento de la concentración de los solutos en el agua no congelada reduce la actividad de agua del alimento. La conservación por congelación se consigue, por tanto, por un efecto combinado de bajas temperaturas y reducción de la actividad de agua (Fellows & Trepatt, 1993). En la literatura se acepta que un proceso

rápido de congelación preserva mejor la microestructura, ya que induce la generación de un gran número de pequeños cristales de hielo que causan menor rotura de las paredes celulares, y por consiguiente un menor deterioro de la textura (Brown, 1977; Chassagne-Berces et al., 2009; Delgado & Rubiolo, 2005; Marti & Aguilera, 1991). Sin embargo, una velocidad de congelación demasiado rápida puede provocar la rotura del producto debido a las diferencias de densidad del hielo con el agua que pueden alterar la textura.

Efecto sobre los alimentos

El principal efecto de la congelación sobre la calidad de los alimentos es el daño celular ocasionado por el crecimiento de los cristales de hielo (Chassagne-Berces et al., 2009; Delgado & Rubiolo, 2005; Fellows & Trepat, 1993). Los cambios físicos que se producen en los cristales de hielo (por ejemplo: cambios de forma, tamaño y orientación) conocidos en su conjunto como recristalización, son responsables en gran medida de la pérdida de calidad de los alimentos congelados. Los daños celulares provocados por la congelación y la recristalización dan lugar a una pérdida de componentes celulares, que se manifiesta durante la descongelación como un exudado, que contiene diversos nutrientes hidrosolubles (Flerchinger et al., 2004).

Los cambios que sufren los tejidos animales o vegetales debidos a la congelación son muy diversos. Las carnes, por ejemplo, poseen una estructura fibrosa y durante la congelación, en lugar de romperse, las fibras se separan, por lo que su textura no se ve prácticamente modificada. Sin embargo, como la estructura celular de las frutas y verduras es más rígida, los efectos de la formación de los cristales de hielo suelen ser mayores. La intensidad de estos efectos depende del tamaño de los cristales, y, por tanto, de la velocidad de transferencia de calor. En la bibliografía se encuentran estudios donde se observó que la calidad de las frutas congeladas y posteriormente descongeladas depende del tipo de fruta (Sousa, Canet, Alvarez, & Fernández, 2007), la variedad (González, de Ancos, & Cano, 2002), la calidad inicial y el estado de maduración (Chassagne-Berces, Fonseca, Citeau, & Marin, 2010) o el tiempo que transcurre entre la cosecha y el procesado (Phan & Mimault, 1980).

Asimismo, para explicar los cambios que se producen en la estructura de los alimentos debidos a la congelación, es muy importante conocer en qué forma se encuentra el agua en los tejidos. Por una parte, el agua ligada a proteínas, lipoproteínas, etc., no sufre cambios durante la congelación y por otra parte el agua retenida en las estructuras celulares o intracelulares es la que se transforma en cristales de hielo durante el proceso de congelación. La Figura 1.18 ilustra el efecto de la velocidad de congelación sobre los tejidos vegetales. Cuando el proceso

de congelación tiene lugar a velocidades bajas (<2 °C/min), el agua retenida se congela formando cristales grandes. El agua retenida puede encontrarse en el interior de las células y en los espacios intercelulares. El agua presente en los espacios intercelulares tiene una concentración en nutrientes menor que la presente en el interior de la célula, y por ello congela antes haciendo que el fluido extracelular se concentre en nutrientes, lo que provoca una salida de agua de las células circundantes para compensar ese aumento de concentración. Este proceso da lugar a contracción de las células, deshidratación y desnaturalización de las proteínas contenidas en ellas, así como a roturas de la membrana celular, etc. En resumen, en un proceso de congelación lenta tiene lugar la rotura de la estructura celular de los alimentos de manera que durante la descongelación las células son incapaces de recuperar su forma y turgencia originales y como consecuencia, el alimento se reblandece y el material celular se pierde formando un exudado. Sin embargo, en procesos de congelación a velocidades más elevadas (>20 °C/min) (congelación rápida), los cristales de hielo que se forman son de menor tamaño, tanto en el interior de la célula como en los espacios intercelulares, por lo que la estructura celular resulta menos dañada. Además, se producen escasas diferencias en la presión de vapor entre los cristales de hielo y las diferentes zonas de la célula, por lo que la deshidratación celular es mínima. Por todo ello, la textura del alimento resulta menos afectada. No obstante, velocidades de congelación muy elevadas pueden provocar, en algunos alimentos, tensiones internas, que dan lugar al agrietamiento o rotura de sus tejidos (Meryman, 1963).

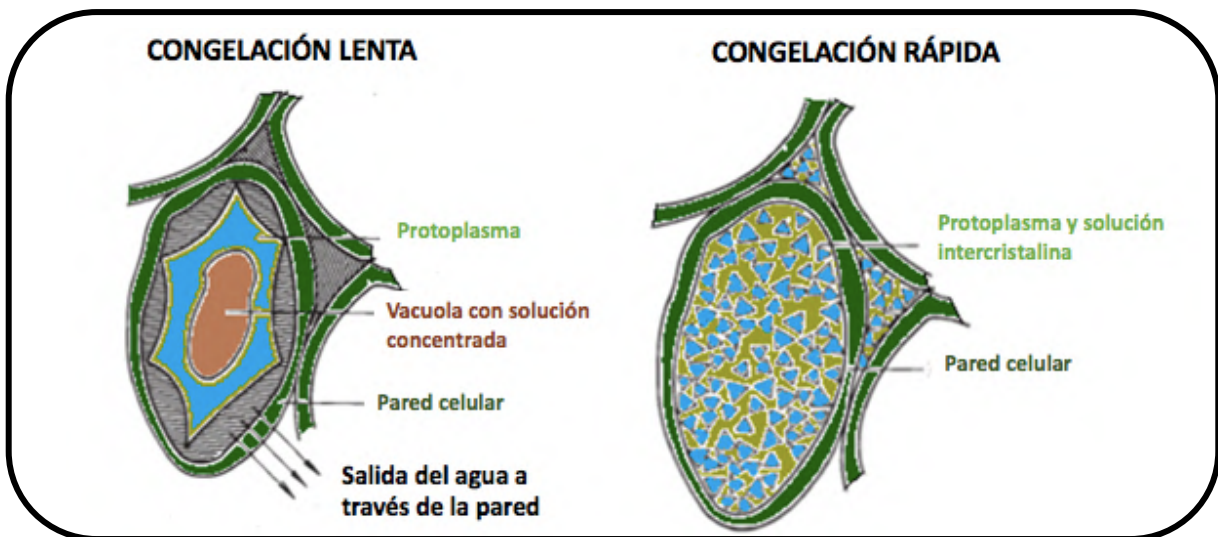


Figura 1.18: Efecto de la congelación sobre los tejidos vegetales

Diferentes estudios se han centrado en analizar los efectos de la congelación sobre la textura de frutas como cerezas (Alonso, Canet, & Rodríguez, 1994), frambuesas y moras (Sousa et al., 2007), fresas (Delgado & Rubiolo, 2005) y manzanas (Chassagne-Berces et al., 2010,

2009) a través de medidas mecánicas y/o sensoriales de las frutas congeladas/descongeladas o mediante el uso de técnicas microscópicas. Sin embargo, pocos estudios han analizado los cambios bioquímicos de las frutas causados por la congelación. Chassagne-Berces et al. (2009) concluyeron que el efecto de la congelación sobre los polisacáridos de la pared celular de la manzana *Granny Smith* varía según la velocidad de congelación; observaron que el proceso de congelación que provocó una mayor pérdida de polisacáridos de la pared celular fue la congelación rápida por inmersión en nitrógeno líquido. Además, los estudios de Loncaric et al. (2014) y Fernandes et al. (2013) concluyeron que la congelación provocaba una disminución en el contenido de compuestos fenólicos y antioxidantes dependiente de la naturaleza del alimento. El trabajo de Loncaric et al. (2014) tuvo como objetivo el estudio del efecto de la congelación (-18 °C) de puré de manzana de dos variedades (Idared y Fuji) sobre el contenido total en polifenoles y la actividad antioxidante determinada mediante dos pruebas (ABTS y DPPH). El estudio concluyó que la congelación provocó una disminución en el contenido total en polifenoles del 77 y 71 % en el puré de manzana de las variedades Idared y Fuji, respectivamente, y en la actividad antioxidante medida por ABTS una disminución aproximadamente del 65 % en el puré de las dos variedades de manzana y en la actividad antioxidante medida por DPPH una disminución del 73 y 93 % en el puré de manzana de las variedades Idared y Fuji, respectivamente. El trabajo de Fernandes et al. (2013) tuvo como objetivo el estudio del efecto de la congelación (-20 °C), juntamente con otros procesados, sobre el contenido total en polifenoles y la actividad antioxidante (DPPH) de champiñones. El estudio concluyó que la congelación provocó una disminución del 26% en el contenido total en polifenoles y un 16% de la actividad antioxidante en los champiñones.

1.4.2. Secado

El secado es uno de los métodos de conservación de alimentos más antiguo, y uno de los más importantes en la industria del procesado de alimentos. El principal objetivo de esta operación es prolongar la vida útil del alimento mediante la reducción de su actividad de agua ya que inhibe el crecimiento microbiano y la actividad enzimática (Krokida, Foundoukidis, & Maroulis, 2004). Así mismo, la disminución del peso y el volumen como consecuencia del secado reduce los costes de envasado, transporte y almacenamiento.

Durante el proceso de secado, los alimentos pueden experimentar cambios físicos, químicos, estructurales y organolépticos los cuales pueden causar pérdidas de calidad (Di Scala & Crapliste, 2008).

1.4.2.1. Liofilización

La liofilización se define como un proceso de estabilización en el cual la materia prima primero se congela y después se elimina el solvente mediante sublimación hasta alcanzar niveles de inhibición del crecimiento biológico o las reacciones químicas (Fellows & Trepatt, 1993).

Fundamentos

El proceso de liofilización de alimentos involucra varias etapas (Fellows & Trepatt, 1993):

- Congelación (y acondicionamiento en algunos casos) a bajas temperaturas.
- Secado por sublimación del hielo.

El producto para liofilizar debe congelarse de una manera tal que garantice que se producirán pocas alteraciones en el proceso posterior de sublimación. Se debe conocer con precisión la temperatura en la que ocurre la máxima solidificación, la velocidad óptima de enfriamiento y la temperatura mínima de fusión incipiente. Se busca que el producto congelado tenga una estructura sólida sin intersticios en los que haya líquido concentrado para proporcionar que todo el secado ocurra por sublimación.

La presión de vapor de agua del alimento debe mantenerse por debajo de 4.58 mm Hg para que el agua siga en estado sólido, de modo que a medida que el alimento se calienta el hielo sublima directamente a vapor sin llegar a fundirse. Manteniendo la presión por debajo de la presión de vapor del agua en la superficie del hielo y condensando el vapor se consigue que la liofilización prosiga hasta completarse.

Efecto sobre los alimentos

En comparación con las técnicas clásicas de deshidratación, las principales ventajas del proceso de liofilización, consecuencia de los menores daños estructurales que sufre el alimento, son (Hammami & Rene, 1997):

- La mejor conservación de la mayoría de las propiedades de la materia fresca, tales como la forma, la apariencia, sabor, color, textura, etc.
- La alta capacidad de rehidratación del producto liofilizado.

La congelación del producto endurece su estructura y posteriormente evita el movimiento del soluto y líquido durante la liofilización. Así, cuando se forman los cristales de hielo, se crea una red uniforme en todo el producto que después de la sublimación produce una matriz densa, homogénea y porosa (Hammami & Rene, 1997). Los cambios estructurales más importantes provocados en los alimentos por la liofilización son el colapso o contracción y la porosidad. El colapso o contracción, definido como la disminución del tamaño de poro y la contracción volumétrica dando lugar al aumento de la densidad aparente específica (Cui, Li, Song, & Song, 2008), es el cambio estructural que se da en menor medida en el proceso de liofilización, dejando la porosidad como principal efecto estructural. La porosidad se define como la relación que existe entre la fracción de volumen de poros totales y el volumen total del alimento (Rahman, Al-Zakwani, & Guizani, 2005). La porosidad afecta a la textura y calidad de los alimentos de humedad intermedia y baja. Los poros se forman por los espacios pequeños o grandes que dejan los cristales de hielo durante el proceso de sublimación. La presencia de estos poros facilita el secado y posteriormente la rehidratación del producto seco (Ramírez-Navas, 2007). De la misma manera, cabe destacar que el hecho de producir una estructura del alimento más porosa hace que la matriz del alimento sea más susceptible a las reacciones producidas por compuestos oxidantes. Sin embargo, a pesar, de esta desventaja, el proceso de liofilización, al realizarse a temperaturas bajas, es un proceso respetuoso con los compuestos termolábiles, como es el caso de los compuestos antioxidantes.

El estudio realizado por Sosa et al. (2012) pudo concluir que la liofilización proporciona láminas de manzana porosas de elevada calidad, consiguiendo una adecuada retención de aroma, color y buenas propiedades de rehidratación. Sin embargo, el estudio realizado por Loncaric et al. (2014) también refleja un conjunto de inconvenientes derivados de su capacidad de rehidratación (higroscopicidad) y porosidad que puede provocar alteraciones por oxidación, haciendo imprescindible su envasado en atmósfera inerte. Además, su estructura porosa también provoca que los alimentos liofilizados sean frágiles y deban ser protegidos de daños mecánicos. En contrapartida, las reacciones enzimáticas se ven limitadas significativamente y los fenómenos de pérdida de aroma y la degradación de vitaminas se ven reducidos en comparación con las técnicas de secado clásicas. Se ha estudiado el efecto de la liofilización sobre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de los alimentos, demostrándose que los cambios sufridos en la estructura de los tejidos, ocasionados por este tipo de procesado facilita su extracción (Loncaric et al., 2014; Pérez-Gregorio, Regueiro, González-Barreiro, Rial-Otero, & Simal-Gándara, 2011).

Los alimentos liofilizados, consecuencia de la temperatura de procesado, presentan baja pérdida de constituyentes volátiles y una importante reducción del peligro de contaminación microbiana, así como un contenido en humedad muy bajo por lo cual pueden almacenarse durante largos periodos de tiempo, dando lugar a productos con una alta estabilidad, siempre y cuando no contengan significativas cantidades de lípidos y/o sean conservados en ausencia de oxígeno. Sin embargo, el proceso de liofilización también presenta una serie de desventajas, entre las que destacan los tiempos elevados de procesado y el elevado consumo de energía (Duan, Ding, Ren, Liu, & Kong, 2013).

1.4.2.2. Secado convectivo

El secado convectivo es el método más utilizado para la deshidratación de alimentos. Consiste en el calentamiento de la muestra mediante la circulación de aire caliente con baja humedad relativa, que promueve la evaporación del agua de su superficie y, consecuentemente, reduce el contenido de humedad del sólido hasta niveles adecuados mediante la transferencia de materia desde el ~~centro del~~ sólido hasta el aire (Clemente, Bon, Sanjuan, & Mulet, 2011).

Fundamentos

El proceso de secado por convección se caracteriza por dividirse en tres fases (Figura 1.19) (Fito, Andrés, Albors, & Barat, 2001):

- Período de inducción: este es un periodo de estabilización en que se equilibran las condiciones de la superficie del sólido y el aire de secado.
- Fase de velocidad de secado constante: la velocidad con que se elimina el agua de la superficie del sólido es menor que la velocidad con que llega a ella desde el interior de este. De esta manera, la superficie del material se mantiene constantemente mojada y se comporta como una masa de líquido.
- Fase de velocidad de secado decreciente: el sólido presenta contenidos en humedad inferiores al valor crítico. En el período de velocidad decreciente, en general, la velocidad de secado está regida por el desplazamiento interno del agua hacia la superficie. En gran número de procesos, puede suponerse que este movimiento es debido a un mecanismo de difusión.

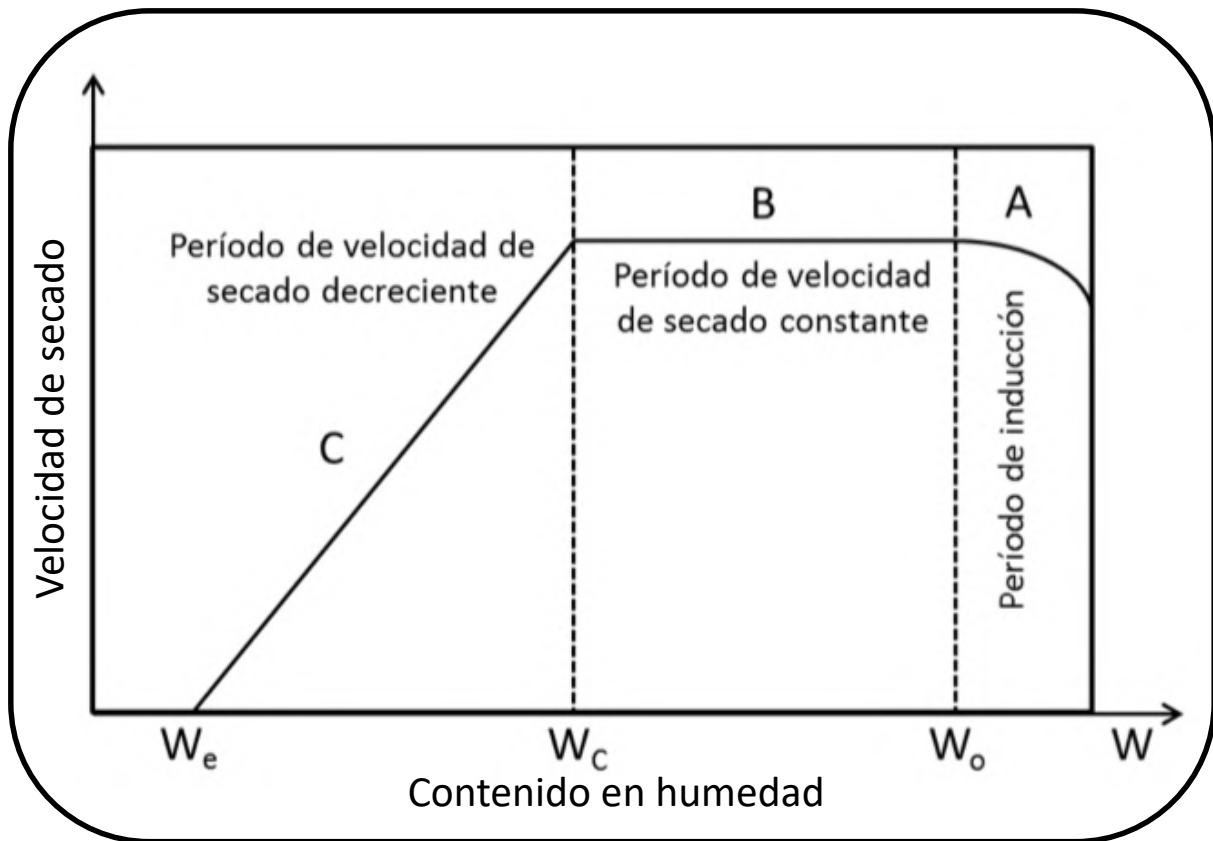


Figura 1.19: Etapas del proceso de secado

El proceso de secado viene condicionado, en mayor o menor medida, por diferentes factores, que se pueden dividir en dos categorías: los dependientes de la materia prima y los dependientes de las condiciones de operación. Las propiedades intrínsecas de la materia prima pueden jugar un papel importante en la velocidad de secado, ya que la composición y estructura interna del producto pueden ofrecer más o menos resistencia al paso del agua por su interior. En el caso de alimentos de origen vegetal, los parámetros más relevantes son la porosidad y el tamaño de partícula (Mrad, Boudhrioua, Kechaou, Courtois, & Bonazzi, 2012), el grado de madurez (Femenia et al., 2009) que determinará la densidad y microestructura del material, y los pretratamientos (Hiranvarachat, Devahastin, & Chiewchan, 2011). Entre los factores dependientes de las condiciones de operación destacan la temperatura y la velocidad del aire de secado (Ahmed, Sorifa, & Eun, 2010), además de la temperatura y humedad ambiente, y la densidad de carga del secadero.

Efectos sobre los alimentos

Una de las causas de alteración de la calidad de los alimentos deshidratados mediante aire caliente reside en las modificaciones en las características físicas. La temperatura y la velocidad de secado ejercen un efecto determinante sobre la textura de los alimentos. Por lo

general, la velocidad de deshidratación rápida y la temperatura elevadas provocan mayores cambios en los alimentos (Rodríguez et al., 2014). Además, a medida que el agua va eliminándose, los solutos se desplazan hacia la superficie del alimento, aumentando su concentración. El mecanismo que rige este proceso y la velocidad de transferencia del agua son característicos de cada soluto y dependen del tipo de alimento y de las condiciones durante el proceso de secado.

Las temperaturas elevadas pueden provocar cambios físicos y químicos en la superficie del alimento que conducen a la formación de una capa superficial dura e impenetrable. Este fenómeno, que se denomina "encostramiento", reduce la velocidad de secado y da lugar a un alimento seco en su superficie y húmedo en su interior. Este efecto puede minimizarse controlando los parámetros del secado para evitar que se produzca una diferencia excesivamente alta entre el contenido de agua de la superficie y del interior (Fellows & Trepát, 1993).

El proceso de secado modifica las características de la superficie del alimento y por tanto su color y reflectancia. Estos cambios físicos son consecuencia de cambios químicos experimentados durante el proceso de secado por los pigmentos, entre otros el caroteno y la clorofila, producidos por el calor y la oxidación que tienen lugar durante el secado. Por lo general, cuanto más largo es el proceso de secado y más elevada la temperatura, mayores son los cambios en estos pigmentos (Fellows & Trepát, 1993). Por otra parte, la oxidación, la reacción de Maillard y la actividad enzimática residual favorecen la aparición de pardeamiento durante el almacenamiento del alimento (Garau, Simal, Rosselló, & Femenia, 2007).

El efecto del secado sobre los compuestos bioactivos de los alimentos de origen vegetal depende de las características de cada uno de ellos, y de la técnica y condiciones de secado utilizadas. Los estudios realizados por Garau et al. (2007) y Femenia et al. (2009) sugieren que la temperatura óptima de secado para la preservación del contenido de fibra alimentaria de piel y pulpa de naranja y kiwi, respectivamente, fue entre 40 y 70 °C. Las mayores pérdidas de polisacáridos de la pared celular (~13%) se encontraron en las muestras secadas a temperaturas elevadas (90 °C) y también a temperaturas bajas (30 °C), debido al mayor tiempo de exposición. Sin embargo, las muestras secadas a 50, 60 y 70 °C no mostraron diferencias significativas en la composición de la pared celular respecto a la muestra fresca.

Por otro lado, durante los últimos años ha aumentado el interés por los compuestos antioxidantes, hecho que queda claramente reflejado en el creciente número de publicaciones

científicas sobre este tema (López et al., 2010; Rahman, Shamsudin, Ismail, Shah, & Varith, 2018; Rodríguez et al., 2014; Tarhouni et al., 2019). El objetivo del trabajo realizado por López et al. (2010) fue determinar el efecto de la temperatura de secado en la actividad antioxidante, el contenido en polifenoles totales, vitamina C, el pardeamiento no enzimático y en la textura de los arándanos. Dicho estudio concluyó que la disminución de la concentración de compuestos bioactivos fue menos pronunciada a altas temperaturas de secado (80-90 °C) (~43% en contenido total en polifenoles) con respecto a temperaturas bajas/moderadas (50-60-70 °C) (~77% en contenido total en polifenoles), donde los tiempos de secado largos conducen a una notable reducción del contenido en nutrientes y de la actividad antioxidante. Sin embargo, a altas temperaturas de secado, se observó un mayor pardeamiento y una menor firmeza del tejido de los arándanos. Rahman et al. (2018) estudiaron los cambios provocados en el contenido total en polifenoles y la actividad antioxidante de las diferentes partes del subproducto de pomelo (albedo, flavelo y restos de pula) después del secado a dos temperaturas distintas (50 y 60 °C). Estos autores observaron que el efecto del secado fue diferente dependiendo de la parte del subproducto analizada; el proceso de secado provocó la disminución (~29% en ambas temperaturas) del contenido en polifenoles totales en el albedo, mientras que se observaron aumentos del contenido total en polifenoles en el flavedo (~3.5% y ~0.6% a 50 y 60 °C, respectivamente) y en los restos de pulpa (~120% y ~104% a 50 y 60 °C, respectivamente), respecto a las muestras frescas. El aumento en el contenido en polifenoles totales producido por el proceso de secado debió ser provocado por los productos de la reacción química de Maillard ocasionada durante el proceso y que tuvo un mayor rendimiento a temperaturas bajas, ya que el tiempo de exposición a la temperatura fue mayor. El trabajo realizado por Rodríguez et al. (2014) tuvo como objetivo analizar el efecto de la temperatura del secado convectivo (30-50-70 °C) sobre el contenido total en polifenoles, flavonoides y la actividad antioxidante conjuntamente con el efecto sobre la microestructura de láminas de manzana. Este estudio concluyó que los parámetros de calidad se conservaron mejor cuando se usaron temperaturas de secado elevadas (70 °C) (pérdidas de 19.7% en contenido total en polifenoles y 32.5% en contenido total en flavonoides), sin embargo, se observó un mayor colapso y rotura celular a temperaturas de secado elevadas. Por tanto, dichos estudios revelan que el efecto del secado sobre los compuestos antioxidantes depende del tipo de alimento y las condiciones de secado utilizadas. Sin embargo, todos los estudios revelan que las menores pérdidas de compuestos fenólicos y capacidad antioxidantes se producen en temperaturas de secado intermedias (60-70 °C).

1.5. Efecto del procesado de alimentos sobre la liberación de compuestos bioactivos

La concentración de un compuesto bioactivo que se libera desde la matriz del alimento durante la digestión puede ser diferente a la concentración de dicho compuesto bioactivo presente en el alimento antes de la ingesta. Este valor también puede diferir del que llega a la circulación sistémica, y que puede ser absorbido por las diversas células en cualquier tejido del organismo humano, almacenado y/o utilizado en funciones metabólicas (Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2009). La liberación de los compuestos bioactivos durante la digestión se ve afectada por la composición bioquímica de la matriz alimentaria, que a su vez puede verse afectada por el procesado de los alimentos, y por las sinergias y antagonismos que pueden establecerse entre los diferentes componentes presentes en el alimento (Fernández-García et al., 2009).

1.5.1. Digestión de los alimentos

La digestión del ser humano es un proceso complejo y esencial para la salud en el que los alimentos ingeridos se descomponen en nutrientes, que el cuerpo puede utilizar para el crecimiento, el mantenimiento de las células y también como combustible. Durante la digestión humana, tienen lugar simultáneamente dos procesos principales: (i) transformaciones mecánicas que reducen el tamaño de partículas de los alimentos; y (ii) transformaciones enzimáticas donde las macromoléculas se hidrolizan formando constituyentes más pequeños que se absorben en el torrente sanguíneo. La desintegración de los alimentos ocurre principalmente en la boca y el estómago, mientras que la digestión enzimática y la absorción de nutrientes y agua tienen lugar principalmente en el intestino delgado y grueso (Guerra et al., 2012).

1.5.1.1. Fundamentos

En la Figura 1.20 se presentan las regiones específicas del tracto gastrointestinal humano. La digestión se inicia con la masticación de los alimentos en la boca, ésta es una etapa corta pero importante con una influencia significativa en el proceso general de digestión y, en particular, en la tasa de vaciamiento gástrico (Woda et al., 2010). Una vez los alimentos se encuentran en la cavidad bucal, éstos se dividen y trituran en pequeñas partículas mediante la masticación, lo cual facilita la deglución de los alimentos, se rompe la cubierta no digerible de celulosa de las frutas y vegetales para que los nutrientes que contienen estos alimentos puedan ser absorbidos y se incrementa la superficie de contacto de las partículas de los alimentos,

facilitando así la acción de las enzimas digestivas. Además, la masticación mezcla los alimentos con la saliva iniciando el proceso de la digestión mediante la acción de la lipasa y la amilasa salival y además lubrica y reblandece el bolo alimenticio, facilitando la deglución. En la boca la saliva es secretada por las glándulas salivales en una concentración aproximada de 1-1.5 L/día y presenta la composición que se muestra en la Tabla 1.1.

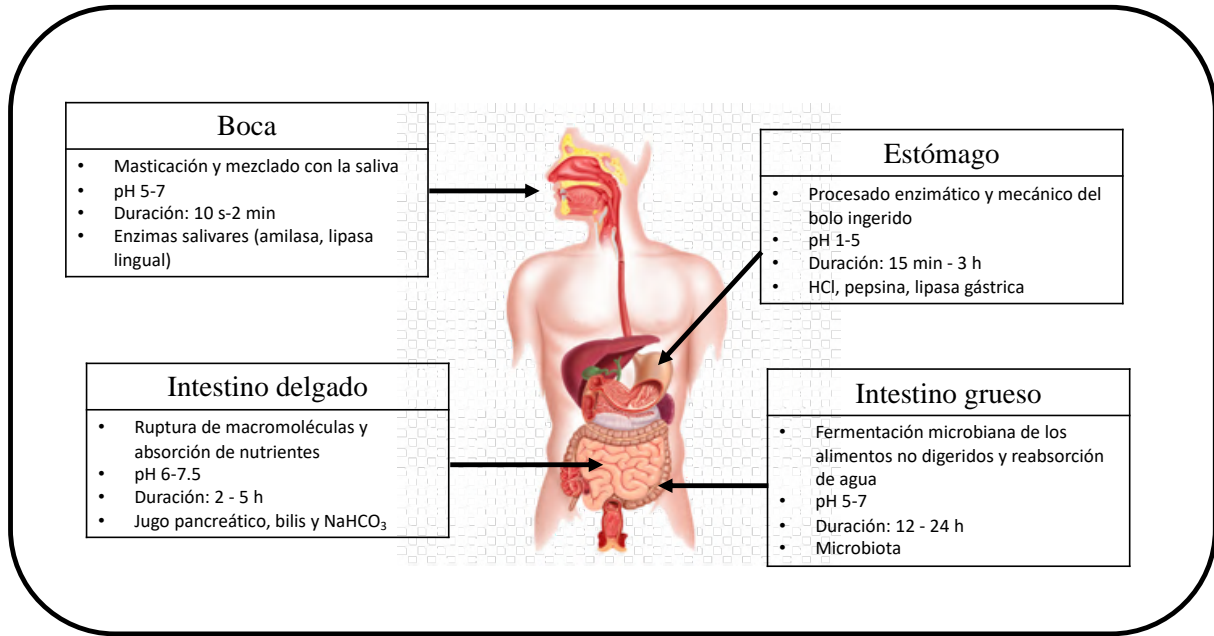


Figura 1.20: Regiones específicas del tracto gastrointestinal humano

La saliva se caracteriza por estar compuesta por un 99.5% de agua, y su pH en las glándulas salivales es ligeramente menor a 7.0 pero durante la secreción activa se aproxima a 8.0. Además, se caracteriza por ser una solución hipotónica con respecto al plasma. Las funciones de la saliva son principalmente tres (Segarra, 2006):

1. Iniciación del proceso de digestión. La acción de la enzima α -amilasa inicia la digestión de los almidones y la acción de la lipasa lingual inicia la digestión de los lípidos.
2. Lubricación y humidificación. La mucina es una glucoproteína que facilita la deglución, lubrica los alimentos y protege la mucosa bucal.
3. Protección. Elimina ciertas sustancias tóxicas como yoduros, urea, citratos alcalinos, etc. Amortigua el pH ácido proveniente del reflujo gástrico por su alto contenido en fosfato y bicarbonato. También contiene IgA, que es la primera línea de defensa contra bacterias. La lisosima ataca las paredes bacterianas. La lactoferrina se une al

hierro y es bacteriostática. Las proteínas ricas en prolina protegen el esmalte dentario y se unen a taninos tóxicos.

Tabla 1.1: Composición de la saliva humana (Nikiforuk, 1985)

Componentes de la saliva
Bicarbonato
Sodio
Potasio
Calcio
Cloruro
Fosfatos
Protelina
α -amilasa
Mucina
IgA

El bolo alimenticio resultante de las degradaciones mecánicas y enzimáticas en la boca se transporta a través del esófago al estómago por el movimiento peristáltico, donde se produce la digestión gástrica. Desde el punto de vista fisiológico el estómago se divide en dos partes: oral y caudal. La parte oral del estómago esta formada por el fondo y dos tercios proximales del cuerpo. Esta región contiene glándulas oxínticas y es responsable de recibir los alimentos ingeridos. La porción caudal contiene la parte distal del cuerpo y el antro. Esta región es responsable de las contracciones que mezclan los alimentos y la impulsan al duodeno (Barrett, 2006). Las funciones motoras del estómago, que se describen a continuación, tienen por objetivo el almacenamiento de los alimentos, la mezcla del contenido gástrico y el vaciamiento progresivo hacia el duodeno (Segarra, 2006).

1. Almacenamiento. Cuando los alimentos entran al estómago, la región oral, especialmente el fondo, se agranda para acomodar los alimentos en un proceso denominado “relajación receptiva”. Cerca de 2 L de alimentos pueden acomodarse en el estómago cuando la relajación receptiva alcanza su máxima actividad.
2. Mezcla. La presencia de alimentos sólidos en la porción caudal del estómago produce ondas peristálticas rítmicas y vigorosas, especialmente en el antro. La

actividad contráctil mezcla el alimento con las secreciones gástricas hasta formar una masa semilíquida, el quimo. El quimo es una pasta semilíquida, lechosa y turbia que se forma por la mezcla de alimento y secreciones. El movimiento de contracción y relajación se repite hasta que los sólidos son triturados y reducidos a partículas menores de 1 mm, entonces el esfínter pilórico se relaja y el contenido del estómago pasa al duodeno.

3. Vaciamiento gástrico. El vaciamiento gástrico se produce cuando el quimo se ha descompuesto en partículas lo suficientemente pequeñas para que se filtren por el esfínter pilórico. El vaciamiento de los líquidos depende de la presión generada por el fondo y el cuerpo gástrico y no requiere movimientos peristálticos en el antro. El ritmo del vaciamiento gástrico también depende del tipo de alimento ingerido. Los alimentos ricos en hidratos de carbono salen del estómago en pocas horas; los alimentos ricos en proteínas lo hacen con mayor lentitud y los ricos en grasas lo hacen muy lentamente (Ballance et al., 2013; Golding & Wooster, 2010; Kong & Singh, 2008). Las células de las glándulas gástricas secretan aproximadamente 2.5 L/día de jugo gástrico con un pH aproximado de 1. Este jugo contiene una gran variedad de sustancias entre las cuales destacan el ácido clorhídrico, moco, bicarbonato, electrolitos, pepsina, factor intrínseco, agua, antígenos del grupo sanguíneo y gastrina. En la Tabla 1.2 se muestran los componentes principales del jugo gástrico humano.

Tabla 1.2: Componentes principales del jugo gástrico humano

Componentes
Cationes: Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , H ⁺
Aniones: Cl ⁻ , HPO ₄ ²⁻ , SO ₄ ²⁻
Pepsinógeno
Lipasa
Moco
Factor intrínseco
Agua

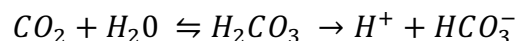
A continuación, se describen brevemente los componentes moco, pepsinógeno y factor intrínseco del jugo gástrico (Segarra, 2006):

1. Moco. El moco alcalino del estómago es un mucopolisacárido espeso y viscoso. Desempeña un papel importante en la protección del estómago contra su contenido ácido. El moco es secretado por las células calciformes del epitelio superficial, las células mucosas del cuello de las glándulas oxínticas y las glándulas del antro y píloro.
2. Pepsinógeno. Es secretado por las células principales de las glándulas oxínticas. Cuando está recién secretado no tiene actividad digestiva, pero una vez que entra en contacto con el HCl la molécula se fragmenta y se convierte en pepsina. La pepsina es una enzima proteolítica activa a un pH entre 1.8-3.5 hasta un pH cercano a 5 donde ya es inactiva.
3. Factor intrínseco. Es una glucoproteína secretada por las células parietales de las glándulas oxínticas. No interviene en los fenómenos digestivos, pero tiene una importancia fundamental en la absorción de la vitamina B₁₂ y más exactamente de la cianocobalamina.

Las células parietales secretan ácido clorhídrico a la luz del estómago (Figura 1.21) y simultáneamente reabsorben bicarbonato hacia la circulación sanguínea mediante el siguiente proceso:

Los iones cloro y potasio son transportados desde la célula parietal hacia la luz del estómago; el cloro es transportado a través de canales o por una bomba. El flujo de cloro a la luz del estómago crea un potencial negativo, que origina la difusión pasiva de K⁺ hacia la luz.

En las células parietales, el CO₂ y el H₂O reaccionan entre ellos para dar lugar a bicarbonato y H⁺ mediante la siguiente reacción química catalizada por la enzima anhidrasa carbónica.



Los iones H⁺ son secretados a la luz del estómago e intercambiados por iones K⁺ mediante una bomba de protones ATPasa. Los iones H⁺ se unen a iones Cl⁻ y se forma HCl. El bicarbonato producido en las células parietales se intercambia con cloro y luego difunde al plasma. Con la salida del bicarbonato a la sangre, el pH de ésta incrementa.

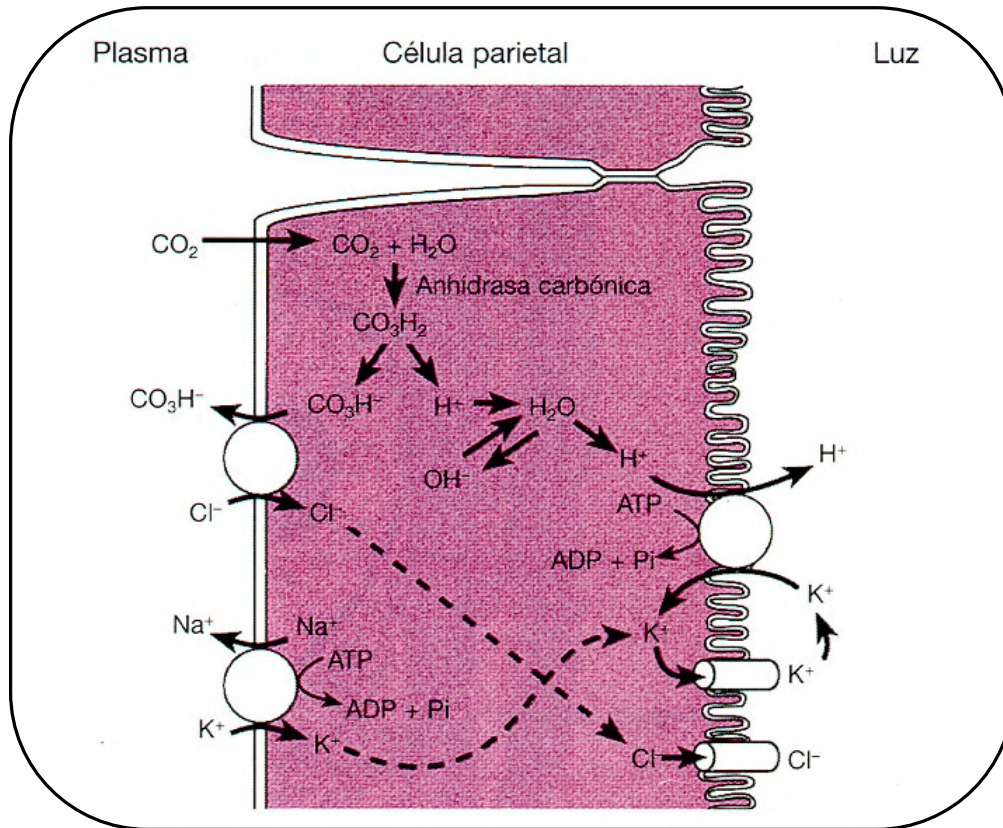


Figura 1.21: Mecanismo de secreción de ácido clorhídrico en una célula parietal (Barrett, 2006)

La velocidad de secreción de ácido clorhídrico se eleva notoriamente después de una ingesta. Entre las funciones del ácido clorhídrico destacan el participar en la disgregación de las proteínas, proveer un pH óptimo para la acción de la pepsina, la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y la estimulación del flujo de bilis y de jugo pancreático (Barrett, 2006).

El quimo ácido del estómago se desplaza hacia el intestino delgado, éste tiene la morfología altamente adaptada a sus dos funciones principales en la digestión, que son la descomposición de las macromoléculas y la absorción de agua y nutrientes. El material no absorbido en el intestino delgado viaja hacia el intestino grueso, el cual tiene como funciones principales la absorción de agua y de electrolitos, la fermentación de polisacáridos y proteínas mediante la microbiota, la reabsorción de sales biliares y la formación, almacenamiento y eliminación de heces (Guerra et al., 2012).

A todo esto, no se debe perder de vista que los principales procesos digestivos, como el vaciamiento gástrico, el tránsito intestinal, la secreción de fluidos digestivos y el moco, y la motilidad están estrechamente controlados por los mecanismos de regulación hormonal (Schubert, 2008) y neural (Mayer, 2011). Las hormonas digestivas pueden aumentar o inhibir la actividad secretora de los órganos glandulares y las contracciones de los músculos lisos, por

tanto, el sistema nervioso central y el periférico están involucrados en la regulación de los procesos de digestión teniendo en cuenta que aproximadamente el 70% de las células inmunitarias residen en el tracto digestivo (conocido como tejido linfoide asociado al intestino), desempeñando así un papel importante en el sistema inmunitario (Guerra et al., 2012).

1.5.1.2. Biodisponibilidad y bioaccessibilidad

La biodisponibilidad se define generalmente como la fracción de una dosis oral de una sustancia que alcanza la circulación sistémica y llega al centro de actividad biológica (Schümann et al., 1997). Esta definición incluye el término de bioactividad, pero debido a la dificultad práctica de cuantificar la llegada de compuestos a sitios específicos de actividad biológica, se adoptó el término de bioaccessibilidad. Paustenbach et al. (2000) define la bioaccessibilidad de una sustancia como la fracción que es soluble en el tracto gastrointestinal y está disponible para la absorción. La definición de bioaccessibilidad no abarca la absorción a través de la pared intestinal o cualquier procesamiento metabólico a nivel sistemático. Por tanto, a modo de resumen, se puede concluir que el término de biodisponibilidad es el más amplio y se engloba en él los términos de bioaccessibilidad y bioactividad (Figura 1.22).

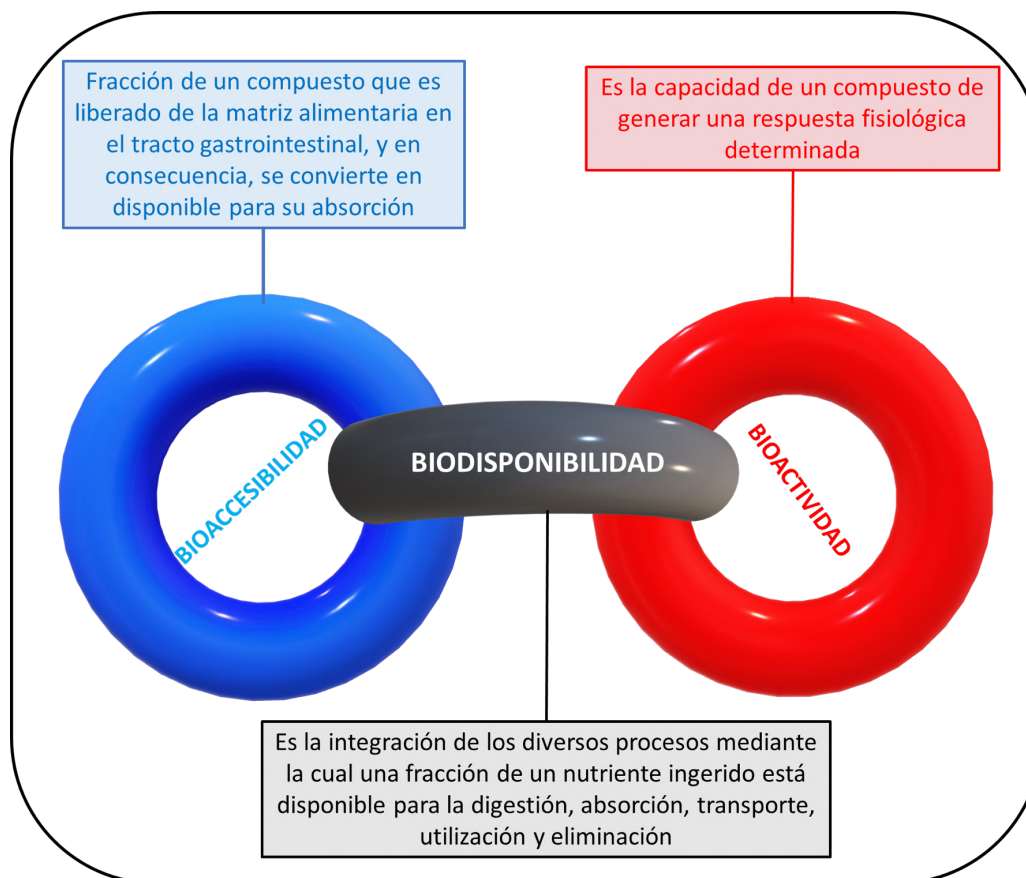


Figura 1.22: Definición de biodisponibilidad, como la suma de bioaccessibilidad y bioactividad. Cambios fisicoquímicos que tienen lugar en cada etapa

En la bibliografía se encuentran diferentes estudios sobre la bioaccesibilidad de nutrientes donde se evalúa la fracción de compuestos bioactivos de la matriz del alimento al sistema digestivo (Tabla 1.3). En dichos estudios, se realiza una evaluación de la cantidad bioaccesible de compuesto bioactivo analizado, sin profundizar en los procesos de transferencia de masa que se producen en cada una de las etapas de la digestión.

Tabla 1.3: Estudios de bioaccesibilidad de nutrientes

Objetivo del estudio	Matriz alimentaria	Parámetro analizado	Referencia
Examinar la bioaccesibilidad de los β -carotenos en 8 variedades de boniato	Boniato de pulpa anaranjada	β -caroteno	Failla et al., (2009)
Evaluar las concentraciones y bioaccesibilidad de metales pesados en vegetales	60 tipos de vegetales divididos en 6 categorías	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn	Hu et al. (2013)
Evaluar la bioaccesibilidad de los carotenoides y α -tocoferol de un plato tradicional tunecino	Mloukhiya	β -carotenos licopenos luteína α -tocoferol	Dhuique-Mayer et al. (2016)
Investigar la bioaccesibilidad de fitoquímicos de bebidas de canela	Bebidas de canela con o sin leche bovina, edulcorantes, miel o sacarosa	Flavonoles, ácidos fenólicos y cinnanaldehídos	Helal et al. (2014)
Evaluar la bioaccesibilidad de ácidos fenólicos de champiñones	Dos variedades de champiñones	Ácidos fenólicos	Helano et al. (2015)

1.5.1.3. Métodos de estudio del proceso de digestión

En la literatura se describen dos metodologías principales para el análisis de la liberación de los compuestos bioactivos desde la matriz del alimento al organismo: estudios in vitro e in vivo (Moreda-Piñeiro et al., 2011). El enfoque in vivo requiere mucho tiempo, una planificación minuciosa y recursos específicos para un control experimental adecuado, y tiene algunas limitaciones analíticas y éticas. Por otro lado, los métodos in vitro en su gran variedad ofrecen un alcance experimental más amplio, que puede ser útil para proporcionar una visión más profunda de los fenómenos que subyacen a la liberación de los compuestos bioactivos.

a) Métodos in vivo

Con respecto a los métodos in vivo, se pueden diferenciar dos enfoques principales: por una parte, aquellos en que se realizan estudios relacionados con la transferencia de materia, y, por otra parte, aquellos donde se analizan los tejidos para conocer las concentraciones de los biocompuestos en ellos (He & Zheng, 2010). Las investigaciones donde se realizan estudios del transporte de materia que tiene lugar durante el proceso digestivo proporcionan una estimación de la fracción bioaccesible/biodisponible del compuesto bioactivo analizado (Fernández-García et al., 2009). Sin embargo, la determinación de la concentración de los biocompuestos en los distintos tejidos implica el control del contenido de metabolitos en el plasma para conocer la cantidad de bioacompuesto que han llegado a los sitios específicos de actividad biológica, de manera que se estima su bioactividad. Ambas estrategias hacen uso de sujetos experimentales humanos o animales para lograr sus evaluaciones (García-Casal et al., 2003; Scalbert & Williamson, 2000; Weber, Flühmann, & Eggersdorfer, 2006).

b) Métodos in vitro

Dependiendo del objetivo de la investigación (un estudio comparativo o un estudio confirmativo), del tipo y de la cantidad de muestra presente, se pueden usar modelos in vitro estáticos o dinámicos para simular diferentes fases de la digestión (Figura 1.23).

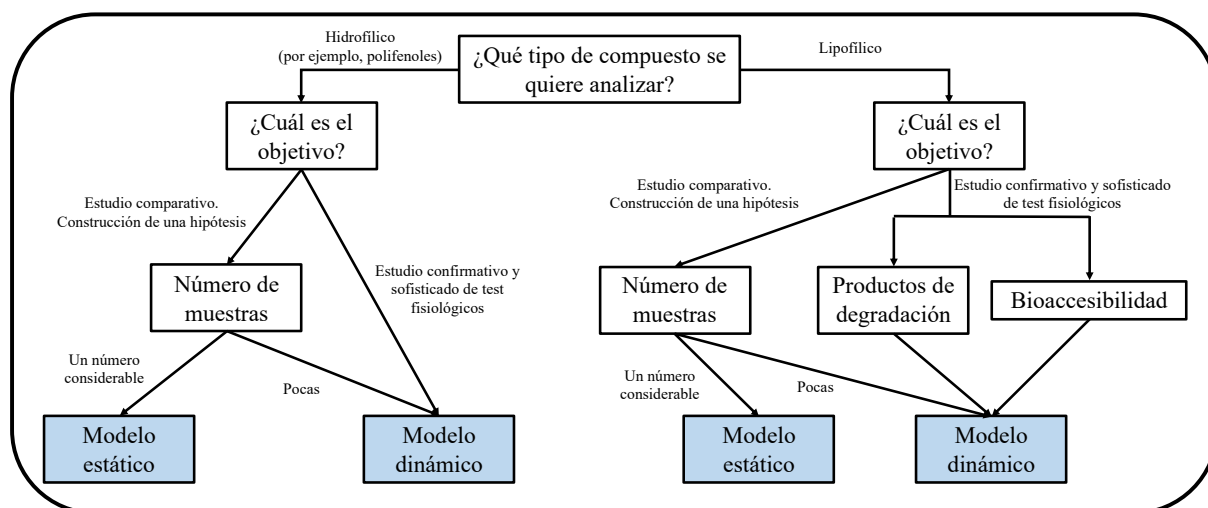


Figura 1.23: Árbol de decisión para la selección de un modelo de digestión in vitro (Alminger et al., 2014)

En la práctica, los modelos estáticos proporcionan un medio viable y económico para evaluar múltiples condiciones experimentales, ya que permite analizar un gran número de muestras. Por otra parte, los modelos dinámicos facilitan los estudios a largo plazo y probablemente reproducen mejor las condiciones reales. Sin embargo, estos sistemas son

costosos de instalar, requieren más trabajo y tiempo y los costos operativos son mayores (Alminger et al., 2014). Se ha diseñado una gama amplia de sistemas de simulación para estudiar el proceso de digestión, desde biorreactores estáticos únicos hasta sistemas multicompartimento y dinámicos (Tabla 1.4).

Tabla 1.4: Representación esquemática de los principales sistemas de simulación in vitro de la digestión

Modelo de digestión	Tipo de modelo	Secreciones digestivas	Mezcla del quimo	Aplicación	Referencias
Oomen	Estático monocompartimento	Saliva	Agitación mecánica	Estudio de la bioaccesibilidad de contaminantes	Quintero-Flórez et al., (2018)
		Jugo gástrico Jugo pancreático Bilis			
DGM		Jugo gástrico HCl	Presión hidrostática	Estudio del proceso ocurrido en el cuerpo y antro del estómago	Grassby et al., (2017)
HGS	Dinámico monocompartimento	Saliva Jugo gástrico	Movimientos mecánicos	Simulación y caracterización de los movimientos peristálticos del estómago y sus efectos	Wang, Lin, Ye, Han, & Singh, (2019)
Vatier		HCl NaHCO ₃	Agitación mecánica	Estudio de la actividad antiácida	Panda, Shinde, Deora, & Gupta, (2017)
Mainville		Bilis HCl	Agitador magnético	Estudio de la supervivencia de los probióticos	Klu & Chen, (2015)
TIM	Dinámico multi-compartimento	Saliva	Agua a presión	Estudios nutricionales, toxicológicos, farmacológicos y microbiológicos	Sáyago-Ayerdi, Zamora-Gasga, & Venema, (2019)
		Jugo gástrico			
		Jugo pancreático			
		Bilis			
		Electrolitos HCl NaHCO ₃			

Modelos estáticos de digestión in vitro

Los modelos estáticos son los sistemas digestivos más utilizados; en ellos la fase gástrica se reproduce por hidrólisis de las proteínas mediante la enzima pepsina, a pH y temperatura fijos, durante un período de tiempo establecido (pH 1–2, 37 °C, 1–3 h). Esta etapa puede estar seguida, de una fase intestinal que involucra enzimas pancreáticas con o sin bilis (pH 6-7). La mayoría de estos modelos se han desarrollado para aplicaciones específicas y son herramientas económicas de alto rendimiento. Algunos de ellos fueron diseñados para evaluar la digestibilidad de las proteínas (Babinszky, Van Der Meer, Boer, & Den Hartog, 1990), el almidón (Englyst, Kingman, Hudson, & Cummings, 1996) y la bioaccesibilidad de los carotenoides (Garrett, Failla, & Sarama, 1999) y contaminantes (Oomen et al., 2003). En este enfoque, a menudo se necesitan grandes cantidades de reactivos y las fuerzas mecánicas (agitación continua) no son representativas de los movimientos peristálticos complejos (Kong & Singh, 2008). Otros modelos estáticos mono compartimento incluyen parámetros adicionales como fuerzas mecánicas (Chen et al., 2011) o eliminación de productos finales de digestión (Miller, Schrickler, Rasmussen, & Van Campen, 1981).

En la bibliografía queda patente que se han propuesto varios modelos de digestión in vitro estática. Esta variabilidad de métodos, a menudo, impide la posibilidad de comparar resultados entre diferentes equipos de investigación. Por este motivo, en el marco de la red COST Infogest se redactó un documento de consenso (Brodkorb et al., 2019) donde se propuso un método de digestión estática estandarizado adaptable a requisitos específicos. En dicho documento se describe el procedimiento a seguir en la digestión oral, gástrica y del intestino delgado (Figura 1.24) y se discute su correlación con los datos conocidos de estudios in vivo.

En la Tabla 1.5 se presenta la composición de la saliva, jugo gástrico y fluido intestinal, propuesta en el protocolo estandarizado. Este documento proporciona un protocolo detallado, orientaciones, recomendaciones, justificaciones y limitaciones del modelo propuesto.

El protocolo consensuado propone una duración de 2 min de la etapa de digestión oral para facilitar la precisión y reproducibilidad de los resultados. Sin embargo, el documento expone que la duración de dicha etapa puede ser modificado según el tipo de muestra, de modo que puede ser reducido sin que los resultados se vean afectados cuando se trata de una muestra con un tamaño de partícula homogéneo. Además, en la formulación de la saliva artificial propuesta (Tabla 1.5) no se incluye la mucina como componente ya que su concentración es minoritaria y su única función es la de proporcionar cohesión al bolo alimentario por lo que se

decidió que su presencia no era imprescindible, aun así, su presencia en la formulación no alteraría los resultados obtenidos.

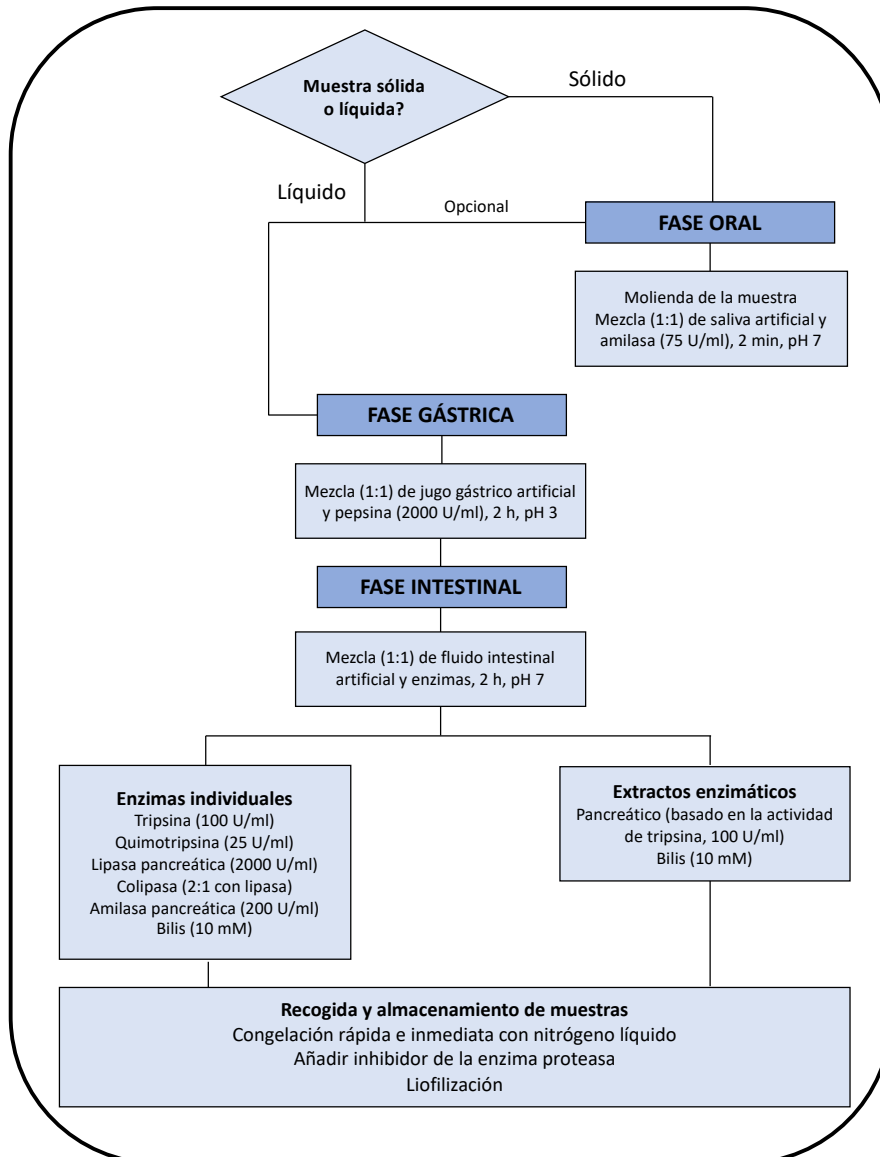


Figura 1.24: Descripción general y diagrama de flujo del método estandarizado de digestión in vitro (Brodkorb et al., 2019).

En el protocolo de digestión in vitro estático propuesto la duración de la fase gástrica es de 2 h, ya que las condiciones propuestas deben ser aplicables a una amplia gama de muestras y dicho tiempo consensuado representa un tiempo medio de vaciado de una muestra moderadamente nutritiva y semisólida. De todas maneras, el documento indica que el vaciado gástrico de una muestra sólida se completa en un tiempo medio de entre 3 y 4 h, por tanto, el tiempo de la fase gástrica puede ser ampliado en caso de estudios con muestras sólidas. El pH recomendado para esta etapa de digestión es de 3, debido a que se realizó una media ya que el pH después de una ingesta se modifica y depende del alimento ingerido. No obstante, la

recomendación del documento es la adaptación del pH al alimento objeto de estudio, ya que el pH del proceso debe ser el óptimo para la actividad de las enzimas.

Tabla 1.5: Composición de las soluciones madre de fluidos de digestión simulados. Los volúmenes se calculan para un volumen final de 500 ml para cada fluido simulado (Brodkorb et al., 2019).

Componente	mol/L	Saliva		Jugo gástrico		Fluido intestinal	
		pH 7		pH 3		pH 7	
		mL	mmol/L	mL	mmol/L	ml	mmol/L
KCl	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH ₂ PO ₄	0.5	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO ₃	1	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	2	-	-	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	0.15	0.5	0.15	0.4	0.1	1.1	0.33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	-	-
Para el ajuste del pH							
NaOH	1	-	-	-	-	-	-
HCl	6	0.09	1.1	1.3	15.6	0.7	8.4
CaCl₂(H₂O)₂ se añade en el momento de la realización del proceso de digestión							
CaCl ₂ (H ₂ O) ₂	0.3		1.5		0.15		0.6

Modelos dinámicos de digestión in vitro

El Modelo Gástrico Dinámico (DGM) de un único compartimento fue diseñado para tener en cuenta los distintos procesos que tienen lugar en cada una de las regiones del estómago (Mercuri et al., 2011; Vardakou et al., 2011). Está compuesto por dos zonas diferenciadas en un mismo compartimento: (i) el "cuerpo" donde se mezclan las secreciones gástricas con los alimentos; y (ii) el "antro" donde se reproducen las fuerzas del estómago y el vaciamiento gástrico está regulado por una válvula que permite que las partículas más pequeñas salgan del estómago, mientras que las más grandes se someten a reflujo en la cámara superior para ser digeridas. A pesar de su complejidad, el DGM no reproduce con precisión las fuerzas peristálticas in vivo. Otro modelo dinámico de digestión in vitro de un único compartimento es el Simulador Gástrico Humano (HGS), compuesto por una cámara de látex rodeada por un sistema de conducción mecánica, que simula con mayor eficacia los movimientos peristálticos del estómago en amplitud, intensidad y frecuencia (Kong & Singh, 2010).

Los principales modelos dinámicos de digestión in vitro bicompartimento tienen como objetivo simular las condiciones lumbales del estómago y del intestino delgado proximal (Mainville, Arcand, & Farnworth, 2005; Vatier, Célice-Pingaud, & Farinotti, 1998; Yvon,

Beucher, Scanff, Thirouin, & Pelissier, 1992).. Estos sistemas reproducen los movimientos peristálticos del sistema digestivo, sin embargo, la fuerza ejercida sobre el sistema es de difícil control y por tanto no se conoce con exactitud. Estos sistemas se han estandarizado y validado para aplicaciones específicas, como el estudio de la actividad antiácida (Castela-Papin et al., 1999; Vatier et al., 1998) o la supervivencia de los probióticos (Mainville et al., 2005; Tompkins, Mainville, & Arcand, 2011).

El modelo TIM-1 es un sistema gastrointestinal que combina la multi-compartimentación y el dinamismo (Minekus, Marteau, Havenaar, & Huis in't Veld, 1995); simula la digestión en el estómago y en las tres partes del intestino delgado (el duodeno, el yeyuno y el íleon). Integra factores clave de la digestión humana como la temperatura, la cinética del pH gástrico e intestinal, los suministros gástricos e intestinales, el tiempo de tránsito, la mezcla y el transporte peristáltico, la adición secuencial de secreciones digestivas y la absorción pasiva de agua y moléculas pequeñas a través de un sistema de diálisis, por lo que permite la simulación más próxima a los eventos dinámicos in vivo que ocurren dentro del lumen gastrointestinal humano. Este modelo se ha aplicado en un gran número de estudios nutricionales (Blanquet-Diot, Soufi, Rambeau, Rock, & Alric, 2009; Martin & de Jong, 2012), toxicológicos (Krul, Zeilmaier, Schothorst, & Havenaar, 2004; Torres-Escribano et al., 2011), farmacéuticos (Brouwers et al., 2011; Dickinson et al., 2012) y microbiológicos (Blanquet-Diot et al., 2012; Kheadr et al., 2010). Dichos estudios tienen como objetivo la evaluación de la cantidad bioaccesible de compuesto bioactivo después de todo el proceso de digestión, mientras que no se contempla el análisis de los procesos de transferencia de materia, concretamente las cinéticas de liberación de nutrientes ni su modelización.

1.5.2. Efecto del procesado en la liberación de los nutrientes

La digestión conlleva una serie de cambios fisicoquímicos y microestructurales de los alimentos que provocan la liberación de nutrientes. Tydeman et al. (2010) observaron que la ruptura celular durante la digestión in vitro fue un requisito indispensable para la liberación de los carotenos del tejido de zanahoria, ya que aquellos que se encontraban encapsulados en el interior de las paredes celulares y las células se mantuvieron intactas no fueron accesibles durante la digestión intestinal. De la misma manera, Ellis et al. (2004), por técnicas de microscopía, el papel que juegan las paredes celulares sobre la bioaccesibilidad de los lípidos en almendra. En este estudio, se identificaron en la materia fecal de sujetos sanos, las paredes

celulares y los lípidos intracelulares de las almendras ingeridas, pudiendo concluir que las paredes celulares que quedaron intactas impidieron la liberación de los lípidos intracelulares.

En la bibliografía se ha utilizado la digestión para evaluar el efecto que provoca ésta sobre la microestructura de frutas frescas. Por ejemplo, los estudios de Carnachan et al. (2012) y Mishra & Monro (2012) que evaluaron el efecto de la digestión in vitro sobre la composición de los carbohidratos de muestras de kiwi, observaron que se produjo una pequeña disminución en el contenido en fibra insoluble y soluble después de la digestión gástrica, pero la estructura química de los polisacáridos de estas fracciones no se vio prácticamente alterada. Sin embargo, se observó una reducción en el peso molecular y el grado de metil-esterificación de los polisacáridos, especialmente en el caso de las pectinas

Es conocido que el contenido en un compuesto bioactivo presente en un alimento puede disminuir durante el almacenamiento y/o el procesado, mientras que al mismo tiempo el contenido bioaccesible puede incrementarse como consecuencia de diferentes factores; por ejemplo como resultado de la ruptura de las paredes celulares de los tejidos, o del enlace de los compuestos bioactivos con la matriz o por ruptura de estructuras moleculares complejas (Parada & Aguilera, 2007). Se han realizado estudios in vitro para estudiar el impacto de diferentes métodos de procesado sobre la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos (Tabla 1.6). En general, el efecto del procesado en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos depende de diferentes factores (Cilla, Bosch, Barberá, & Alegría, 2018):

1. Tipo de procesado. Se han realizado estudios in vitro para analizar el impacto de diferentes métodos de procesado de alimentos en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos. Por ejemplo, los tratamientos previos que se aplicaron sobre polvo de cacao (tostado, molienda y alcalinización) provocaron diferentes efectos. Por una parte se observó que el tostado y la alcalinización redujeron la bioaccesibilidad de las procianidinas y, por otra parte, también se observó que la molienda tuvo un efecto contrario debido a la ruptura de las paredes celulares (Gültekin-Özgüven, Berktaş, & Özçelik, 2016).
2. Tipo de compuesto bioactivo considerado. Ryan et al. (2008) observó que el escaldado de calabacín, pimiento rojo y tomate provocó un incremento de la bioaccesibilidad de β -caroteno, pero una disminución de la bioaccesibilidad del licopeno.

Tabla 1.6: Efecto del procesado sobre la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos

Compuesto y efecto sobre la bioaccesibilidad	Alimento	Procesado	Referencia
α y β caroteno \uparrow	Zanahoria	Cocinado	Hedrén, Diaz, & Svanberg, (2002)
β -caroteno, \uparrow licopeno \downarrow luteína \downarrow	Calabacín, pimiento rojo y tomate	Escaldado (10 min) Asado (10 min) Microondas (50s) Al vapor (10 min)	Ryan et al., (2008)
β -caroteno \uparrow	Zanahoria	TT (90, 100 y 110 °C)	Lemmens et al., (2009)
β -caroteno \uparrow	Mandioca	Escaldado (95 °C/30 min) Cocinado (70-80 °C/5-70 min)	Failla et al., (2012)
Licopeno, CTP, CTF, AA (ABTS, DPPH, FRAP y CUPRAC) \uparrow	Tomate	Secado Triturado	Kamiloglu et al., (2014)
Luteína y β -caroteno (no hay efecto)	Puré de kiwi	Microondas (1000 W, 340 s) Pasteurización (97 °C, 30 s)	Benlloch-Tinoco et al., (2015)
β -caroteno \downarrow , licopeno (no hay efecto), luteína \uparrow y α -tocoferol \downarrow	Mulujía	TT (95 °C/30, 60 y 150 min)	Dhuique-Mayer et al., (2016)
AA (DPPH) \uparrow a 4-8-10 min	Manzana (Granny Smith)	HPP (500 MPa/20 °C/2,4,8 y 10 min)	(Briones-Labarca, Venegas-Cubillos, Ortiz-Portilla, Chacana-Ojeda, & Maureira, 2011)
AA (DPPH) \uparrow en todas las condiciones	Semillas de algarroba	HPP (500 MPa/20 °C/2,4,8 y 10 min)	(Briones-Labarca, Muñoz, & Maureira, 2011)
Ácido ascórbico \uparrow de TT frente a HPP y α -tocoferol \downarrow de TT frente a HPP	Bebidas de fruta con leche	TT (90 °C, 30s) HPP (400 MPa/40 °C/5 min)	Cilla et al., (2012)
CTP, CTF y AA (ABTS, DPPH, FRAP y CUPRAC) \downarrow en tostado y \uparrow en el resto de los procesados	Cereales	Tostado (150 °C, 5 min) Cocinado a presión Escaldado (5,10, 15 min) Microondas	Hithamani & Srinivasan, (2014)

CTP, AA (ABTS y CUPRAC) y ácidos fenólicos ↑	Mermelada de zanahoria	Escaldado (100 °C, 30 min)	Kamiloglu, Pasli, Ozcelik, Van Camp, & Capanoglu, (2015)
Vitamina C ↑, CTP ↑ y AA (DPPH) ↓	Zumo de frutas	TT (90 °C, 60 s) HPP (400 MPa/40 °C/5 min)	Rodríguez-Roque et al., (2015)
CTP y AA (ABTS) HHP ↓ y TT no afecta	Zumo de manzana, uva y naranja	TT (80 °C/ 30 min, 90 °C, 30 s) HPP (250 MPa/10 min)	He et al., (2016)
CTP, CTF y AA (ABTS, DPPH, FRAP y CUPRAC) ↑	Remolacha	Escaldado (40 min) Secado (80 °C, 8 h)	Guldiken et al., (2016)
Polifenoles ↓	Ciruela	Escaldado (7 min) Al vapor (7 min)	Kaulmann, André, Schneider, Hoffmann, & Bohn, (2016)

CTP: contenido total en polifenoles, CTF: contenido total en flavonoides, AA: actividad antioxidante, TT: tratamiento térmico y HPP: Pasteurización hiperbárica. ↑ Aumento; ↓ Disminución

3. Composición y estructura de la matriz alimentaria. Ellis et al. (2004) estudiaron, sobre la almendra, el papel de las paredes celulares en la bioaccesibilidad de los lípidos. Identificaron paredes celulares intactas de almendra en materia fecal que dificultaron la liberación de lípidos intracelulares. Sin embargo, incluso si se produce una interrupción completa de la estructura celular, la absorción completa de un nutriente particular no se asegura (Parada & Aguilera, 2007).
4. Presencia de otros compuestos que pueden afectar a la liberación de los compuestos bioactivos considerados. Incluso si se produce una ruptura celular completa no se asegura una bioaccesibilidad total de los compuestos bioactivos ya que ésta puede depender de la presencia e interacción con otros componentes presentes en el alimento. Brown et al. (1997) indicaron que los componentes de la matriz, como la fibra, podrían disminuir la bioaccesibilidad de los carotenoides.

Netzel et al. (2011) evaluaron el efecto de los procesos de cocción o escaldado de zanahoria sobre la digestión in vitro mediante el análisis de la microestructura de la pared celular y del contenido en carotenos. La liberación in vitro de carotenos fue más elevada para el puré de zanahoria cocinada que presentó valores inferiores de grosor de pared celular, seguido por el puré de zanahoria escaldada que presentó con grosor de pared celular intermedio y finalmente el puré de zanahoria fresca que presentó el grosor de pared celular más elevado.

Por tanto, en dicho estudio, las técnicas de procesado utilizadas ocasionaron un daño celular que favoreció el proceso de digestión *in vitro* contribuyendo a la bioaccesibilidad de los nutrientes. La cocción y el tratamiento térmico pueden mejorar la bioaccesibilidad de los carotenoides debido a la ruptura de los tejidos de las plantas y la desnaturalización de los complejos de proteínas y carotenoides que hace que aumente la liberación desde la matriz alimentaria (Aherne, Daly, Jiwan, O'Sullivan, & O'Brien, 2010; Failla, Thakkar, & Kim, 2009; Veda, Kamath, Platel, Begum, & Srinivasan, 2006). Sin embargo, la cocción mejoró la bioaccesibilidad de los β -carotenos, pero también causó isomerización de éstos disminuyendo así su bioactividad (Aherne et al., 2010). En la bibliografía se presentan diferentes estudios que describen que el procesado térmico mejora la bioaccesibilidad del licopeno debido a la descomposición de la matriz del tomate (Gärtner, Stahl, & Sies, 1997; Porrini, Riso, & Testolin, 1998; Van het Hof et al., 2000). A pesar de ello, según los métodos de procesado utilizados, se han observado diferencias entre ellos: por una parte, Karakaya & Yılmaz (2007) observaron que la bioaccesibilidad del licopeno fue similar en tomate fresco (29%) y tomate en conserva (22%), pero, por otro lado, la bioaccesibilidad del licopeno de los tomates secados al sol alcanzó el 58% de bioaccesibilidad (Karakaya & Yılmaz, 2007). Además, la homogeneización a alta presión y su combinación con el procesado térmico (90 °C durante 30 min) causaron una disminución de la bioaccesibilidad del licopeno y se observó una relación inversa entre la presión de homogeneización y la bioaccesibilidad del licopeno (Colle, Van Buggenhout, Van Loey, & Hendrickx, 2010)

Las paredes celulares de las plantas actúan como una barrera para la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos (Ellis et al., 2004; Mandalari et al., 2010). Cuando una célula vegetal se somete a un proceso de masticación o trituración en procesos industriales o domésticos, los compuestos bioactivos pueden asociarse unos a otros, lo que conduce a una modulación de sus bioaccesibilidad. Courraud et al., (2013), compararon la estabilidad y la bioaccesibilidad de los carotenoides en solución (palmitato de β -caroteno sintético o palmitato retinilo) o en alimentos (jugo de zanahoria y espinaca cruda o cocida), en este estudio se demostró que las soluciones de vitamina A y carotenoides eran inestables, mientras que los carotenoides contenidos en alimentos generalmente estaban protegidos por la matriz alimenticia (30% a 100% de recuperación en comparación con 7% a 30% para las disoluciones). Sin embargo, se ha observado que la susceptibilidad a la degradación e isomerización de los carotenoides aumenta después de su liberación de la matriz alimentaria (Failla, Huo, & Thakkar, 2008), y además que las interacciones con los compuestos liberados de la matriz alimentaria (incluidas las fibras

solubles) y la viscosidad general pueden afectar a su bioaccesibilidad (McClements, Decker, & Park, 2008; Schweiggert, Mezger, Schimpf, Steingass, & Carle, 2012). Por ejemplo, se sabe que la bioaccesibilidad del β -caroteno está influenciada por la existencia de enlaces fuertes con las pectinas (Ornelas-Paz, Failla, Yahia, & Gardea-Bejar, 2008) y los polisacáridos solubles e insolubles pueden unirse a compuestos fenólicos y limitar su difusión durante la digestión gastrointestinal (Eastwood & Morris, 1992). Durante la digestión *in vitro* de polvo de cacao, se demostró que las actividades de la proteasa y glucosidasa, así como la actividad de la microbiota, influyen en la liberación de flavanoles de las fibras y proteínas de la matriz (Fogliano et al., 2011). Además, la capacidad de extracción de los ácidos fenólicos, flavonoides y proantocianidinas mejoró en alimentos grasos, aumentando en un factor de 1.5 a 3 para el licor de cacao (50% de contenido de grasa) en comparación con el polvo de cacao (15% de contenido de grasa) (Ortega, Reguant, Romero, Macià, & Motilva, 2009). Estudios como los de Bermúdez-Soto et al. (2007), Bouayed et al. (2011), Gil-Izquierdo et al. (2002) y Nagah & Seal (2005) indican que la ruptura celular durante la digestión *in vitro* produce la liberación de compuestos fenólicos y antioxidantes. Aunque estos estudios también ponen de manifiesto que la mayor o menor liberación de estos compuestos depende de la naturaleza del alimento analizado, por tanto, de su estructura celular. Por tanto, existe una amplia evidencia de que el estado físico de la matriz desempeña un papel clave en la liberación, la transferencia de masa, la accesibilidad y la estabilidad bioquímica de muchos componentes de los alimentos (Aguilera, 2005).

Después de la revisión del estado del arte, se puede concluir que existe un amplio conocimiento del efecto del procesado sobre el concepto amplio de la bioaccesibilidad de algunos compuestos conocidos. Sin embargo, no se han encontrado evidencias bibliográficas de la existencia de estudios detallados sobre los acontecimientos que ocurren en cada una de las fases de la etapa digestiva incluyendo estudios cinéticos y modelización de la liberación de compuestos bioactivos en el seno de cada uno de los órganos del sistema digestivo. Estos estudios serían de vital importancia para la futura formulación de nuevos alimentos o la optimización de las condiciones de procesado de los alimentos.

1.6. Microestructura de los alimentos

En la bibliografía queda patente la necesidad de evaluar la textura de los alimentos para conocer el efecto del procesado sobre la bioaccesibilidad de los biocompuestos durante el proceso de digestión *in vitro*. La textura de los alimentos deriva de su microestructura (Bourne,

2002) y por tanto el análisis de su microestructura contribuye a la caracterización de la textura de un alimento.

1.6.1. Técnicas microscópicas

El análisis de la microestructura de un alimento requiere, generalmente, un examen microscópico. Como técnica principal suele utilizarse la observación al microscopio óptico, pero también se utilizan técnicas de microscopía confocal, microscopía electrónica, microscopía de fuerza atómica, resonancia magnética o tomografía computarizada entre otras. Las imágenes que generan estas técnicas generalmente se digitalizan y se cuantifican utilizando técnicas de análisis de imagen.

Las primeras aplicaciones de la microscopía óptica en los alimentos se relacionaron principalmente con la seguridad alimentaria, concretamente con la determinación de la contaminación microbiana o la presencia de adulterantes en productos alimentarios (Corradini & McClements, 2019). El trabajo de Flint (1994) amplió el campo de aplicación de la microscopía óptica a la dilucidación de la composición de los alimentos e identificación de micro y macroestructuras de las matrices alimentarias basándose en métodos de tinción selectiva y contraste óptico. El uso de técnicas de microscopía óptica sigue siendo relevante en la investigación de alimentos debido a su asequibilidad, capacidad para diferenciar componentes en función del color y su gran flexibilidad. Sin embargo, sus principales limitaciones son su baja resolución y profundidad de foco, particularmente para configuraciones de microscopía de campo amplio.

Las técnicas de microscopía óptica comúnmente utilizadas en aplicaciones alimentarias son la microscopía de campo brillante, polarizada y fluorescente. En un microscopio de campo brillante, el haz de luz pasa a través de una muestra delgada. El contraste de muchas muestras de alimentos es muy débil, por lo que es necesario utilizar métodos de mejora de contraste químico y físico. Entre ellos destaca una amplia variedad de tintes para mejorar el contraste y permitir la diferenciación e identificación de los componentes presentes en las muestras alimentarias que se seleccionan en función de su afinidad con los diferentes componentes de los alimentos. Entre los métodos físicos para mejorar el contraste en microscopía óptica, destaca el uso de luz polarizada (Morris & Groves, 2013).

La microscopía electrónica es, actualmente, un instrumento indispensable para evaluar la superficie o la estructura interna de los alimentos y dilucidar el papel de los componentes

estructurales principales, como agregados de proteínas, cristales de grasa o fibras de polisacáridos dentro de una matriz alimentaria (Corradini & McClements, 2019). La microscopía electrónica tiene una resolución más alta que la microscopía óptica y se pueden detectar estructuras más pequeñas. La microscopía electrónica convencional funciona en alto vacío para minimizar la dispersión del haz de electrones, por lo tanto, se requiere una preparación de muestra previa al análisis para eliminar componentes volátiles tales como agua o moléculas orgánicas presentes en los alimentos. En la investigación alimentaria principalmente se utilizan dos tipos de técnicas de microscopía electrónica; la microscopía electrónica de barrido (SEM) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las técnicas SEM y TEM tienen principios y resolución diferentes, sin embargo, la información obtenida por ambas metodologías se complementa entre sí. SEM es la técnica de microscopía electrónica más utilizada en ingeniería de alimentos. La gran profundidad de campo de SEM permite cubrir una amplia gama de aumentos, de manera que, las imágenes de SEM proporcionan una vista en 3D de la muestra analizada, que es fácil de interpretar. Estas imágenes muestran claramente la distribución y disposición de los diferentes componentes dentro de una muestra, (Morris & Groves, 2013). La microscopía electrónica de barrido criogénico (cryo-SEM) permite analizar muestras húmedas congelando las muestras y analizándolas en una etapa criogénica unida a SEM. Esta técnica, más reciente, se utiliza para muestras con alto contenido en humedad, como productos lácteos (Corradini & McClements, 2019).

El análisis microscópico de los alimentos ha avanzado mucho en los últimos años debido al procesamiento de las imágenes digitales utilizando técnicas novedosas de análisis de imágenes que mejoran la resolución y permiten una visualización adecuada de las estructuras 3D. Esta es una tendencia que continuará en el futuro y que se complementará con la aplicación de herramientas de modelado molecular.

1.6.2. Análisis de imágenes

El análisis de imágenes es una técnica adecuada para estudiar el tamaño, la forma y la rugosidad de la superficie de los objetos y actualmente está ampliamente desarrollada en diferentes ámbitos de trabajo. El análisis de imágenes se ha implementado con éxito en la industria alimentaria, debido a su bajo coste y a la posibilidad de conseguir mediciones en línea incluso en entornos difíciles (Galiardi, Sullivan, & Smith, 1984). En el área de la alimentación, el análisis de imagen se ha utilizado principalmente para visualizar la superficie de cereales y granos (Neuman, Sapirstein, Shweddyk, & Bushuk, 1989; Zapotoczny, 2014).

Mediante el análisis de imágenes es posible estudiar la caracterización morfológica tanto de partículas individuales, como de conjuntos de partículas. En el primer caso, es posible determinar la morfología de las partículas aisladas. Para cada partícula, se miden las dimensiones y se calcula el área y el perímetro, así como los parámetros de forma. Esta metodología es la más utilizada y se ha aplicado para caracterizar gránulos de almidón de diferentes especies (Devaux, Qannari, & Gallant, 1992). Hay que tener en cuenta, para utilizar este método, que debe realizarse la observación de un gran número de partículas para obtener resultados representativos. En el caso de un conjunto de partículas, las imágenes se procesan como texturas.

La morfología matemática es una teoría utilizada para el procesamiento de imágenes (Serra & Jean, 1982). La morfología matemática es un enfoque geométrico-algebraico al procesamiento de imágenes digitales basado en los retículos completos de conjuntos y funciones. La idea esencial del enfoque morfológico para procesar una imagen es utilizar como elemento escudriñador otra imagen más pequeña con una geometría predeterminada adecuada para evaluar las características geométricas y topológicas de los objetos presentes en la imagen. Así, el propósito fundamental es transformar una imagen en otra que sea más adecuada para su análisis e interpretación a la luz de este elemento estructurante.

La morfología matemática fundamenta todas sus operaciones en dos operadores: la erosión y la dilatación asociadas a un elemento estructurante. El elemento estructurante (ES) es un objeto de referencia de dimensiones pequeñas (algunos píxeles) y que presenta una estructura geométrica sencilla (punto, línea, cuadrado, círculo, etc.) asociado a la estructura o topología predominante en los elementos presentes en la imagen. La erosión en las imágenes en niveles de gris se obtiene al desplazar el ES sobre la imagen y reemplazar el píxel central por el mínimo de los niveles digitales cubiertos por el ES. La erosión permite destacar las zonas oscuras presentes en la imagen.

Este procedimiento se ha implementado para imágenes de nivel de gris (Nakagiri & Kaizuka, 1989), como pueden ser las imágenes de microscopía electrónica de barrido. Chassagne-Berces et al. (2009) utilizó este método para el estudio del efecto de la congelación sobre la estructura celular de la manzana. Devaux et al. (2008) cuantificó la estructura del pericarpio del tomate mediante análisis de imagen, mientras que Zapotoczny (2014) realizó una discriminación de variedades de granos de trigo utilizando análisis de imagen.

1.7. Modelización y simulación del proceso de extracción y de la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos

La simulación de procesos mediante modelos matemáticos constituye una poderosa herramienta de cálculo y diseño, que surgió y se desarrolló con la aparición de los ordenadores, y que poco a poco se ha ido imponiendo gracias a la creciente velocidad y capacidad de trabajo que los mismos han ido ofreciendo.

En términos generales, la modelización es una vía esencial para analizar procesos, así como también para predecir el comportamiento del sistema bajo distintas condiciones de operación; el proceso puede proporcionar la información necesaria para controlar y optimizar la operación (Rodríguez, Eim, Simal, Femenia, & Rosselló, 2013).

La modelización de procesos resulta una tarea especialmente complicada cuando se trabaja con materiales biológicos debido a su carácter heterogéneo, complejo y sensible (De Bonis & Ruocco, 2008). Asimismo, para responder a la necesidad actual de elaborar alimentos estandarizados y de alta calidad, es necesario poder predecir la calidad y características del producto final a partir de modelos adecuados a los diferentes productos y procesos (Norton, Tiwari, & Sun, 2013).

Se pueden distinguir dos fases en la modelización de un sistema; una fase inicial que consiste en la formulación, resolución y calibración del modelo y, una segunda fase, de simulación y validación.

En la fase inicial a su vez se pueden diferenciar distintas etapas:

- Observación. Primero deben obtenerse todas las observaciones o medidas físicas del sistema para poder definir las variables implicadas y el comportamiento de éstas.
- Formulación de hipótesis. Una vez determinados los factores y las variables que influyen en el proceso, se deben formular hipótesis y establecer las relaciones matemáticas que existen entre los diferentes parámetros. Estas relaciones matemáticas pueden ser de carácter mecanicista o empírico.
- Planteamiento matemático del modelo. A partir de las diferentes hipótesis planteadas, se selecciona la relación matemática que se considera que describe mejor el proceso y se procede a definir el conjunto de ecuaciones representativas.

- Resolución del modelo. El método adoptado para resolver las ecuaciones planteadas dependerá principalmente del grado de complejidad del modelo y del conjunto de condiciones de contorno asumidas.
- Identificación paramétrica o calibración. Mediante un método de identificación adecuado, se procede a estimar los valores de los parámetros que se usarán para aplicar el modelo.

Una vez que se dispone del modelo con los valores correspondientes para cada parámetro, se utilizarán para llevar a cabo la simulación de resultados y la validación del modelo. Para ello es conveniente seguir las siguientes etapas:

- Simulación. A partir de las hipótesis consideradas y de las ecuaciones matemáticas establecidas con los parámetros identificados, se aplica el modelo para simular el proceso en las mismas condiciones experimentales que se han utilizado para la calibración.
- Validación. La validación de un modelo puede llevarse a cabo de muchas formas. En general la evaluación de un modelo suele realizarse comparando los valores experimentales y calculados de forma gráfica o matemática. Además, es recomendable evaluar la fiabilidad y la capacidad del modelo para reproducir resultados experimentales correspondientes a experimentos realizados en condiciones diferentes de las que se utilizaron para la calibración del modelo. De esta forma, se comprueba la validez de las hipótesis admitidas y las relaciones establecidas.

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. Por su parte, los modelos empíricos son aquéllos que se formulan a partir de datos experimentales, (González-Centeno et al., 2015).

En general, la aplicación de modelos empíricos no permite explicar los fenómenos físicos de un proceso, 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 (González-Centeno et al., 2015). 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 (De Bonis & Ruocco, 2008). En la bibliografía también se dispone de los denominados modelos semiempíricos, entendidos como aquéllos que utilizan estimaciones empíricas y leyes físicas simultáneamente, para dar un cierto significado físico a los parámetros cinéticos del sistema (Quispe-Fuentes et al., 2013).

Desde de un punto de vista industrial, la determinación de los parámetros cinéticos de un proceso de extracción resulta de gran importancia para determinar el efecto de las diferentes variables de operación y asegurar una mayor eficiencia de este. Es por lo que, existen en la literatura numerosos modelos empíricos y/o semiempíricos utilizados en la interpretación de las cinéticas de extracción (Cheung, Siu, & Wu, 2012; Lafka, Lazou, Sinanoglou, & Lazos, 2013; Quispe-Fuentes et al., 2013).

El modelo empírico de Weibull está basado en una función probabilística utilizada para predecir el comportamiento de sistemas complejos variantes (Pobocikova & Sedliackova, 2014). Concretamente, en el campo de la Ingeniería de alimentos, el modelo de Weibull ha sido ampliamente utilizado para describir procesos de inactivación enzimática (Chen et al., 2013), crecimiento y supervivencia de microorganismos (Lee, Kim, Cadwallader, Feng, & Martin, 2013) y/o degradación química de los atributos de un producto (Eim et al., 2013). También se ha aplicado satisfactoriamente a la simulación de cinéticas de secado y de rehidratación (Zura-Bravo, Ah-Hen, Vega-Gálvez, García-Segovia, & Lemus-Mondaca, 2013) y, más recientemente, de extracción (Cheung et al., 2012; González-Centeno et al., 2015; Sturzoiu et al., 2011). El modelo de Weibull también puede ser utilizado para la simulación de la liberación de compuestos bioactivos desde la matriz de un alimento durante el proceso de digestión *in vitro*, ya que en términos físicos se trata de un proceso de extracción sólido líquido (Drechsler & Bornhorst, 2018; Liu & Sopade, 2011).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El trabajo presentado en esta tesis se realizó en el marco de dos proyectos de investigación desarrollados por el Grupo de Ingeniería Agroalimentaria del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares. Estos proyectos, financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y con fondos del FEDER, fueron los siguientes:

- “Aplicación de los ultrasonidos de potencia (UdP) en la intensificación de los procesos de secado a baja temperatura (DPI 2012-37466-C03-02) ”.
- “Revalorización integral de subproductos en función de sus usos potenciales: Extracción de compuestos de interés mediante aplicación de US de potencia y estudios de bioaccesibilidad in vitro (RTA 2015-00060-C04-03)” dentro del proyecto coordinado: “Gestión sostenible y revalorización de subproductos agroalimentarios para alimentación, energía y uso agronómico”.

Tal y como se desprende de la revisión bibliográfica realizada, uno de los grandes retos a los que se enfrenta el sector agroalimentario en la actualidad, es el uso eficiente de sus recursos, cuya consecución pasa por la necesidad de seguir avanzando en la búsqueda de nuevos métodos de aprovechamiento de los residuos y subproductos agroalimentarios.

Por todo ello, el objetivo principal de este trabajo es proponer una metodología para la revalorización de subproductos y residuos vegetales de la industria alimentaria basada en la intensificación de procesos de extracción de biocompuestos mediante la aplicación ultrasonidos de potencia (UdP) y estudiar el efecto del procesado sobre la bioaccesibilidad de dichos biocompuestos.

Para la consecución de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el proceso de extracción acuosa de compuestos antioxidantes de piel de naranja.
- Evaluar el efecto de diferentes técnicas de procesado (secado convectivo, liofilización y congelación) sobre la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de manzana y remolacha.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materia prima

3.1.1. Albedo y flabelo de naranja

La piel, constituida por el flabelo y el albedo de la naranja, destaca por su elevado contenido en agua, además de su importante nivel de carbohidratos, fibra alimentaria y vitamina C (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Composición química de la piel de naranja *Navelina* por cada 100 g (“USDA Food Composition Databases,” n.d.)

Componente	Valor
Agua (g)	72.50
Proteínas (g)	1.50
Lípidos (g)	0.20
Carbohidratos (g)	25.0
Vitamina C (mg)	136
Fibra alimentaria (g)	10.6

Naranjas de la variedad *Navelina* (Figura 3.1), fueron adquiridas en un mercado local y se seleccionaron según el contenido de sólidos solubles (11.0 ± 0.5 ° Brix). Después de extraer el jugo, el material restante (subproducto) se escaldó para inactivar las enzimas endógenas, se liofilizó, se trituró y se tamizó hasta un tamaño de partícula entre 0.355 y 0.710 mm. Finalmente, el subproducto liofilizado se empaquetó al vacío y se almacenó, en ausencia de luz y refrigerado (4 °C) hasta un máximo de 7 días.



Figura 3.1: Naranja Navelina

3.1.2. Manzana

Según su composición (Tabla 3.2), la manzana *Granny Smith* destaca por su elevado contenido en agua, además de su importante nivel de carbohidratos.

Tabla 3.2: Composición química de la manzana *Granny Smith* por cada 100 g de porción comestible (“USDA Food Composition Databases,” n.d.)

Componente	Valor
Agua (g)	86.67
Proteínas (g)	0.27
Lípidos (g)	0.13
Carbohidratos (g)	10.10
Valor energético (kcal)	48.00

Manzanas de la variedad *Granny Smith*, fueron adquiridas en mercados locales de Palma de Mallorca (España) y conservadas a 4.0 ± 0.5 °C hasta su procesado. Una imagen del fruto utilizado se puede apreciar en la Figura 3.2.



Figura 3.2: Manzana *Granny Smith*

Previo descarte de aquellas piezas que presentaban algún tipo de daño fisiológico por golpe mecánico se seleccionó como materia prima para el presente trabajo, aquella que presentó un contenido en sólidos solubles de 13.0 ± 0.5 °Brix.

El procedimiento de acondicionamiento de la materia prima incluyó el corte longitudinal de la pieza mediante un sistema de cuchillas de 1×1 cm² de luz. Posteriormente se eliminó el corazón de la pieza y de los paralelepípedos restantes se seleccionaron grupos de tres tal y como se presenta en la Figura 3.3. Estos paralelepípedos se cortaron mediante un bisturí en cubos de 1 cm de lado, y de los cubos obtenidos se escogieron, para realizar el estudio, los dos centrales de cada uno de los paralelepípedos (Figura 3.3).

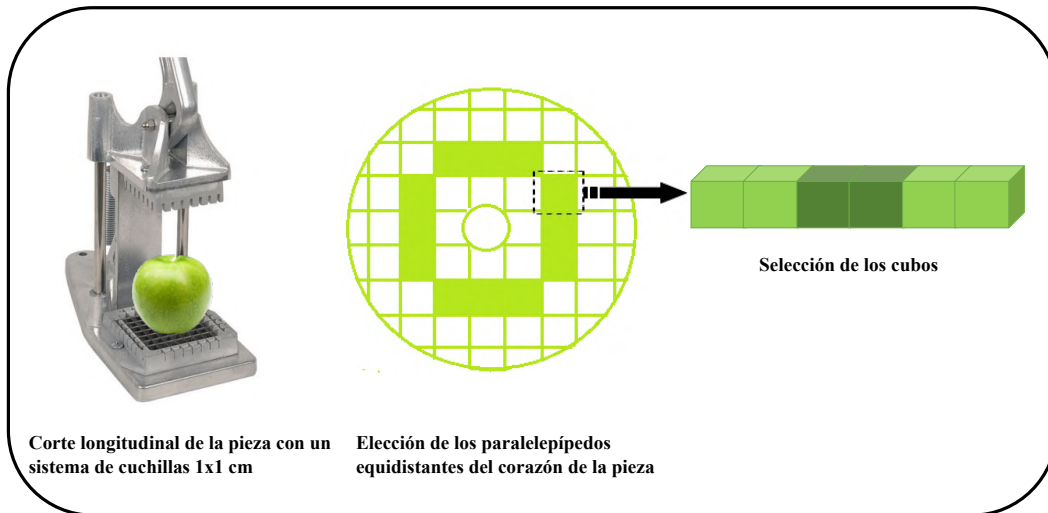


Figura 3.3: Esquema del acondicionamiento de la manzana *Granny Smith*

3.1.3. Remolacha

Según su composición (Tabla 3.3), la remolacha *Beta vulgaris* destaca por su elevado contenido en agua, además de su importante nivel de carbohidratos, betaína y vitamina C.

Tabla 3.3: Composición química de la remolacha *Beta vulgaris* por cada 100 g de porción comestible (“USDA Food Composition Databases,” n.d.)

Componente	Valor
Agua (g)	87.58
Proteínas (g)	1.61
Lípidos (g)	0.17
Carbohidratos (g)	9.56
Vitamina C (mg)	4.9
Betaína (mg)	128.7
Valor energético (kcal)	43.00

Remolacha de la variedad *conditiva*, fue adquirida en mercados locales de Palma de Mallorca (España) y conservada a 4.0 ± 0.5 °C hasta su procesado. Una imagen del fruto utilizado se puede apreciar en la Figura 3.4.



Figura 3.4: Remolacha *Beta Vulgaris*

Previo descarte de aquellas piezas que presentaban algún tipo de daño fisiológico por golpe mecánico se seleccionó como materia prima para el presente trabajo, aquella que presentó un contenido en sólidos solubles de 10.8 ± 0.4 °Brix. El procedimiento de acondicionamiento de la materia prima fue el mismo que el descrito en el apartado anterior para la manzana.

3.2. Técnicas experimentales

3.2.1. Equipos de extracción sólido-líquido

3.2.1.1. Equipo extractor I: agitador mecánico

El equipo extractor I consistió en un sistema de agitación (RZR 2021, Heidolph, Alemania) dotado con una hélice de cuatro álabes que describían un círculo de 4 cm de diámetro a una velocidad de giro de 80 rpm (Figura 3.5). Las extracciones se realizaron en un recipiente de 500 ml encamisado para controlar la temperatura durante todo el proceso. Para este propósito, mediante una bomba peristáltica (VitaTech 600, Vitakraft, Alemania) se recircula a través de la camisa una solución de etilenglicol al 50% (v/v) desde un depósito de enfriamiento, equipado con una unidad enfriadora (Frigedor, JP Selecta, España).

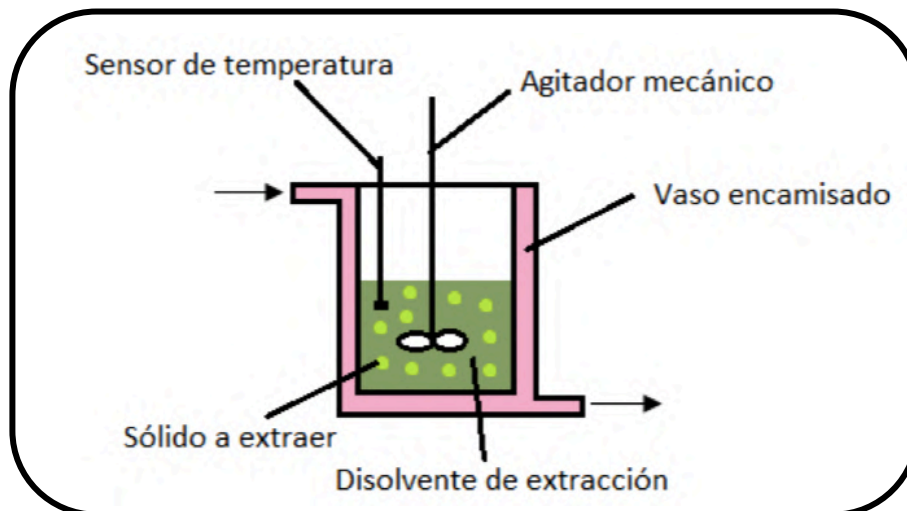


Figura 3.5: Equipo experimental I utilizado para los experimentos de extracción mecánica

3.2.1.2. Equipo extractor II: sonda de ultrasonidos

El equipo extractor II consistió en un procesador de ultrasonidos UP400S (Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) acoplado a una sonda de 40 (US1) o 22 (US2) mm de diámetro (Figura 3.6). Las condiciones experimentales establecidas, análogas para todas las experiencias de extracción acústica realizadas con este equipo, fueron: 55 ± 5 Hz de frecuencia, 520 ± 16 W/L (US1) o 790 ± 19 W/L (US2) de potencia, 22.9 ± 0.1 A de intensidad y ciclos de

0.5 s. El equipo extractor dispone de un sistema de control de temperatura similar al descrito en el apartado 3.2.1.1.

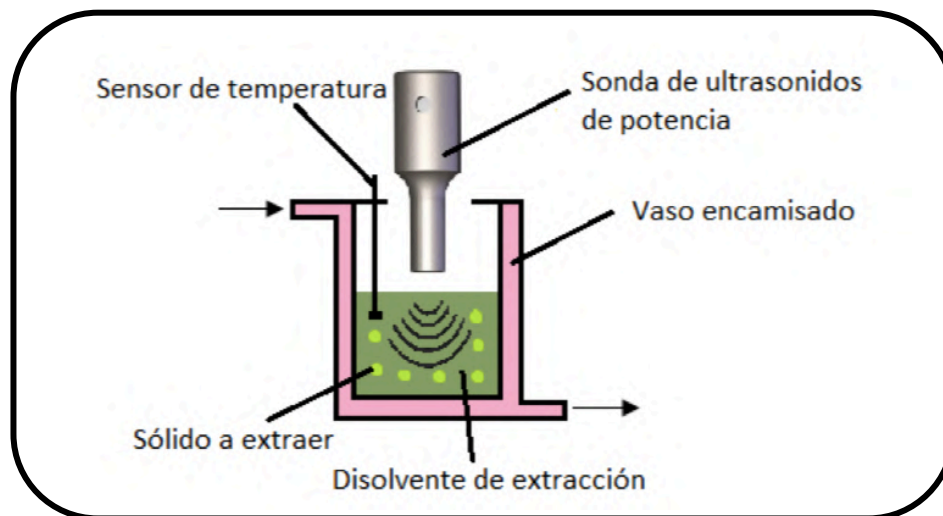


Figura 3.6: Equipo experimental utilizado para los experimentos acústicos

3.2.2. Congelación

Las muestras fueron congeladas mediante tres procedimientos: inmersión en nitrógeno líquido (punto de ebullición $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$), a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultra-congelador (CVF 525/86, Ing. Climas,), y a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un congelador (ACCV-125-2 Coreco,) hasta que la temperatura del núcleo alcanzó el valor de equilibrio con la temperatura de congelación (aproximadamente 30 s, 40 min y 30 min, respectivamente). Una vez congeladas las muestras se descongelaron en una cámara fría a $4.0 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que el núcleo alcanzó dicha temperatura.

3.2.3. Liofilización

Las muestras previamente congeladas mediante inmersión en nitrógeno líquido fueron deshidratadas mediante un equipo liofilizador Telstar LyoQuest. Las condiciones de trabajo fueron una presión de 0.3 mbar y una temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el colector. Posteriormente se mantuvieron a una temperatura de $-20 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su utilización.

Las muestras liofilizadas, fueron rehidratadas hasta conseguir el contenido en humedad similar al de la muestra fresca. Para ello, se llevó a cabo su inmersión en agua destilada a una temperatura de $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una agitación constante de 100 rpm en un baño vaivén (Unitronic 320 OR).

3.2.4. Secado convectivo

La instalación experimental utilizada consta de un secadero convectivo a escala de laboratorio (Figura 3.7) el cual se diseñó y construyó específicamente para el secado de frutas y hortalizas. Dicho equipo está completamente automatizado y dispone de control de temperatura y velocidad de flujo, siendo dicho flujo *es* perpendicular al lecho de muestras.

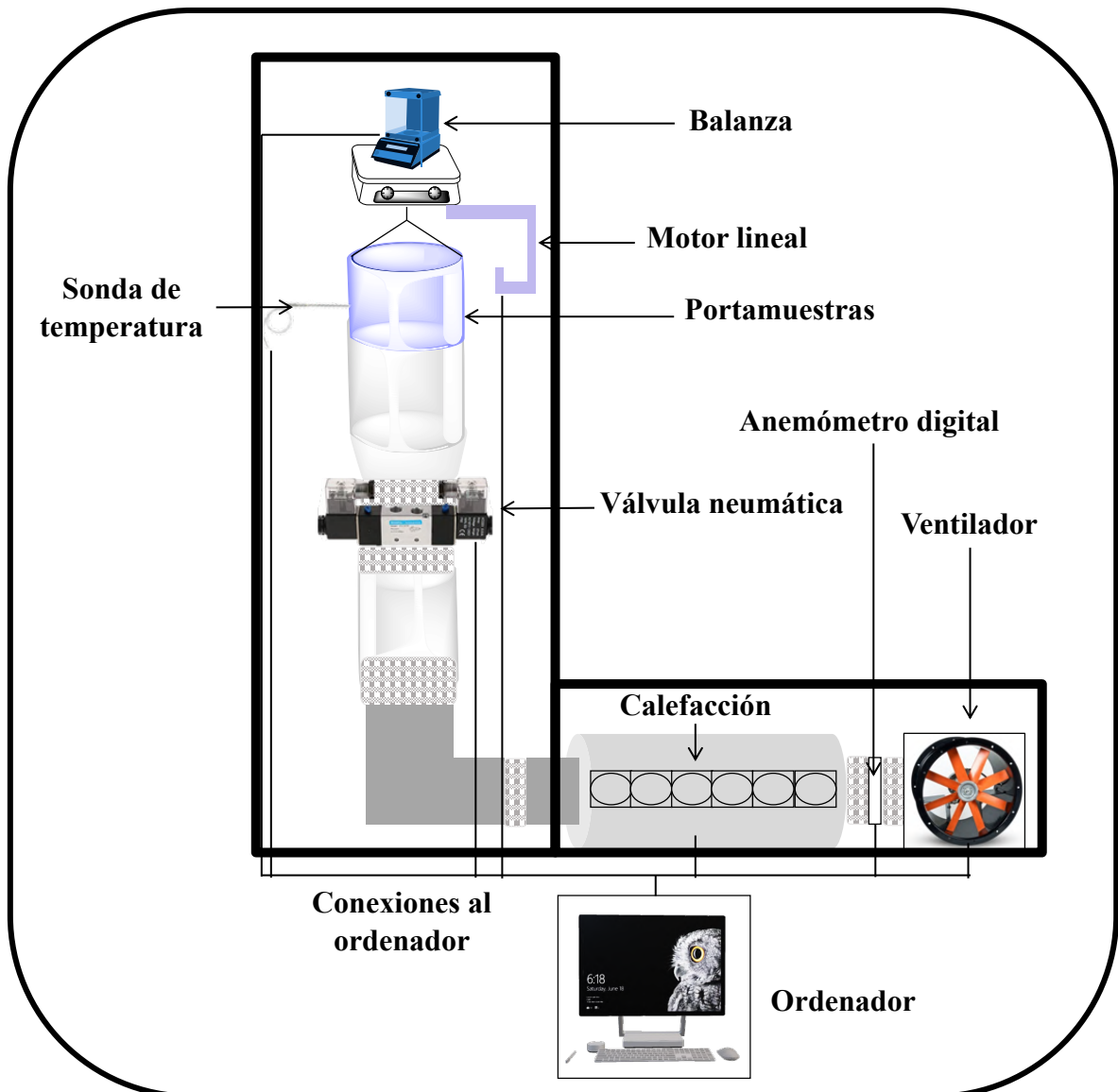


Figura 3.7: Secadero convectivo de vegetales a escala de laboratorio

El secadero utilizado para el secado de las muestras está equipado con una resistencia eléctrica de 3000 W (a 220 V) que calienta el aire a su paso y es regulada por un controlador de proceso (ONROM Sysmac CQMI) que mide y digitaliza el valor de la temperatura del aire. El sistema de ventilación consiste en un soplante centrífugo de media presión (COT-100, Soler & Palou, España) que impulsa el aire de secado a través del sistema de calefacción hasta la canastilla portamuestras. La velocidad de aire se mide con un anemómetro digital de rueda

alada (DTA 4000, Tekkal, Italia) y es controlada por el ordenador, que actúa sobre un variador de frecuencia (Inversor DV-551, Panasonic, USA). La muestra que debe secarse se coloca a la salida del conducto de aire en una canastilla metálica con su parte inferior de malla de $2 \cdot 10^{-3}$ m de luz. Las pesadas se realizan con un sistema automatizado de adquisición de datos mediante una balanza digital (COBOS, C-6200CBC, España). El control del secadero se realiza mediante una aplicación informática programada en LabView® (National Instruments, USA). La aplicación permite establecer las condiciones de operación del secadero, mediante la selección de los valores de consigna de las variables (temperatura y velocidad del aire), el intervalo de tiempo entre pesadas y los criterios de finalización de operación, que pueden ser, el tiempo de secado o la pérdida de peso de la muestra.

Las condiciones de temperatura y velocidad de aire fueron 60 °C y 2 m/s respectivamente. Al iniciarse el proceso se reguló la temperatura y la velocidad de consigna y se entiende que la temperatura se ha estabilizado cuando se mantiene constante (± 0.1 °C) durante un mínimo de 1 min. Posteriormente se colocó la muestra en el interior de la canastilla portamuestras de tal modo que no hubiera contacto entre muestras y que construyeran una monocapa. El aire de secado, impulsado por la soplante a través del sistema de calefacción, atravesaba de manera perpendicular la superficie inferior de la canastilla durante el proceso. El sistema de adquisición automática de datos permitió disponer de medidas del peso de la muestra a diferentes intervalos de tiempo, en nuestro caso fue cada 5 min. El proceso de secado se detuvo automáticamente una vez alcanzada la pérdida de peso del 80%.

Al finalizar el proceso de secado las muestras fueron rehidratadas hasta conseguir el contenido en humedad de la muestra fresca mediante su inmersión en agua destilada a una temperatura de 37 ± 1 °C con una agitación constante de 100 rpm en un baño vaivén (Unitronic 320 OR).

3.2.5. Digestión gástrica in vitro

El proceso de digestión in vitro utilizado en la presente tesis doctoral se seleccionó siguiendo el árbol de decisión presentado en la Figura 1.23. Se decidió realizar un proceso de digestión in vitro estática ya que los compuestos a analizar son compuestos antioxidantes mayoritariamente hidrofílicos, se dispone de un número de muestras considerable y se pretende realizar un estudio comparativo entre muestras. El proceso de digestión in vitro fue diseñado como una sucesión de dos etapas: una primera etapa de salivación y una segunda de digestión gástrica, dichas etapas presentan modificaciones respecto al modelo de digestión in vitro

estática estandarizado presentado por Brodkorb et al. (2019), sin embargo dichas modificaciones se encuadran dentro de lo aceptado en el documento consensuado.

La saliva se preparó con una combinación de mucina (1 g/L), α -amilasa (75 U/mL), NaCl (0.117 g/L), KCl (0.149 g/L) y NaHCO₃ (0.210 g/L) en una base de agua destilada a pH 7 (Bornhorst, Roman, Dreschler, & Singh, 2014; Bornhorst & Singh, 2013). Las soluciones se realizaron a una temperatura de 21 ± 2 °C. La α -amilasa de *Bacillus subtilis* se adquirió en MP Biomedicals (Francia), y la mucina del estómago porcino en Sigma Aldrich (USA).

El jugo gástrico se preparó con pepsina (2000 U/mL), 1.50 g/L de mucina y 8.78 g/L de NaCl, en agua destilada a pH entre 1.8 - 2.0 que se ajustó con HCl 0.1 N (Bornhorst et al., 2014; Bornhorst & Singh, 2013). Las soluciones se realizaron a una temperatura de 21 ± 2 °C. La pepsina gástrica de porcino fue adquirida de Sigma Aldrich (USA).

Todos los procesos de incubación, definiendo incubación como el tiempo durante el cual las muestras permanecen en contacto con los jugos de la digestión, se realizaron en recipientes opacos de plástico y en un baño de vaivén (Unitronic 320 OR). En todos los experimentos se mantuvieron constantes las concentraciones iniciales de los sustratos de la digestión, y la temperatura y agitación del baño (37 ± 1 °C y 100 rpm).

Los diferentes parámetros (humedad, sólidos solubles, acidez titulable, compuestos fenólicos y actividad antioxidante) fueron analizados antes de la incubación, después de la etapa de salivación y a 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 180 min de digestión gástrica. Los experimentos de digestión se realizaron por triplicado y cada parámetro se analizó por triplicado en cada uno de los tiempos.

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Análisis químico general

Todas las determinaciones químicas se realizaron por triplicado, excepto aquellas en que el número de réplicas se indica expresamente.

3.3.1.1. Contenido en humedad

Para determinar el contenido de humedad de las muestras se siguió el procedimiento descrito por la AOAC número 934.06 (AOAC, 1997). Se secaron aproximadamente 2 g de muestra en una estufa de vacío (Vaciotem-T, Selecta, España) a 80 ± 2 °C hasta peso constante

(aproximadamente 24 h). A partir de la variación de peso se calculó el valor del contenido en humedad.

3.3.1.2. Sólidos solubles

El contenido en sólidos solubles de las muestras se determinó a 21 ± 2 °C con un refractómetro Abbe 325 Zuzi siguiendo el procedimiento descrito por la AOAC 932-14C (AOAC, 1990).

3.3.1.3. Acidez titulable

La acidez titulable se midió siguiendo el procedimiento descrito por la AOAC 942.15 (AOAC, 1998). Se midió mediante una titulación del zumo de la fruta que se preparó triturando 5 cubos de muestra (aproximadamente 1.5 g) en 20 ml de agua destilada durante 1 min a 13.5 rpm mediante un Ultra-Turrax (T25 Digital IKA, Staufen, Germany). Este zumo fue titulado con NaOH 0,1 M hasta pH 8,1 usando un medidor de pH digital. Las mediciones se realizaron por sextuplicado.

3.3.2. Extracción de la fibra dietética. Residuo insoluble en alcohol

La determinación del contenido en fibra y de la composición de los principales tipos de polisacáridos presentes en el concentrado de fibra alimentaria de las muestras requiere la extracción de los polisacáridos (material procedente de las paredes celulares) mediante el método conocido como residuo insoluble en alcohol (AIR) (Femenia, García-Pascual, Simal, & Rosselló, 2003).

Para la obtención del AIR se pesaron 15 cubos de muestra que es tratada con una mezcla EtOH/H₂O hasta conseguir una disolución al 85% de etanol, dicha mezcla se homogeniza mediante un Ultra-Turrax (T25 Digital IKA, Staufen, Germany) durante 1 min a 13000 rpm. A continuación, la mezcla se hierve durante 5 min para conseguir la inactivación enzimática y se homogeniza en Ultra-Turrax durante 2-3 min para volver a hervir durante 1 min. La solución se filtró al vacío utilizando filtros Whatman GF/C (filtro de microfibras de vidrio, libre de celulosa). El filtrado se descarta y el residuo sólido se suspende nuevamente en etanol 85%, repitiéndose, después, los pasos de homogeneización, ebullición y filtración. Esta operación se repite con etanol absoluto y acetona. El residuo sólido resultante se deja a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h para la evaporación del disolvente, obteniendo, así, el AIR o concentrado de fibra formado mayoritariamente por los componentes de las paredes celulares de la manzana.

A partir del AIR, se realizan las determinaciones de contenido en azúcares neutros y ácidos urónicos. Para dichas determinaciones el AIR debe ser sometido a un proceso previo de trituración y tamizado (0.5 mm).

3.3.3. Caracterización de la fracción de fibra dietética

Los azúcares, unidades básicas de los diferentes tipos de polisacáridos que forman las paredes celulares primarias de las muestras, fueron liberados mediante un proceso de hidrólisis descrito por González-Centeno et al. (2010).

Para cada una de las muestras se pesaron 5 mg del AIR, se mezclaron con 200 μ L de H_2SO_4 12M y se incubaron durante 3h a temperatura ambiente, con el objetivo de solubilizar la celulosa mediante la rotura de los enlaces de hidrógeno que mantienen compacta su estructura. A continuación, se adicionó agua hasta diluir el medio a una concentración 1 M de H_2SO_4 y se incubó a 100 °C durante 2.5 h, produciéndose así la hidrólisis total de los polisacáridos de la pared celular.

3.3.3.1. Identificación y cuantificación de los azúcares neutros

Una vez que las muestras fueron hidrolizadas, a cada una de ellas se les añadió una cantidad conocida de patrón interno 2-deoxy-glucosa (200 μ g), con el objetivo de determinar de forma cuantitativa la presencia de unidades de ramnosa (Rha), fucosa (Fuc), arabinosa (Ara), xilosa (Xyl), manosa (Man), galactosa (Gal) y glucosa (Glu). Para dicho objetivo se realiza una recta de calibrado con estándares de los azúcares mencionados anteriormente (0.05-0.2 mg azúcar/mL).

A continuación, 1 ml de las soluciones resultantes fue neutralizado con NH_3 25 % hasta conseguir un pH neutro o básico. Seguidamente se añaden 100 μ L de NH_3 3 M que contenía $NaBH_4$ (15 %, w/v), como agente reductor, así se consigue la rotura de los ciclos que presentan los azúcares en su estructura y su paso a alditoles (reducción del grupo aldehído a alcohol). Posteriormente, las muestras fueron incubadas a 30 °C durante 1 h, y una vez enfriadas mediante un baño de agua-hielo se les adicionó 100 μ L de CH_3COOH glacial.

Una vez homogeneizadas, 300 μ L de las soluciones resultantes se hicieron reaccionar con anhídrido acético utilizando 1-metil-imidazol como catalizador y se incubó durante 30 min a 30 °C. De esta manera, se obtuvieron los alditol-acetatos correspondientes, que son compuestos detectables mediante cromatografía de gases.

Estos compuestos fueron extraídos por una extracción líquido-líquido con CH_2Cl_2 , que consistió en separar la fase orgánica, que contiene los alditol-acetatos, mediante centrifugación (2000 rpm, 1 min), eliminando la fase acuosa por aspiración y, posteriormente, las muestras fueron llevadas hasta la sequedad con una corriente de argón a 40 °C.

Después de la derivatización, los azúcares neutros, convertidos en sus correspondientes alditol-acetatos, fueron redisoluertos en CH_2Cl_2 para su separación isotérmica a 220 °C mediante cromatografía de gases (Hewlett-Packard 5890A, Alemania). La columna utilizada fue del tipo OV225 con 3% Chromosorb WHP 100/120 y el gas portador utilizado fue argón con un caudal de 25 mL/min. Las temperaturas del inyector y del detector FID se fijaron a 230 y 240 °C, respectivamente. Los datos fueron expresados como mg de azúcar/100g dm_0 .

3.3.3.2. Cuantificación de los ácidos urónicos

El contenido de ácidos urónicos se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por Blumenkrantz & Asboe-Hansen (1973), aplicándole ciertas modificaciones. El ácido galacturónico disuelto en ácido benzoico saturado fue utilizado como patrón para realizar la recta de calibrado (0-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Del mismo modo que en la determinación de los azúcares neutros, hay una etapa previa de hidrólisis, donde se pesaron 5 mg del AIR de cada una de las muestras, se mezclaron con 200 μl de H_2SO_4 12M y se incubaron durante 3h a temperatura ambiente. A continuación, se adicionó agua hasta diluir el medio a una concentración 1 M de H_2SO_4 y se incubó a 100 °C durante 1 h.

Posteriormente, 0.5 mL de las soluciones hidrolizadas se diluyeron con agua destilada dependiendo de la concentración de la muestra. Dichas soluciones se adicionaron sobre 3 mL de NaBO_2 50 mM en H_2SO_4 concentrado (previamente congelado). Esta mezcla se calentó a 100 °C durante 10 min. Después de enfriar las disoluciones en un baño de agua-hielo, se añadió 100 μl de una disolución de m-fenilfenol 0.15 % (w/v, en NaOH 0.5 % (w/v) como disolvente), a todas las muestras excepto a los blancos, apareciendo una tonalidad rosada debido a la reacción de este compuesto con el ácido galacturónico. Pasados aproximadamente 30 min, tiempo en que las muestras se encontraron en condiciones de oscuridad, se procedió a la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 524 nm mediante un espectrofotómetro UV/vis modelo Cary Bio 300 (Varian, USA). El análisis se realizó por duplicado y con un blanco por muestra. Los datos fueron expresados como mg ácido galacturónico/100g dm_0 .

3.3.3.3. Composición en celulosa, hemicelulosa y pectinas

A partir de la concentración de los azúcares neutros y de los ácidos urónicos se calculó, de forma aproximada, la composición en pectinas, celulosa, y hemicelulosa de los concentrados de fibra de cada una de las muestras (ecuaciones [3.1], [3.2] y [3.3], respectivamente).

$$[3.1] \quad \%pectinas = \frac{[Rha]+[Ara]+[Gal]+[Urónicos]}{Azúcares\ totales} \cdot 100$$

$$[3.2.] \quad \%celulosa = \frac{0.9 \cdot [Glc]}{Azúcares\ totales} \cdot 100$$

$$[3.3] \quad \%hemicelulosa = \frac{[Fuc]+[Xyl]+[Man]+0.1 \cdot [Glc]}{Azúcares\ totales} \cdot 100$$

3.3.4. Extracción de compuestos antioxidantes

Los extractos metanólicos se prepararon de acuerdo con la metodología descrita por Eim et al. (2013) con algunas modificaciones. Las muestras se pesaron y se les añadió 20 mL de metanol (MeOH) que actuó como el disolvente de extracción. La mezcla se homogeneizó usando un Ultra-Turrax (T25 Digital IKA, Staufen, Germany) a 13.000 rpm durante 2 min, y a continuación, la solución obtenida se refrigeró a 4.0 ± 0.5 °C durante un tiempo mínimo de 17 h. Las mezclas se centrifugaron a 4.000 rpm durante 10 min, y posteriormente el sobrenadante se filtró con papel Whatman N° 4 y se almacenó a 4.0 ± 0.5 °C en oscuridad un máximo de 6 días. A partir de los extractos obtenidos se determinó el contenido en fenólicos totales y la actividad antioxidante.

3.3.5. Caracterización de la fracción fenólica

3.3.5.1. Contenido en Fenólicos totales

El contenido total en compuestos fenólicos de las muestras se determinó en base al método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1965), con ciertas modificaciones para ser adaptado al análisis en microplacas (Eim et al., 2013).

En cada pocillo de la microplaca se introdujo una alícuota de 25 μ L de extracto metanólico que se diluyó con 80 μ L de agua destilada, se le adicionaron 5 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu y se incubó durante 5 min a 25 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 80 μ L de Na₂CO₃ al 7.5% (w/v). Se midió la absorbancia a 765 nm cada 5 min, durante 30 min.

El contenido de compuestos fenólicos totales se calculó a partir de una calibración con ácido gálico (GA, 25 – 250 ppm). Todos los resultados se calcularon como la media de tres determinaciones y se expresaron como mg ácido gálico/g dm₀.

3.3.5.2. Contenido en Flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales se determinó por lectura de la absorbancia de la muestra a 370 nm (Dewanto, Wu, Adom, & Rui Hai Liu, 2002). El análisis se realizó a 25 °C con el espectrofotómetro UV/Vis MultiSkan Spectrum (Thermo Scientific, Finlandia) utilizando catequina como estándar de calibración (0-0.1 mg/mL). Los resultados, calculados como valor medio de tres réplicas, se expresaron en mg de catequinas/100 g de muestra fresca.

3.3.5.3. Identificación y cuantificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se determinaron por el método de HPLC descrito por M'hiri et al. (2015) al cual se realizaron algunas modificaciones. El análisis cuantitativo se realizó utilizando un sistema analítico de HPLC (Milford MA, Waters, Reino Unido) que consiste en una bomba Waters 600E, un detector de fotodiodos Waters 2966 y un inyector automático Waters 717 plus controlado por software (Empower).

Para la detección de flavanonas (naringina, hesperidina y neohesperidina) y ácidos fenólicos (ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido p-cumárico) de los subproductos de naranja, se inyectaron 10 µL de extracto en la columna C18 de fase inversa (150 × 3,9 mm, tamaño de partícula de 5 µm, Symmetry, EE. UU.) y la fase móvil consistió en una mezcla de disolvente A, ácido acético/agua (3%) y disolvente B, metanol-ácido acético (3%). Se realizó un programa de gradiente que se llevó a cabo de la siguiente manera: 5 min, 10% B; 30 min, 100% B; 45 min, 100% B; 47 min, 10% de B. El caudal fue de 1 ml/min y la temperatura de la columna fue de 40 ° C. Se detectaron flavanonas (naringina, hesperidina y neohesperidina) y ácidos fenólicos (ácido ferúlico, ácido sinápico y ácido p-cumárico) a longitudes de onda de 280 y 320 nm, respectivamente. Los análisis se realizaron al menos tres veces y solo se informaron los valores medios. La cuantificación se llevó a cabo utilizando el método estándar externo y las concentraciones finales se calcularon en mg/100 g dm.

3.3.5.4. Actividad antioxidante

La capacidad antioxidante que se le atribuye a la fracción fenólica de los vegetales incluye múltiples mecanismos de actuación desde un punto de vista químico. Por esta razón, no hay una metodología analítica que permita por sí sola, cuantificar la capacidad antioxidante y, por tanto, para su determinación se recomienda el uso combinado de diferentes métodos (Pellegrini et al., 2003).

En este estudio se han considerado tres métodos espectrofotométricos: ABTS, CUPRAC y FRAP basados en reacciones de transferencia de electrones.

a) Método ABTS

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS se basó en la metodología descrita por Re et al. (1999), a la cual se realizaron ciertas modificaciones para adaptarla al análisis con microplacas (González-Centeno et al., 2012).

Para la preparación del catión radical ABTS se mezclaron volúmenes equivalentes (1:1) de dos disoluciones acuosas diferentes: por una parte, una disolución 7 mM de ABTS (ácido 2,2'-Azinobis-(3-etilBenzoTiazolina-6-Sulfónico) y por otra una disolución 2.45 mM de $K_2S_2O_8$. Esta disolución madre se dejó reaccionar durante 16 h a 21 ± 2 °C en condiciones de oscuridad, para ser utilizada en las próximas 48 h, conservada bajo las mismas condiciones. En el momento del análisis se realizó una dilución de la disolución madre: 8 mL de dicha disolución se diluyeron con EtOH/H₂O (25/75, v/v) hasta un volumen final de 100 mL.

En cada pocillo de la microplaca se introdujeron 190 μ L del reactivo ABTS y se dejó incubar durante 10 min a 25 °C. Después de este tiempo se realizó una lectura de la absorbancia (A_0) a una longitud de onda de 734 nm, a continuación, se procedió a iniciar la reacción (Figura 3.8) añadiendo 10 μ L de la extracción metanólica de la muestra en cada pocillo. La mezcla se dejó reaccionar bajo las mismas condiciones durante 30 min, tras los cuales se realizó la lectura de la absorbancia a la misma longitud de onda (A_1).

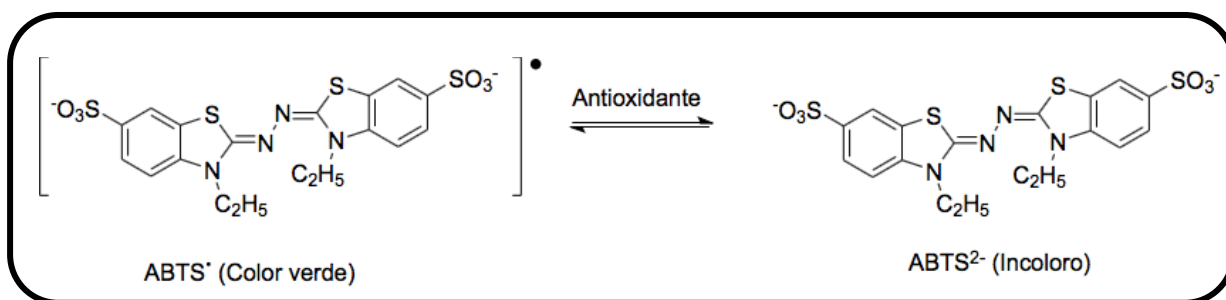


Figura 3.8: Principio químico del método ABTS Huang et al. (2005)

El cálculo de la capacidad oxidante se realiza a partir de la diferencia entre las absorbancias A_1 y A_0 que se correlacionó con una recta de calibrado obtenida a partir de concentraciones conocidas (comprendidas entre 25 y 800 μ M) del estándar Trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E).

b) Método CUPRAC

La evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método de CUPRAC (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) se basó en la metodología descrita por Apak et al. (2004) que se modificó para adaptarla al análisis con microplacas (González-Centeno et al., 2012).

El reactivo CUPRAC se preparó el mismo día del análisis, mezclando volúmenes equivalentes (1:1:1, v/v/v) de tres disoluciones diferentes: de una disolución acuosa 10 mM de Cu(II), de una disolución de neocuproína 7.5 mM en EtOH 96 % y de una disolución tampón acetato de amonio 1 M a pH 7.

El protocolo y las condiciones experimentales, así como los cálculos para determinar la capacidad antioxidante fueron las mismas que los utilizados en el caso del método de ABTS, pero en este caso las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 450 nm (Figura 3.9).

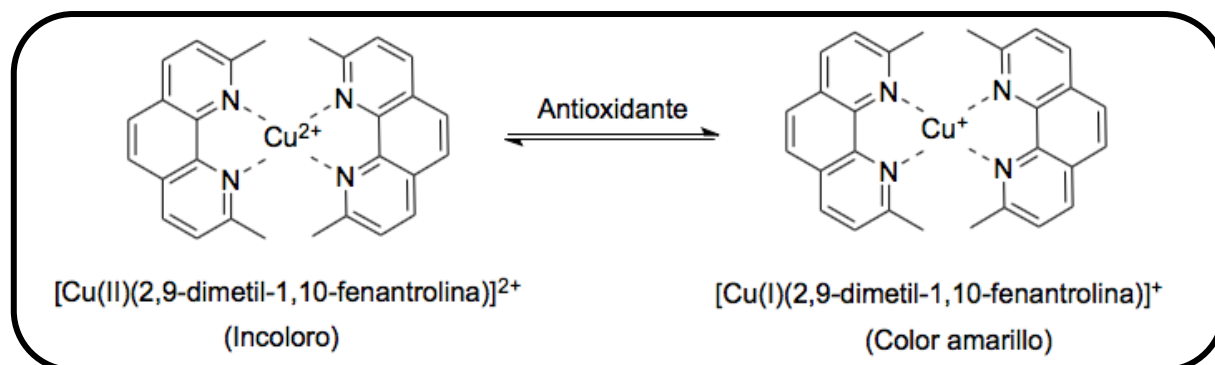


Figura 3.9: Principio químico del método CUPRAC Huang et al. (2005)

c) Método FRAP

El tercer método utilizado para la determinación de la capacidad antioxidante fue el método de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) que se modificó del método original (Benzie & Strain, 1996) para adaptarla al análisis en microplacas (González-Centeno et al., 2012).

Para la preparación del reactivo FRAP el mismo día del análisis, se mezclaron tres disoluciones diferentes en la proporción (1:1:10, v/v/v): una disolución 0.01 M de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazine), una de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.02 M y un tampón acético-acetato (de pH 3.6, preparado con 3.1 g de CH_3COONa y 16 mL de CH_3COOH glacial por 1000 ml de solución tampón).

El protocolo y las condiciones experimentales, así como los cálculos para determinar la capacidad antioxidante fueron las mismas que los utilizados en el caso del método de ABTS y CUPRAC, pero en este caso las lecturas de absorbancia se realizaron a una longitud de onda de 593 nm (Figura 3.10).

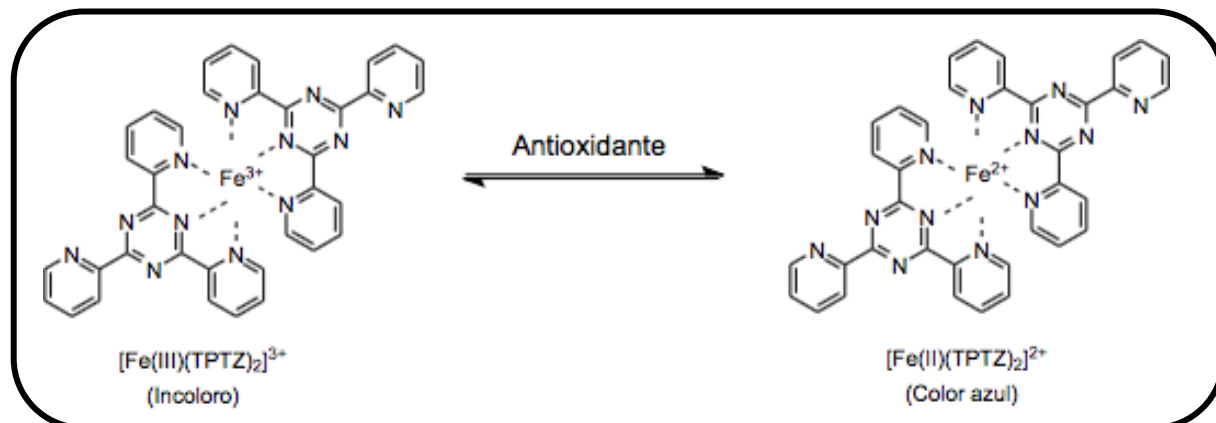


Figura 3.10: Principio químico del método FRAP Huang et al. (2005)

3.3.6. Análisis microestructural y morfológico

Para evaluar, desde el punto de vista microscópico, los cambios en la textura de la fruta después de su procesado y de la digestión in vitro se han utilizado dos técnicas: la microscopía óptica y la microscopía electrónica de barrido (SEM).

3.3.6.1. Microscopía óptica

Las muestras se fijaron por inmersión en formaldehído al 5% (v/v). Para el proceso de inclusión, las muestras se lavaron con agua destilada y se deshidrataron mediante sucesivas inmersiones en soluciones EtOH/H₂O en diferentes proporciones. El etanol se retiró de las muestras posteriormente mediante lavados con xileno absoluto. Finalmente, las muestras se sumergieron en parafina a 60 °C (Kerdpiboon, Devahastin, & Kerr, 2007).

Posteriormente, estas muestras se cortaron con un microtomo (Finesse 325, Thermo Shandon, China) obteniéndose láminas de 4-5 μm de espesor y se fijaron en un portaobjetos. A continuación, se realizó la tinción de las muestras mediante la técnica histoquímica basada en la reacción de PAS (Periodic Acid Schiff), ya que dicha técnica es la más utilizada para la detección de hidratos de carbono, libres o conjugados, de los tejidos (McLaughlin, 1983).

En primer lugar, se realizó una etapa de desparafinado mediante la inmersión en xileno absoluto, a continuación, se produce una hidratación de la muestra mediante su inmersión en soluciones EtOH/H₂O de diferentes proporciones. Posteriormente, las muestras son sumergidas en ácido periódico que es el causante de la modificación química del tejido mediante la

oxidación de los hidroxilos con la consiguiente formación de grupos aldehídos que son los que reaccionan con el reactivo de Schiff dando un color rojizo brillante. Después de un lavado con agua destilada, las muestras fueron sumergidas en hematoxilina, un colorante básico que presenta afinidad con el ADN, de tal manera que pone de manifiesto el núcleo de la célula. Al terminar la etapa de tinción, tiene lugar la deshidratación mediante la inmersión en soluciones EtOH/H₂O de diferentes proporciones y su inmersión final en xileno. Finalmente, se realizó el montaje en un portaobjetos utilizando DPX como medio de montaje.

3.3.6.2. Microscopía electrónica de barrido

La microestructura de las muestras se observó de acuerdo con la metodología propuesta por Minjares-Fuentes et al. (2014). Las muestras 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.

3.3.6.3. Análisis de imagen

Las fotografías del microscopio óptico y 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. (licencia Creative commons). Las imágenes en escala de grises se convirtieron en imágenes binarias (Figura 3.11) y se limpiaron con la función de filtro de despegado. Se analizaron las características de las partículas (número, tamaño y forma) mediante la función ‘analyze particles’.

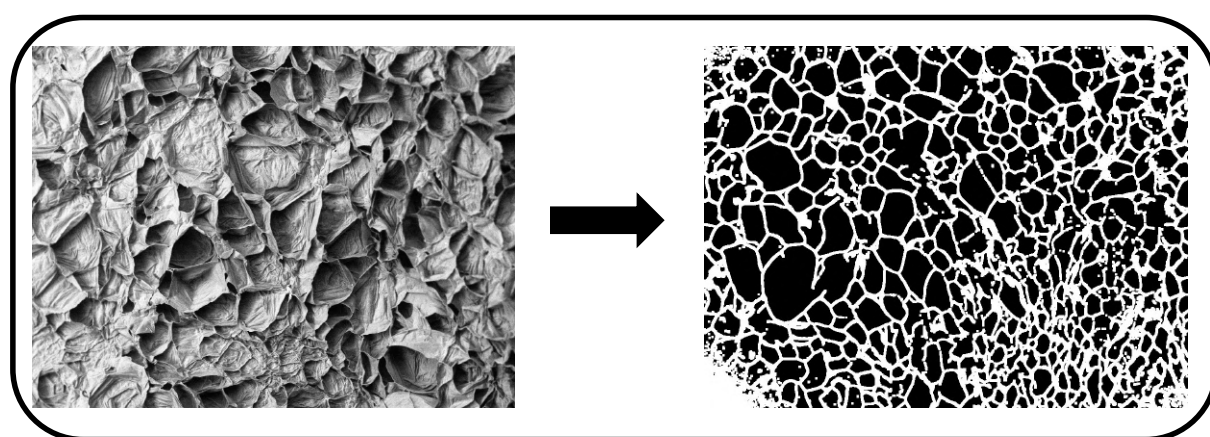


Figura 3.11: Conversión de las imágenes del microscopio en imágenes binarias mediante el software Image J.

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.).

3.4. Modelización

Para la modelización de las cinéticas de bioaccesibilidad y extracción de los compuestos antioxidantes se utilizó el modelo empírico de Weibull (ecuación [3.4]).

$$[3.4]. \quad \frac{c - c_{eq}}{c_o - c_{eq}} = e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta}$$

Donde C_{eq} , α y β son los parámetros del modelo. El parámetro C_{eq} es la concentración de equilibrio, el parámetro α está relacionado con la cinética del proceso presentando una relación inversa a la velocidad de reacción (Blasco, García-Pérez, Bon, Carreres, & Mulet, 2006). El parámetro β representa un parámetro de forma que describe el comportamiento del compuesto durante el proceso, cuando $\beta = 1$ corresponde a un proceso con una cinética de primer orden, por tanto, tiene una velocidad constante, cuando $\beta > 1$ o $\beta < 1$ indica la concavidad (aumento de la velocidad con el tiempo) o la convexidad (disminución de la velocidad con el tiempo) del proceso, respectivamente.

En el caso de la modelización de las cinéticas de extracción de compuestos antioxidantes, el parámetro α se interpretó como una constante de reacción cinética dependiente de la temperatura de acuerdo con una ecuación tipo Arrhenius (ecuación [3.5]).

$$[3.5] \quad \frac{1}{\alpha} = k_o \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}}$$

La función objetivo a minimizar para la identificación paramétrica del modelo de Weibull fue el error relativo medio (ERM, ecuación [3.6]) calculado mediante los valores experimentales y los estimados por el modelo.

$$[3.6] \quad ERM = \frac{100}{N} \sum_{i=1}^N \frac{|Z_{exp_i} - Z_{calc_i}|}{Z_{exp_i}}$$

donde Z_{exp} son los valores obtenidos experimentalmente, Z_{calc} son los valores correspondientes a la estimación y N es el número total de pruebas.

La identificación de los parámetros del modelo de Weibull se llevó a cabo utilizando las herramientas de optimización de Matlab 7.5 (The MathWorks Inc., Natick, USA),

concretamente utilizando la función ‘nlinfit’. Los correspondientes intervalos de confianza (IC) se calcularon con la función ‘nlparci’ y el error estándar asociado (ES) a partir de la matriz de covarianza.

Para evaluar la correlación entre los valores experimentales y los valores calculados, y consecuentemente la calidad del ajuste de los mismos, se utilizaron los parámetros estadísticos error relativo medio (ERM, ecuación [3.6]) y el porcentaje de varianza explicada (VAR, ecuación [3.7]) (Baş & Boyacı, 2007; Eim, Garcia-Perez, Rossello, Femenia, & Simal, 2012; Noordin, Venkatesh, Sharif, Elting, & Abdullah, 2004).

$$[3.7] \quad VAR = \left[1 - \left(\frac{s_{yx}}{s_y} \right) \right] \cdot 100$$

donde s_{yx} es la desviación estándar de la muestra y s_y es la desviación estándar de la correspondiente estimación.

3.5. Tratamiento 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 3.1.0, 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 los datos siguieron una distribución normal y presentaron homogeneidad de varianzas, se utilizaron los test paramétricos ANOVA y Tukey para evaluar, respectivamente, la existencia y grado de diferencias significativas. Dichos análisis estadísticos fueron substituidos por las correspondientes pruebas no paramétricas, Kruskal-Wallis y Pairwise-Wilcox (con corrección BH), cuando los datos no presentaron una distribución normal y/o presentaban heterogeneidad de varianzas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

3.6. Diseño experimental

En la presente tesis doctoral se plantearon dos objetivos específicos. En primer lugar, el estudio de la extracción acuosa de compuestos antioxidantes asistida con ultrasonidos de potencia (Diseño experimental I). A continuación, se ha estudiado el efecto del procesado (secado y congelación) sobre la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos (Diseño

experimental II). Las Figura 3.12 y Figura 3.13 ilustran el diseño experimental utilizado para la consecución de cada uno de los objetivos, respectivamente.

El diseño experimental I (Figura 3.12) se planteó con el propósito de analizar el proceso de extracción acústica en fase acuosa de compuestos antioxidantes de los residuos de naranja, a diferentes temperaturas y densidades acústicas.

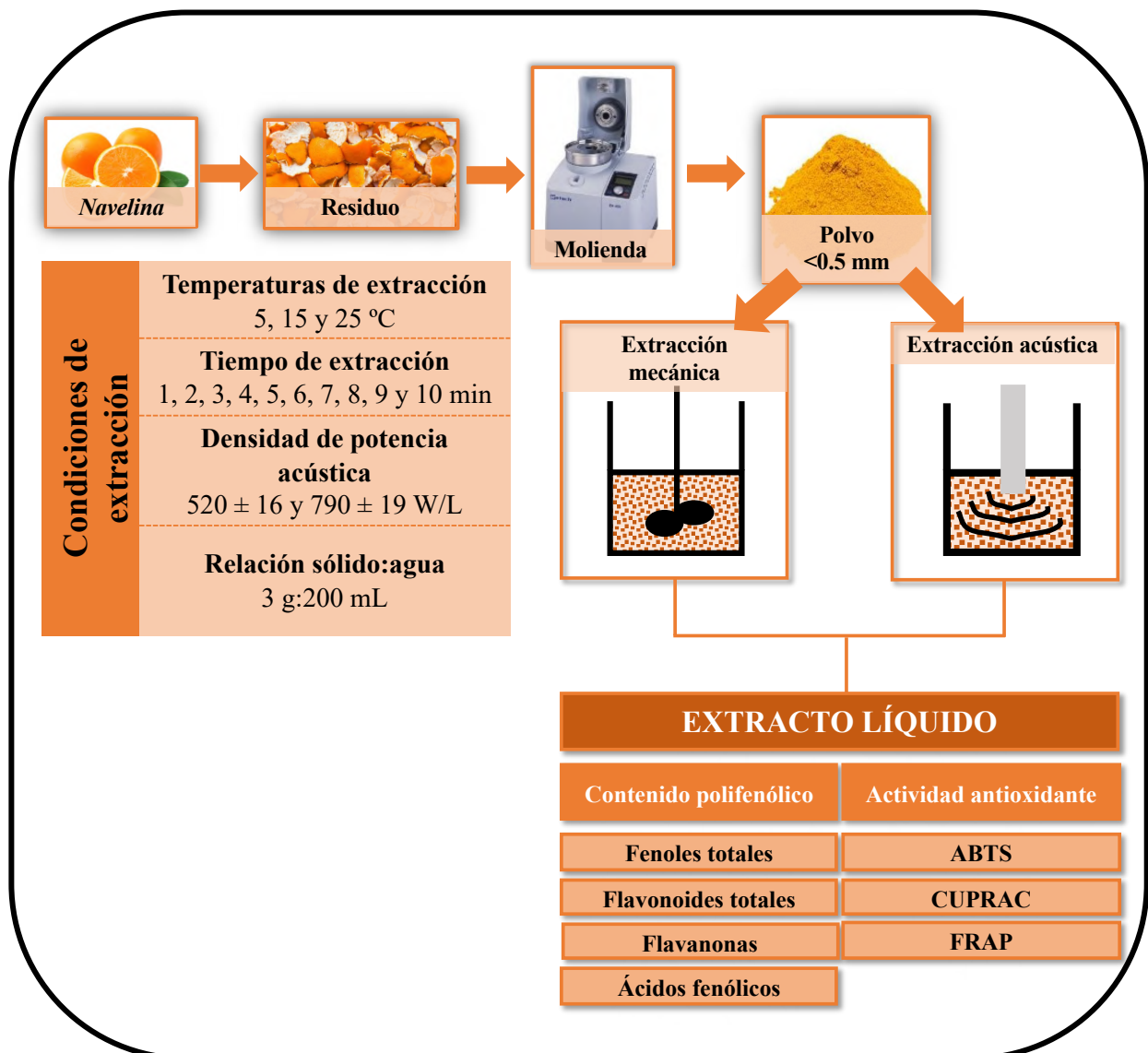


Figura 3.12: Diseño experimental I para el estudio de la extracción asistida con ultrasonidos de potencia de compuestos antioxidantes de residuos de naranja en fase acuosa

De forma previa a la extracción se realizó la molienda y el tamizado de la muestra para trabajar con un tamaño de partícula uniforme (<0.5 mm). La extracción se llevó a cabo en un vaso encamisado, con recirculación de refrigerante, para asegurar el control de temperatura durante todo el proceso. La ratio sólido-líquido fue de 1:66 (w/v, g/mL), utilizando agua como disolvente de extracción ($V_{\text{total}}=200$ mL).

Se realizaron dos series de experimentos a tres temperaturas 5, 15 y 25 °C aplicando diferente potencia acústica mediante el equipo extractor II (Figura 3.6). Como control se realizaron extracciones con agitación mecánica, haciendo uso del equipo extractor I (Figura 3.5). Se realizaron tres replicados de extracción por temperatura y serie de experimentos.

Todas las experiencias tuvieron una duración de 10 min, tomándose alícuotas de 2 mL de extracto líquido a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 min. El mismo día de la extracción, dichas alícuotas se filtraron (RC, 0.45 µm) y se sometieron a un análisis del contenido fenólico y de la actividad antioxidante.

El diseño experimental II, esquematizado en la Figura 3.13, tuvo por objeto estudiar el papel que el procesado de alimentos puede jugar en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos en distintas materias primas.

El estudio se aplicó a las materias primas manzana de la variedad *Granny Smith* y remolacha de la variedad *Conditiva*. Estas dos materias primas, presentan diferencias en la porosidad de su matriz; la manzana presenta una estructura de porosidad intermedia mientras que la remolacha presenta una estructura mucho más compacta.

En primer lugar, se llevó a cabo una selección de la materia prima según el contenido en sólidos solubles y seguidamente se acondicionó la muestra con el fin de conseguir cubos de 1x1 cm y equidistantes del corazón de la muestra.

Una vez acondicionada la muestra se llevó a cabo su procesado. Las muestras, tanto de manzana como de remolacha, se sometieron a dos tipos de secado: un secado convectivo a una temperatura de 60 °C y una velocidad del aire de 2 m/s y un secado por liofilización a una presión de 0.3 mbar. Por otra parte, las muestras se sometieron a un proceso de congelación: la manzana a un proceso de congelación rápida a -196 °C y por su parte la remolacha a tres tipos de procesos de congelación, una congelación lenta a -20 °C, un proceso de congelación con una velocidad intermedia a -80 °C y finalmente a un proceso de congelación rápida a -196 °C.

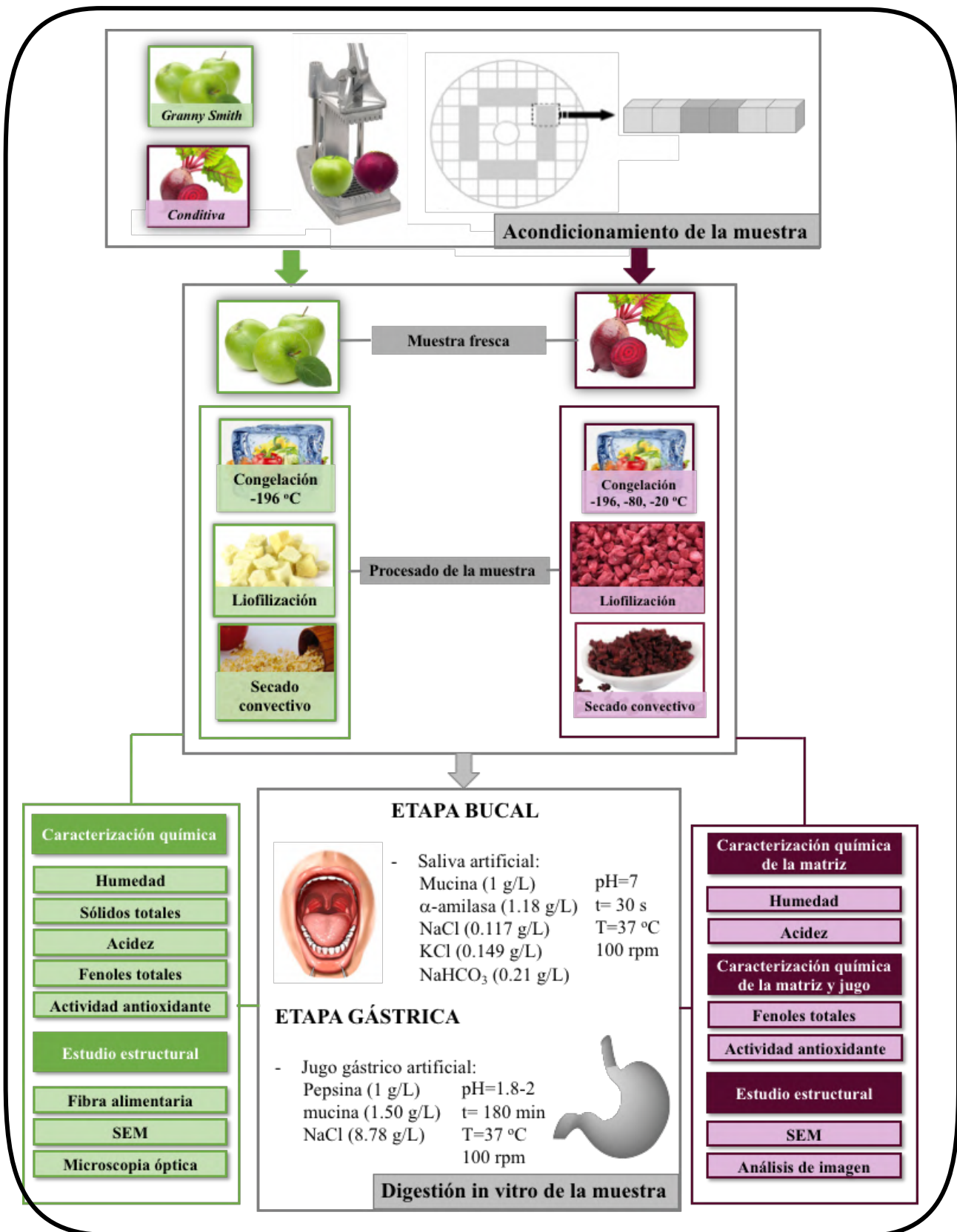


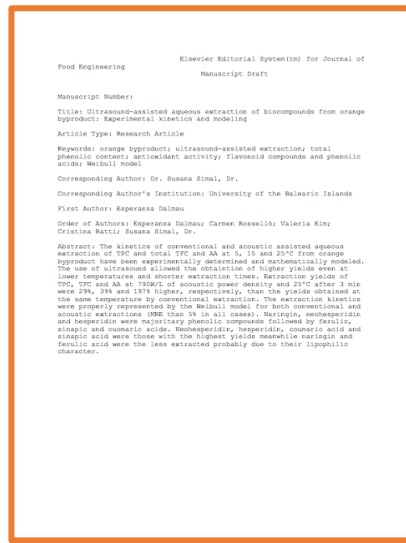
Figura 3.13: Diseño experimental para el estudio del efecto de distintos procesados sobre la bioaccessibilidad de los compuestos antioxidantes de diferentes productos

Posteriormente, tanto las muestras procesadas como las muestras frescas (control), se sometieron a un proceso de digestión in vitro estática. Este proceso consistió en una primera etapa de digestión bucal, donde las muestras se sumergieron durante 10 s en una saliva artificial, y en una segunda etapa de digestión gástrica, donde las muestras se sumergieron en un jugo gástrico artificial durante 180 min. Tanto la etapa bucal como la etapa gástrica se realizaron a 37 °C y con una agitación de 100 rpm. Se realizaron tres replicados de digestión in vitro para cada una de las distintas muestras.

Todos los experimentos se prolongaron durante 180 min, tomándose muestras de sólido, en el caso de la manzana, y de sólido y jugo gástrico en el caso de la remolacha. El muestreo se realizó a 10 s (etapa bucal), y a 10, 20, 30, 45, 60, 90 y 180 min (etapa gástrica). Dichas muestras, se sometieron a distintos tipos de análisis de caracterización química y estructural. Cada uno de los análisis se realizó por triplicado para cada una de las muestras a distintos tiempos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



CAPÍTULO I

Ultrasound-assisted aqueous extraction of biocompounds from orange byproduct: Experimental kinetics and modeling

Maria Esperanza Dalmau, Carmen Rosselló, Valeria Eim, Cristina Ratti, Susana Simal

Journal of Food Engineering

Under Review

Índice de impacto (2017): 3.625

Food science & Technology, Q1 (26/135)

Ultrasound-assisted aqueous extraction of biocompounds from orange byproduct: Experimental kinetics and modeling

Esperanza Dalmau^a, Carmen Rosselló^a, Valeria Eim^a, Cristina Ratti^b, Susana Simal^{a}*

^a*Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, Ctra. Valldemossa km. 7.5, 07122, Palma de Mallorca, Spain*

^b*Department of Soils Science and Agri-Food Engineering, Institute of Nutrition and Functional Foods (INAF), Laval University, Québec, QC, Canada*

* Corresponding author: Susana Simal Tel.: +34 971259599 Email: Susana.simal@uib.es

Abstract: The kinetics of conventional and acoustic assisted aqueous extraction of TPC and total TFC and AA at 5, 15 and 25°C from orange byproduct have been experimentally determined and mathematically modeled. The use of ultrasound allowed the obtaintion of higher yields even at lower temperatures and shorter extraction times. Extraction yields of TPC, TFC and AA at 790W/L of acoustic power density and 25°C after 3 min were 29%, 39% and 197% higher, respectively, than the yields obtained at the same temperature by conventional extraction. The extraction kinetics were properly represented by the Weibull model for both conventional and acoustic extractions (MRE than 5% in all cases). Naringin, neohesperidin and hesperidin were majoritary phenolic compounds followed by ferulic, sinapic and cuomarc acids. Neohesperidin, hesperidin, coumaric acid and sinapic acid were those with the highest yields meanwhile naringin and ferulic acid were the less extracted probably due to their lipophilic character.

Keywords: orange byproduct; ultrasound-assisted extraction; total phenolic content; antioxidant activity; flavonoid compounds and phenolic acids; Weibull model

Nomenclature:

AA	antioxidant activity	mg trolox/g dm
C	concentration	g/g dm or g/100 g dm
C _{max}	initial concentration	g/g dm or g/100 g dm
C _{eq}	equilibrium concentration	g/g dm or g/100 g dm
C _p	Specific heat	J/Kg °C
CI	confidence intervals	
dm	dry matter	
E _a	Activation energy	J/mol
GAE	gallic acid equivalent	
m	mass	kg
MRE	mean relative error	(%)
n	number of observations	
P	ultrasound power	W
SE	standard error	

t	time	s
T	temperature	°C
TFC	total flavonoid content	mg catechin/100 g dm
TPC	total polyphenol content	mg GAE/g dm
UAE	Ultrasound assisted extraction	
Y	Extraction yield	(%)
Y_{calc}	calculated extraction yield	(%)
Y_{eq}	Equilibrium extraction yield	(%)
Y_{exp}	Experimental extraction yield	(%)
α	kinetic reaction constant of the Weibull model	s^{-1}
α_0	Pre-exponential factor in Arrhenius equation	s^{-1}
β	shape parameter of the Weibull model	

1. INTRODUCTION

Spain produces more than one million tons/year of oranges, being the largest producer of this fruit worldwide. The industrial use of part of these oranges, especially for the production of juice, results in the accumulation of high amounts of byproducts (37800 tons/year (Ros et al., 2012), mainly peel and flesh, which account for about half of the fruit weight. In Spain, the waste from orange juice production is typically used as animal feed or discarded. However, this byproduct is rich in numerous biologically active compounds such as vitamin C, phenolic acids and flavonoids (Hernández-Carranza et al., 2016). Currently, the extraction of these compounds with bioactive activity from the orange juice byproducts has had considerable scientific interest to use them as natural source of antioxidants speciality for food formulation to prevent the lipids oxidation (Hernández-Carranza et al., 2016). In recent years, a lot of studys has based on plants and their by-products to extract natural and inexpensive antioxidants that can replace synthetic antioxidants such as butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT), which might be carcinogenic, liver-damaging and more generally toxic (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Scientists have studied various processes for extracting compounds with bioactive activity from citrus peels. These processes include conventional solvent extraction, supercritical CO₂ extraction, pressurized fluid extraction, extraction assisted by microwave and extraction assisted by enzyme (Routray & Orsat, 2012). In the last decades, intensive study in this area of

knowledge has managed to develop of more friendly to the environment and efficient extraction methods. Among the main characteristics of the ultrasound assisted extraction (UAE) it is worth to mention the lower extraction times and temperatures, and higher extraction yields (Ahmad-Qasem et al., 2013), in comparison to conventional extraction. The benefist effect of ultrasonic application can be attributed to the cavitation bubbles in the propagation of the ultrasonic waves (Mason et al., 2011). Collapse of bubbles can cause chemical, physical and mechanical effects, which can produce biological cell walls disruption to improve mass transport of solvent into vegetal cells and facilitate the extraction of bioactive compounds (Vinatoru, 2001). Optimization of ultrasonic-assisted extraction has been described to extract total phenolic content from olives leaves (var. Serrana) (Ahmad-Qasem et al., 2013), mineral elements and sugars, carotenoids from apple juice (Abid et al., 2014), and total phenolic content and total monomeric anthocyanin from eggplant peel (*Salanum melongena L.*) (Dranca and Oroian, 2016). In these studies, methanol was a suitable extraction solvent to obtain good yields of the bioactive compounds. Nevertheless, non-toxic food grade and environmentally benign organic solvents are recommended for bioactive compounds extraction by both the directive 2009/32/EC of the European Parliament and the US Food and Drug Administration (Bartnick, D.D., Mohler, C.M., Houlihan, 2006).

In all cases, extraction yields of the bioactive compounds depend on the different operating experimental conditions, there being a recent interest in optimizing all these operating variables to the best utilization of time, energy, solvent and/or raw material (González-Centeno, Comas-Serra, Femenia, Rosselló, & Simal, 2015). From a food technology point of view, in the last decades mathematical modeling has been widely used for this aim, since it provides a low-cost and quick determination of the effects of the experimental parameters on the extraction process. A better explanation of the mass transfer mechanisms was achieved by determined of the kinetics parameters and their interaction with the conditions of process, facilitating the control, optimization and design of industrial processes (Ahmad-Qasem et al., 2013; González-Centeno et al., 2015). Extraction kinetics can be based empirical or phenomenological equations. The empirical equations, which are formulated from experimental results, tried to determine the important parameters of the process and the interaction between them. However, they do not explain the physical parameters of extracción process, these models can be useful for simplifying the study of difficult systems, complex to formulate and/or solve and for industril applications by phenomenological models (Rodríguez et al., 2014). As is the case of the extraction of bioactive compounds from plant materials, due to and multicomponent complexity of the mass transfer mechanisms and the heterogeneity of the samples.

A bibliography research did not yield any reference of earlier studies on the modeling of the UAE of phenolic compounds using mathematical equations and food grade solvent like water. After all, the main aim of the present study was to evaluate the effects of two temperature and application or not of power ultrasound on the extraction rate of polyphenolics compounds and antioxidant activity from orange juice byproducts. Also, this study had as aim proposing an empirical model to simulate both extraction process, using mechanical agitation or ultrasound power, which properly relates changes in antioxidant compounds and antioxidant activity of the aqueous extracts with the ultrasonic power density, time and extraction temperature.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Plant material

Oranges (var. Navelina) purchased from a local supermarket whose juice had a soluble solid content of 11.0 ± 0.5 °Brix were selected. After the juice extraction, the byproducts, composed of both flavedo and albedo, was separated as raw material for the study. In order to obtain a homogeneous and stable byproducts, the raw material was subjected to 5 min steamed; drying in a freeze-dryer (Telstar LyoQuest, Barcelona) operating at a temperature of -50 °C and a vacuum pressure of 30 Pa until a final moisture content of 6.93 ± 0.07 kg H₂O/100 kg dm; grinding (0.355-0.710 mm screen) with a blade mixer (A10, Analysenmühle, IKA, Germany) and storage at 4 °C until use. This final byproduct was analyzed to determine its TPC (Total Polyphenol Content), TFC (Total Flavonoid Content), AA (Antioxidant Activity) (by using the ABTS, FRAP, and CUPRAC assays) and antioxidant compounds by HPLC method.

2.2. Convencional and acoustic extraction process

Extraction process was carried out following the extraction method reported by González-Centeno et al., (2015). Extraction solvent used was water and a solid/solvent ratio was of 1:60 (w/v, g/mL) with a total extraction volume of 200 mL.

Both conventional and ultrasound-assisted extraction processes at three different temperatures (5.0 ± 0.3 °C, 15 ± 1 °C and 25 ± 2 °C) were carried out. Conventional extraction process (CE) was conducted with mechanical agitation (80 rpm) by using a stirrer (RZR 2021, Heidolph, Germany) with a 4-blade propeller (50 mm diameter), puted at the central point of the extraction vessel. In the ultrasonic-assisted extractions (UAE), the stirrer was replaced by an ultrasonic probe system (UP400S, Hielscher Ultrasound Technology, Germany) immersed into the extraction solution and working in cycles of 0.5 s. Thus, UAE was carried out by using

two different probes, of 40 mm (UAE1) and 14 mm (UAE2), in order to test different acoustic power densities. Three replicates were carried out of each experiment.

At different times of extraction process (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 30 min) were taken extract aliquots (2 mL), filtered (RC-membrane, 0.45 μm , Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany) and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until they were analyzed. These aliquots were determined their TPC, TFC, AA (by using the ABTS, FRAP, and CUPRAC assays) and antioxidant compounds by HPLC method.

2.3. Characterization of the ultrasonic power density

Before a ultrasonic-assisted extraction processes, a calorimetric method was used to determine the real ultrasonic power density transferred into the volum of solid-liquid extraction, following the method reported by Kimura et al (1996).

2.4. Total polyphenol content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity (AA)

Total polyphenol content (TPC) was determined by method of the Folin-Ciocalteu in accordance with Eim et al. (2013) and the total flavonoid content (TFC) by by method of the Aluminum chloride in accordance with Leontowicz et al. (2003). According to González-Centeno et al. (2012), the antioxidant activity (AA) was analyzed using the ABTS, CUPRAC and FRAP methods. The TPC was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g dm. The TFC was expressed as mg catechin/100 g dm. The AA was expressed as mg Trolox/100 g dm. All analyses were performed in triplicate. The extraction yield (Y) of TPC, TFC, and AA (using the ABTS, CUPRAC and FRAP assays) at each extraction time, was expressed as indicated in equation 1.

$$Y = \frac{C}{C_{max}} \cdot 100 \quad (1)$$

where C_{max} is the concentration in the initial byproduct and C is the concentration of the extract at each extraction time referred to the initial dry matter of the sample

2.5. Mathematical modeling

For establish a method to evaluate the mass transfer proceding during the mecanic and acoustic-assistend experiments of antioxidants compounds from orange juice byproduct, a Weibull model was proposed (Eq. 2).

$$\frac{C - C_{eq}}{C_o - C_{eq}} = e^{\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right]} \quad (2)$$

In this model (Eq. 2), C_{eq} is the equilibrium concentration which was equal to the experimental value after 30 min of extraction (González-Centeno et al., 2015), and C_o is the initial concentration in the extract (equal to zero). The α parameter of the Weibull model can be related to the inverse of the extraction rate. Therefore, a lower α means faster rate of extraction. In general, the parameter α is observed to be dependent on the temperature according to an Arrhenius type equation (Eq. 3) (González-Centeno et al., 2015):

$$\alpha = \alpha_o \cdot e^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)} \quad (3)$$

The β parameter represent a shape parameter, which explain a behavior of material during the extraction process (Sturzoiu et al., 2011). The β parameter equal to 1 with a constant release velocity corresponds to a first order kinetic (Eim et al., 2013). Nevertheless, when parameter β is above 1, the release velocity increases with time, and when β is below 1 the release velocity decreases with time. (Odrizola-Serrano et al., 2008).

Taking into account equations 1, 2 and 3, the proposed model could be written as follows (Eq. 4):

$$Y = Y_{eq} \left[1 - e^{\left[-\left[\frac{t}{\alpha_o \cdot e^{\left(-\frac{E_a}{RT}\right)}} \right]^\beta \right]} \right] \quad (4)$$

For each determination (TPC, TFC and AA), all the experimental data obtained at different extraction temperatures and times were used to carry out the identification of parameters of the Weibull model (k_o , E_a and β of Eq. 4) for each set of experiments (CE, UAE1 and UAE2). The ‘fitlm’ function of the optimization toolbox of Matlab R2014a (The MathWorks Inc., USA) was used to indentificate the model parameters. The covariance matrix and the ‘coefCI’ function were used to determine the standard error of the estimated parameters (SE) and the 95% confidence intervals (CI), respectively.

2.6. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis

The polyphenol compounds were determined by HPLC as described by M’hiri et al. (M’hiri et al., 2015) with some modifications. Sinapic acid, ferulic acid and p-coumaric acid (phenolic acids) and herperidin, naringin and neohesperidin (flavanones) were determined at

320 and 280 nm, respectively. The external standards method was used to quantification and the concentrations were calculated in mg/100 g dm. All analyses were carried out in triplicate.

2.7. Statistical analysis

Results are presented as mean values with their corresponding standard deviations. Statistical analyses were carried out following the procedure described by Dalmau et al. (2017). Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

The mean relative error (MRE, Eq. 5), calculated by the similarity of experimental and simulated results, was estimated to evaluate the precision of the proposed mathematical equation to simulate the extraction kinetics.

$$MRE = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left(\frac{|Y_{iexp} - Y_{ical}|}{Y_{iexp}} \right) \quad (5)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

A calorimetric method described before was used to determine the acoustic power density (W/L) in the system used in this study, for the UAE1 and UAE 2 experiments. By dividing the ultrasonic power by the total extraction volume, the obtained acoustic densities were of 520 ± 16 W/L for the 40 mm probe (UAE1) and of 790 ± 19 W/L for the 14 mm (UAE2) probe.

Table 1: Total polyphenol (TPC) and flavonoid (TFC) contents, antioxidant activity (AA) (ABTS, CUPRAC and FRAP assays) and contents of main flavonoids and phenolic acids of initial orange byproduct before extraction. Means and deviations.

		mean \pm deviation
TPC (mg GAE/100 g dm)		1674 \pm 15
TFC (mg catechin/100 g dm)		2849 \pm 8
AA (mg trolox/100 g dm)	ABTS assay	2810 \pm 20
	CUPRAC assay	2760 \pm 50
	FRAP assay	1820 \pm 70
Flavonoids (mg/100 g dm)	Naringin	1100 \pm 40
	Neohesperidin	660 \pm 50
	Hesperidin	660 \pm 11
Phenolic acids (mg/100 g dm)	Acid coumaric	25 \pm 2
	Acid ferulic	158 \pm 13
	Acid sinapic	95 \pm 3

The initial TPC, TFC and the AA of the byproduct are shown in table 1. These results are in agreement with the findings of Wang et al. (2016) for TPC (1650 ± 50 mg GAE/100 g dm), with Sade-Omaba et al. (2015) for TFC (4.2 ± 0.02 mg QE/g dm), with Zhang et al. (2014) and Gironés-Vilaplana et al. (2014) for AA by ABTS and FRAP, respectively (2670 ± 200 and 1480 ± 300 mg Trolox/100 g dm, respectively).

3.1. Kinetics of biocompounds extraction

The TPC, TFC and AA (by using the ABTS, FRAP, and CUPRAC assays) of extracts taken at 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 and 30 min of extraction were determined to evaluate the kinetics of extraction. Results of the AA obtained by the three proposed methods (ABTS, FRAC and CUPRAC) were highly, significantly and positively correlated ($r^2 \geq 0.86$; $p < 0.05$)

Therefore, the results of the AA extraction obtained by only one of the three methods (ABTS assay) are presented.

Table 2 shows the equilibrium yields in the extracts, calculated from the extracts concentrations after 30 min of extraction, of total polyphenol (TPC) and total flavonoid (TFC) contents, and antioxidant activity (AA) (ABTS assay) for mechanical agitation (CE at 80 rpm) and acoustically assisted (UAE1 at 520 W/L; UAE2 at 790 W/L) extraction and the observed temperature dependence within the 5-25°C temperature range. The equilibrium extraction yield of TPC was constant with the temperature but increased when ultrasound were applied ca 11 % (UAE1) and 23 % (UAE2). However, the equilibrium extraction yield of TFC and AA linearly ($r^2 > 0.98$) increased with the temperature in all cases, but also with the acoustic power density (except at 25°C for TFC extraction under UAE1 and UAE2 conditions). In the case of the AA equilibrium yield, the effect of the ultrasound was more intense than that of the temperature, increasing from ca 37 % in CE experiments to 68 % in UAE1 and 92 % in UAE2 as average. These important increases in the AA yield may be due to the enhanced solubility of analytes within the extraction solvent and to the positive sum of analytes that previously did not have original antioxidant activity and those that lost their original antioxidant activity (Ghafoor et al., 2009).

The experimental curves of extraction yield of the total phenolic and total flavonoid contents, and antioxidant activity (ABTS assay) from orange byproduct at different temperatures (5, 15 and 25°C), with mechanical agitation (CE at 80 rpm) and with acoustic assistance (UAE1 at 520 W/L; and UAE2 at 790 W/L), are shown (dots) in Figures 1a (TPC), 1b (TFC) and 1c (AA). It can be observed in figure 1a that most of the TPC extraction took

place during the first 200 s of the process, the yields increasing sharply from 0 to 60 s and less pronouncedly from 60 s onwards, except for the experiment at 5°C under mechanical agitation (CE), in which the yield kept increasing during the 600 s of the experiment. The effect of the temperature was observed mainly in the first part of the curves (from 0 to 200 s). This effect of temperature was probably due to the enhanced diffusion velocity from the matrix and change of solubility of analytes with the extraction solvent (Liu and Tsai, 2012). This influence was more evident in the experiments carried out under mechanical agitation. These results are in accordance with the results of Jeong et al. (2004), for mechanic phenolic and antioxidant activity extraction from citrus unshiu peel in temperature range from 50 to 150 °C. However, usually, when temperature isn't too high (lower than 60-70°C) her effect is positive, because the antioxidants compounds are degradables at higher temperatures, thus reducing the extraction rate (Hojnik et al., 2008).

Table 2. Equilibrium extraction yields (%) of total polyphenol (TPC) and total flavonoid (TFC) contents, and antioxidant activity (AA) (ABTS assay) for mechanical agitation (CE at 80 rpm) and acoustically assisted (UAE1 at 520 W/L; UAE2 at 790 W/L) extraction and their observed temperature dependence within the 5-25°C temperature range.

	Y _{eq} (%)		
	CE	UAE1	UAE2
TPC	67.3 ± 1.1 T dependence not observed	74.7 ± 1.8 T dependence not observed	83.0 ± 0.4 T dependence not observed
TFC	Y _{eq} = 0.302 T(°C) + 48.74 r ² = 0.993	Y _{eq} = 1.398 T(°C) + 46.28 r ² = 0.988	Y _{eq} = 0.977 T(°C) + 55.64 r ² = 0.989
AA (ABTS assay)	Y _{eq} = 0.063 T(°C) + 36.17 r ² = 0.982	Y _{eq} = 0.153 T(°C) + 65.35 r ² = 0.989	Y _{eq} = 0.317 T(°C) + 86.92 r ² = 0.990

An important effect of ultrasound was observed at all studied temperatures, the TPC extraction yield significantly ($p < 0.05$) increasing by applying ultrasound, i.e. 22, 19 and 13 % increases at 5, 15 and 25°C, respectively, when comparing yields in UAE1 experiments to those of CE experiments after 600 s of extraction. The increase of acoustic power density from 520 (UAE1) to 790 W/L (UAE2) also promoted increases in the extraction yield of 16 ± 2 % within the 5-25°C temperature range. By comparing results in table 2 and figure 1a, it can be seen that TPC yields after 5 min of extraction when ultrasound were used, were very similar to those at the considered equilibrium (maximum observed figures). However, more time was needed, even to reach lower figures, when extraction was carried out by using agitation.

With regard to the experimental results, even the extraction yield curve of TPC at 25 °C with agitation located under the corresponding curves at 5 and 15°C with ultrasound assistance

(Figure 1a). These results show that ultrasonic assistance to extraction enabled carrying out at lower temperatures than the mechanical extraction keeping up the extraction velocity or even increasing it. Similar phenomenus were previously indicated by other authors; Cho et al. (2006) indicated that only 1 min of extraction with ultrasonic assistance at 25 °C got the same amounts of resveratrol from grape stems that 30 min of mechanical extraction at 60 °C; González-Centeno et al. (2015) showed that mechanical extraction of total polyphenol content at 35 and 50 °C from grape pomace did not have significant differences with acoustic extractions carried out at 20 and 35 °C, respectively.

The effects of both temperature and ultrasound on the TFC extraction yield curves (Figure 1b) were different to those observed for the TPC extraction, although also in this case, most of the TFC extraction took place during the first 200 s slightly increasing from this time onwards. The effect of temperature was important, the TFC extraction yield increasing 18 and 27 % in CE experiments; 29 and 42 % in UAE1 experiments; and 16 and 33 % in UAE2 experiments; when temperature increased from 5 to 15 and 25°C, respectively, after 600 s of process. The effect of the ultrasound application was also important, although the extraction yield curves at 520 and 790 W/L at each temperature were almost coincident, specially at 15 and 25°C, indicating that the increase of the acoustic power density did not promote increases in the TFC yield extraction within this acoustic power density range. Again, the TFC yield curves at any temperature obtained by using agitation located under those obtained by acoustic assistance extraction.

With regard to the antioxidant activity extraction (Figure 1c), most of the AA extraction took place during the first moments of the process, the curves being almost flat after 100-200 s of extraction, depending on the temperature. The extraction yield curves at every temperature were very similar among them, within each group of experiments (CE, UAE1 and UAE2), thus, the effect of the extraction temperature was low; however, an important effect of the ultrasound application on the curves was observed, both the initial rate of extraction and the final extraction yield after 600 s significantly ($p < 0.05$) increasing when ultrasound were applied at 520 and 790 W/L. The equilibrium extraction yields (Table 2) only increased by 3.5 %, 4.6 % and 7.2 % from 5 to 25°C in CE, UAE1 and UAE2 experiments, respectively; however, they increased ca. 82 ± 1 % at 520 W/L of acoustic power density, and 147 ± 4 % at 790 W/L of acoustic power density, as average within the 5-25°C temperature range.

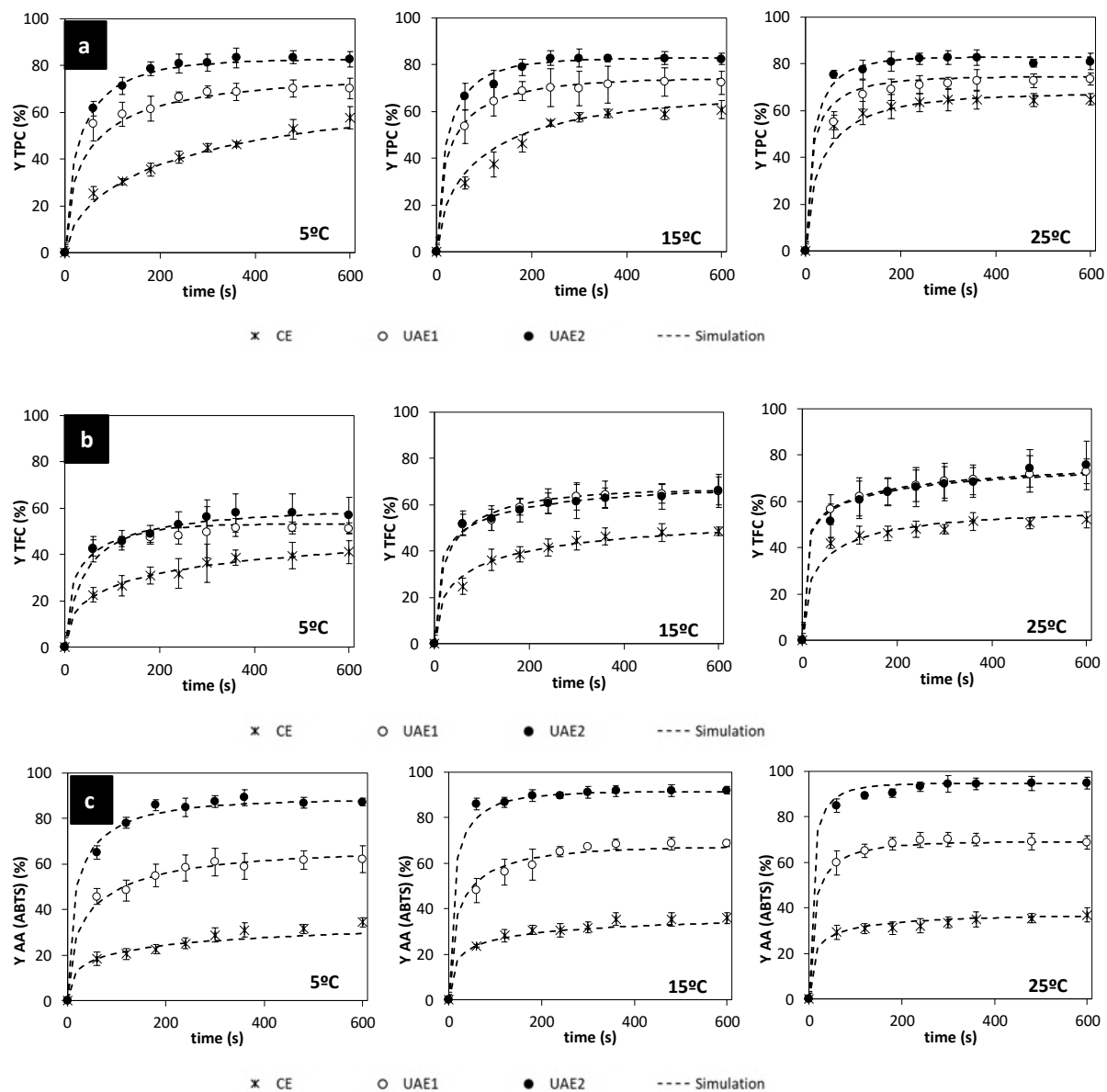


Figure 1: Experimental (average \pm deviation) and simulated extraction yield curves of TPC(a), TFC(b) and antioxidant activity (c) (AA, ABTS assay) from orange byproduct at different temperatures (5, 15 and 25°C) under mechanical agitation (CE at 80 rpm) and acoustically assisted (UAE1 at 520 W/L; UAE2 at 790 W/L) conditions.

Similar results were obtained by Um et al. (2018) in the acoustic extraction (30 °C, 30 min, and 50% ethanol) of TPC, TFC and ABTS from rugose rose fruit (50.7–96.7, 15.9–31.9, and 3.1–6.1 mg/g, respectively). Khan et al., (2010) observed that TPC obtained by UAE (40 °C, 150 W, 80% ethanol) from orange peel (*Citrus sinensis L.*) during 30 min was 1.4-folds higher than by conventional extraction.

Accordingly, the yields of total polyphenol and flavonoid contents and antioxidant activity of the extracts obtained from the conventional extraction process carried out at 5 °C,

were the lowest between all the experimental conditions proved ($p < 0.05$). Expressly, polyphenolic content after 5 min of process at this temperature was 750 ± 30 mg GAE/100 g dm; flavonoid content was 90 ± 8 mg catequin/100 g dm and antioxidant activity, 810 ± 80 mg Trolox/100 g dm (ABTS assay), 760 ± 60 mg trolox/100 g dm (CUPRAC assay) and 910 ± 90 mg Trolox/100 g dm (FRAP assay).

Moreover, as showed in Figures 1 and 2, ultrasonic assistance promoted a significant decrease of the extraction time required to obtain aqueous extracts with similar phenolic, flavonoid and antioxidant contents. Particularly, the UAE1 ultrasonic process was ca 10 times shorter than the CE process to show similar total polyphenolic recovery (~ 1120 mg GAE/100 g dm). Similar behaviors were observed for flavonoids and antioxidant activity extraction. In line with the present research, Khan et al. (2010) indicated that the ultrasound-assisted extraction (25 kHz, 90 W, with an ultrasonic transducer plate) of phenolics compounds from orange peels during 10 min, obtained extracts with the same characteristics as the Soxhlet process in 60 min. Ma et al. (2008) reported that the total phenolic content of extracts from Satsuma Mandarin peel after 10 min of ultrasonic extraction (8 W at 30 °C) was six times higher than that obtained with conventional extraction (without shaking at 40 °C) during 1 h. González-Centeno et al. 2015 concluded that the acoustic extraction process (435 W/L) of polyphenolic content from grape pomace needed about 3, 4 and 8 times less of time than the mechanical process (60 min) to show the same total phenolic yields at 20, 35 and 50 °C, respectively.

Finally, in this study, the highest extraction yields after 10 min of extraction of phenolic (1389 ± 72 mg GAE/100 g dm) and flavonoid (200 ± 19 mg catequin/100 g dm) contents and antioxidant activity (2672 ± 89 mg Trolox/100 g dm (ABTS assay), 2145 ± 55 mg Trolox/100 g dm (CUPRAC assay) and 1687 ± 72 mg Trolox/100 g dm (FRAP assay)) were obtained at 25°C by UAE at 790 W/L.

The Weibull model was used to mathematically describe the aqueous conventional (mechanical agitation) and ultrasonically assisted extraction of phenolic and flavonoid compounds and antioxidant activity (ABTS assay) from orange byproduct taking into account the effect of the temperature (from 5 to 25°C) according to equation 5.

By using the experimental results of total polyphenol (TPC) and total flavonoid (TFC) contents, and antioxidant activity (AA) (ABTS assay) obtained at different extraction times and temperatures by mechanical agitation (CE) and ultrasound (UAE1 at 520 W/L; UAE2 at 790 W/L) together with the equilibrium extraction yields shown Table 2, and considering the initial extraction yield equal to zero, the α_0 , E_a and β parameters were identified for each set of

experiments (CE, UAE1 and UAE2). Results obtained in these identifications are shown in Table 3 together with the confidence intervals and standard errors (SE) associated to each parameter.

	CE			UAE1			UAE2			
	value	Confidence interval	SE	value	Confidence interval	SE	value	Confidence interval	SE	
TPC	α_0 (s ⁻¹)	4.09x10 ⁻¹⁰	[3.14x10 ⁻¹⁰ , 5.04x10 ⁻¹⁰]	9.9	5.09x10 ⁻⁷	[4.01x10 ⁻⁷ , 6.17x10 ⁻⁷]	0.4	1.69x10 ⁻³	[-7.36x10 ⁻³ , 1.07x10 ⁻²]	0.3
	E_a (J/mol)	62948.8	[46732, 79165]	5727	43058.2	[32556.6, 53559.8]	1783	23103.4	[10666.3, 35552.5]	4394
	β	0.609	[0.467, 0.751]	0.1	0.529	[0.438, 0.620]	0.7	0.618	[0.457, 0.780]	0.1
TFC	α_0 (s ⁻¹)	1.83x10 ⁻⁷	[1.37x10 ⁻⁷ , 2.28x10 ⁻⁷]	0.49	5.76x10 ⁻²	[4.40x10 ⁻² , 7.11x10 ⁻²]	0.7	5.77x10 ⁻²	[4.3x10 ⁻² , 7.2x10 ⁻³]	0.4
	E_a (J/mol)	48065.9	[35472, 60659]	4147	15518.9	[11564, 19473]	170	15518.8	[11429, 19608.7]	4039
	β	0.460	[0.356, 0.564]	0.1	0.025	[0.019, 0.031]	0.8	0.009	[0.007, 0.011]	0.1
AA (ABTS)	α_0 (s ⁻¹)	5.31x10 ⁻¹¹	[4.17x10 ⁻¹¹ , 6.45x10 ⁻¹¹]	0.49	1.28x10 ⁻⁷	[9.88x10 ⁻⁸ , 1.56x10 ⁻⁷]	0.6	5.01x10 ⁻⁷	[3.9x10 ⁻⁷ , 6.1x10 ⁻⁷]	0.7
	E_a (J/mol)	66300.2	[48057, 84543]	4816	46010.7	[34667, 57355]	159	41050.3	[30342, 51758]	2305
	β	0.371	[0.285, 0.457]	0.1	0.501	[0.375, 0.625]	0.8	0.502	[0.381, 0.622]	0.2

Table 3: Identified parameters (α_0 , E_a and β) for the proposed Weibull model to simulate the extraction yield curves of total polyphenol (TPC) and total flavonoid (TFC) contents, and antioxidant activity (AA) (ABTS assay) for mechanical agitation (CE at 80 rpm) and acoustically assisted (UAE1 at 520 W/L; UAE2 at 790 W/L) extraction; together with the confidence interval and standard error associated to each parameter.

As it can be seen from the figures shown in Table 3, α exhibited the effects of both the temperature and the ultrasound application on the extraction rate. In general, α decreased with the increase of the temperature and the acoustic power density. Thus, α values for mechanical extraction (CE) ranged, for temperatures between 5 and 25 °C, from 279 to 45 s⁻¹ for TPC; and from 199 to 49 s⁻¹ for TFC; and from 154 to 23 s⁻¹ for AA (ABTS assay), thus indicating that the extraction rate increased as temperature increased in all cases. Similar effect of temperature was previously observed in extraction modeling of saponins from quinoa seeds (Quispe-Fuentes et al., 2013), β -carotene from rose hip (Sturzoiu et al., 2011), and total polyphenol content and antioxidant activity from grape pomace (González-Centeno et al., 2015), by using the Weibull model within the temperature ranges of 20-60 °C, 25-55 °C and 20-50 °C, respectively.

However, the effect of the temperature was smaller in acoustically assisted extractions, α decreasing from 63 to 18 s⁻¹ in UAE1 and from 37 to 19 s⁻¹ in UAE2 for TPC extraction; from 48 to 30 s⁻¹ in UAE1 and UAE2 for TFC extraction; and from 57 to 15 s⁻¹ in UAE1 and from 26 to 8 s⁻¹ in UAE2 for AA extraction. Same figure of α at each temperature was obtained for extraction of TFC at both acoustic power densities. In overall, α decreased ca 85-95 % by increasing temperature from 5 to 25 and applying ultrasound at 790 W/L instead of mechanical agitation at 80 rpm.

According to the literature, when temperature and ultrasonic power are too high, the extracted compounds might degrade and the global rate of extraction may exhibit a decrease (Dey and Rathod, 2013; Lou et al., 2010). However, extraction rate in UAE1 and UAE2 experiments at 5 °C was higher than that of the CE experiments at the same temperature, therefore the global extraction was more efficient when applying ultrasound at every temperature (between 5 and 25°C) but specially at 5°C.

The activation energy (E_a) for the extraction procedures, which can be explained as the energy barrier that bioactive compounds need to overcome in order to be release from the food matrix, was estimated considering α parameter depend with temperature according to the Arrhenius equation. The E_a value can depend on various agents in the extraction procedure, such as type of biocompounds, the food microstructure, the solvent used and the processed sample. (Sant'Anna et al., 2012). The estimated E_a for CE extractions of TPC, TFC and AA were of 62900, 48100 and 66300 J/mol, respectively. As it was expected, acoustic assistance significantly reduced the E_a of biocompounds extraction kinetics. By applying 520 W/L (UAE1) and 790 W/L (UEA2) of acoustic power density, the E_a decreased ca 32 and 63 %, respectively.

respectively, for the extraction of TPC; ca 68 % for the extraction of TFC; and ca 31 and 38 %, respectively, for the AA extraction, in comparison to the mechanical assisted extraction (CE). Similar behavior was observed by Khan et al. (Khan et al., 2010) for extraction of total phenolic content by UAE (40 °C, 150 W, 80% ethanol) from orange peel (*Citrus sinensis L.*) during 30 min.

As it was commented before, β , the shape parameter of the Weibull model, is equal to 1 when the kinetic is of first order (constant extraction rate), or lower or higher than 1 when the extraction rate decreases or increases over the time. The shape of the extraction kinetic is much more pronounced as β value move away from the unit. In all sets of experiments (CE, UAE1 and UAE2), β remained constant within the 5-25°C temperature range and lower than 1 (Table 4), indicating that in all cases, the extraction rate decreased over extraction time. In the case of the TPC and AA extraction, β figures were similar for CE, UAE1 and UAE2 sets. However, for the TFC extraction, β significantly ($p < 0.05$) decreased when ultrasound were applied, indicating that after the first moments of extraction, the extraction was almost ended up. These experimental results were similar to those reported for saponin water extraction with agitation during different times and temperatures from quinoa seeds ($\beta = 0.206-0.305$) (Θυισπε-Φυεντεσ ετ αλ., 2013), and for β -carotene extraction with ethylic ether, petroleum ether and n-hexane as solvents, with solid liquid ratio of 1/ 10, 1/20 and 1/40 and different temperatures (25, 35, 45 and 55 C°) from rose hip ($\beta = 0.424-0.644$) (Στυρζοιω ετ αλ., 2011).

The simulation of the TPC, TFC and AA (ABTS assay) extraction kinetics from orange byproduct at different temperatures (from 5 to 25°C) for the three sets of experiments (CE, UAE1 and UAE2) by using the Weibull model together with the equilibrium yields (Table 2) and the identified parameters (Table 3) are also shown in figures 1a (TPC), 1b (TFC) and 1c (AA by ABTS assay) by dashed lines. A satisfactory concordance between experimental and simulated curves can be observed in these figures.

Furthermore, the mean relative error (MRE, Eq 5) was estimated for all the extraction conditions by comparing experimental and calculated data. According to the bibliography, the lower the MRE, the better the simulation fit provided by the model (González-Centeno et al., 2015). The MRE obtained for the simulation of TPC, TFC and AA extraction kinetics in the each set of experiments are shown in table 4. As it can be observed in this table (Table 4), the MRE was equal or lower than 5 % in all cases, the average MRE being of 3.3 ± 1.6 % for TPC extraction; 2.8 ± 0.6 % for TFC extraction; and of 3.1 ± 1.7 % for the AA extraction.

Table 4: Mean relative error (MRE) estimated by comparison of experimental and simulated extraction yield curves of total phenolic (TPC) and total flavonoid (TFC) contents, and antioxidant activity (AA) (ABTS assay) from orange byproduct by mechanical agitation (CE at 80 rpm) and acoustically assisted (UAE1 at 520 W/L; UAE2 at 790 W/L) extraction.

	MRE (%)		
	TPC	TFC	AA (ABTS)
CE	4.6	3.4	5.0
UAE1	3.7	2.6	2.7
UAE2	1.6	2.3	1.8
Average	3.3±1.6	2.8±0.6	3.1±1.7

From figures 1, and the values of the statistical parameter MRE (table 4), it could be concluded that the proposed mathematical model successfully simulated the extraction of phenolics, flavonoids and antioxidant activity from orange byproduct within the 5-25°C temperature range, under mechanical stirring and acoustic assistance conditions.

3.2. Phenolic composition of orange byproduct

Initial contents of flavonoids and phenolic acids compounds of orange byproduct are also shown in table 1. Naringin content was the highest (41 % of the six measured compounds), followed by neohesperidin and hesperidin (25 and 24 % respectively). The sum of the contents of the three flavonoids was more than eight times higher than the content of the three phenolic acids. The phenolic acid contents represented only the 6 % (ferulic acid), 4 % (sinapic acid) and less than 1 % (coumaric acid) of the six measured compounds. The sum of the contents of phenolics acids and flavonoid component was lower than total polyphenol content (TPC) and than total flavonoid content (TFC), respectively. These results may be due to the use of the quercetin standard. This could react differently with the reagent respect to the flavonoids present in the samples. Similar results can be found in the studies of M'hiri et al. (M'hiri et al., 2015) and Herranz et al. (2019).

Figure 2 show the extraction yields of flavonoid compounds (naringin, hesperidin and neohesperidin) (figure 2a) and phenolic acids (coumaric acid, ferulic acid and sinapic acid) (figure 2b) at 1, 3 and 10 min, from orange byproduct obtained by conventional extraction (CE) and ultrasound-assisted extraction with two ultrasonic power (UAE1 at 520 W/L; UAE2 at 790 W/L). For all detected phenolic compounds under study, the extraction yields increased with both the extraction time and temperature. In agreement with our results, Ma et al. (Ma et al., 2009) reported similar percentages of extraction of coumaric acid (7.5-17.5 µg/g dm), sinapic acid (7.5-20.0 µg/g dm) and ferulic acid (50-220 µg/g dm) in Satsuma mandarin peel by ultrasound-assisted extraction (56 W) at 15 °C from 10 to 60 min. Moreover, Rodrigues and

Pinto (2007) observed that the extraction yields of polyphenolic compounds from coconut shell were affected by the extraction time.

Important increases in the extraction yields of each phenolic compound were observed with increasing temperature in both conventional and ultrasound assisted extractions, between 10 % in cumaric acid and 1533 % in hesperidin in conventional extractions, and between 102 % in neohesperidin and 820 % in naringin in ultrasound assisted extraction, when temperature increased from 5 to 25°C. The yield increase with the temperature was higher in neohesperidin, hesperidin and ferulic acid extracted by the conventional method of agitation, but higher in naringin, coumaric acid and sinapic acid when extraction was assisted by ultrasound. Herrera and Luque de Castro (2015) and Pinelo et al. (2005) also indicated that the extraction time and temperature significantly affected the extraction yields of polyphenolic compounds from milled berries and grape pomace, respectively.

According to figure 1a, the maximum yields of TPC at 25°C were of 56 % in CE and 80 % in UAE2. It can be observed in figures 2 that the yields were very different among the different compounds. Maximum extraction yields of naringin and ferulic acid at 25°C were of 3.5 and 12.6 % in CE, and of 10.9 and 16.3 % in UAE2, respectively. Thus, the use of ultrasound at 25°C increased the yields of extraction of naringin by 216 % and in ferulic acid by 29 %. However, the extraction of these two components was low probably due to the dissolvent used to carry out the extraction (water), because both naringin and ferulic acid are low polar compounds respect to the other analyzed compounds.

The maximum yields of neohesperidin and hesperidin at 25 °C were of 60 and 44 % in CE and of 67 and 57 % in UAE2, respectively, thus, ultrasound promoted increases of 11.4 and 32 %, respectively in the extraction of these components at 25°C. The maximum extraction yields of coumaric acid and sinapic acid at 25 °C were of 28 and 17 % in CE; and of 92 and 51 % in UAE2, respectively, thus, the effect of ultrasound being very high in the extraction of these components at 25 °C, increasing 224 and 192 %, respectively.

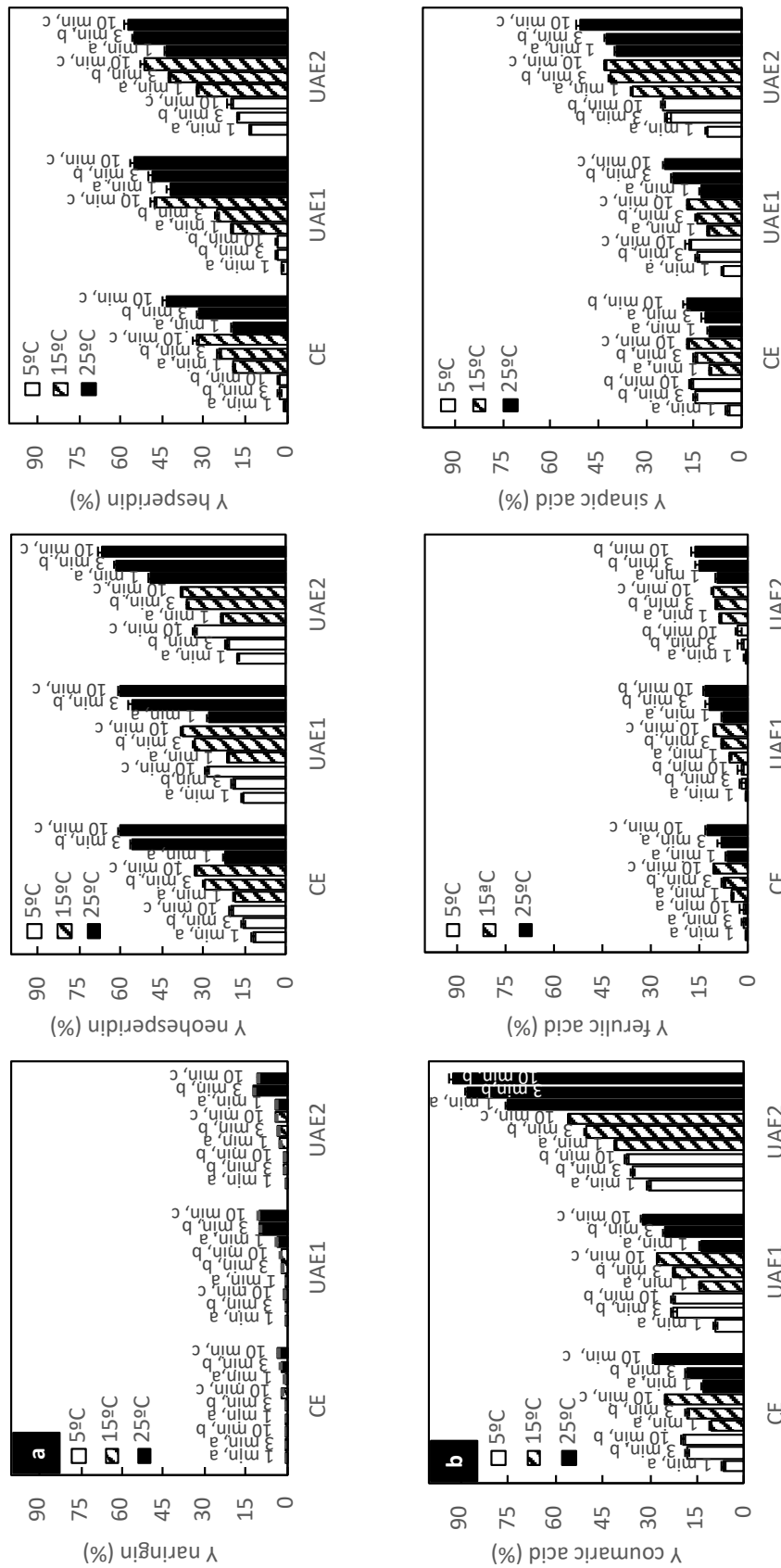


Figure 2. Extraction yields of flavonoid compounds (a) (naringin, neohesperidin and hesperidin) and phenolic acids (b) (p-coumaric ac, ferulic acid and sinapic acid) extracted during 1, 3 and 10 min from orange byproduct by conventional extraction (CE) and ultrasound-assisted extraction with two ultrasonic power (UAE1 at 520 W/l; UAE2 at 790 W/l). Different lowercase letters for the same extraction process and same temperature indicates significant differences in time.

The extraction yields after UAE1 and UAE2 at 25 °C for 3 min, were significantly higher than those by conventional extraction at 25 °C for 10 min. These results showed that UAE promoted higher extraction efficiencies compared to conventional extraction. However, the extraction yields of phenolic compounds by UAE at 5 °C for 1 min were lower than those by conventional extraction at 25 °C for 1 min, indicating, in these cases, that UAE at low temperature is not enough to increase the yields of phenolic compounds compared to conventional extraction. In line with the present research, Ma et al., (2009) also showed that UAE at low temperature enhanced the extract yields of from Citrus unshiu peels.

When the density power ultrasound increase was observed a increase on the extraction yields of polyphenolic compounds. The yields of some of polyphenolic compounds increased significantly ($p < 0.05$) when density power ultrasound increased from 520 to 790 W/L. For example, the yields of naringin, neohesperidin, hesperidin, coumaric acid, ferulic acid and sinapic acid after 3 min at 15 °C increased 81, 8, 67, 125, 22 and 194 %, respectively, when ultrasonic power density increased from 520 to 790 W/L. The extraction yields of neohesperidin was much higher than those of the other compounds and exhibited a low increase from 520 to 790 W/L, probably due to the fact that neohesperidin, among all detected phenolic compounds, is the most unstable molecule and could suffer from degradation reactions. However, the extraction yield of the sinapic acid did not exhibited significant increase with the application of ultrasounds with a power density of 520 W/L respect to the CE extraction but a considerable increase when ultrasonic power density increased from 520 to 790 W/L, indicating probably that the extraction of sinapic acid requires a higher activation energy for its release. It has been indicated that the effect of ultrasound conditions on the extraction of multibioactive compounds from *Hypericum perforatum* L. and from Satsuma mandarin peel varied from one compound to another (Ma et al., 2009). Different physic-chemical properties of phenolic compounds may be responsible for the different extraction efficiencies under the same extraction conditions.

4. CONCLUSIONS

The experimental data discussed above clearly suggest that orange byproduct constitutes an important source of biocompounds which could be extracted in water at low/moderate temperature (5-25°C) with high yields when extraction is carried out assisted by ultrasound. The process is affected by both the temperature and the acoustic power density. The percentages of extracted compounds from the initial orange byproduct were of 83 % of TPC, 75 % of TFC and 95 % of AA (ABTS assay) after 10 min of extraction at 25°C and 790 W/L of acoustic

power density, 28 %, 44 % and 157 % higher than the yields obtained at the same temperature by mechanical extraction. Moreover, if extraction time at 25°C and ultrasound at 790 W/L was reduced to 3 min, the TPC, TFC and AA yields were also high (80 %, 64 % and 95 % respectively), 29 %, 39 % and 197 % higher than the yields obtained after 3 min of extraction at the same temperature by mechanical extraction. Thus, the ultrasound-assisted extraction needed less extraction time and lower temperatures to obtain extracts with similar or even higher total phenol content and antioxidant activity than those obtained from mechanical extraction.

The proposed Weibull model satisfactorily described both the mechanical and ultrasonic aqueous extraction kinetics of total phenol content, flavonoid total content and antioxidant activity within temperature range from 5 to 25 °C, the mean relative error of the simulation being of 3.1 ± 1.2 %. The mathematical model allowed to conclude that the change extraction rate increased with both the temperature and the acoustic power density, the activation energy decreased with the application of ultrasound and the extraction rate decreased over extraction time in all cases but sharper when ultrasound were applied in the extraction of TFC.

Finally, by analyzing the phenolic composition of extracts, it was observed that different compounds were extracted in different yields. The neohesperidin, hesperidin, coumaric acid and sinapic acid those with the highest yields specially when extraction was assisted by ultrasound (maximum yields of 67 %, 58 %, 92 % and 50 % respectively after 10 min extraction at 25°C and 790 W/L of acoustic power density). Extration yields of naringin and ferulic acid were lower probably due to their lipophilic character (maximum yields of 11 % and 16 % respectively after 10 min extraction at 25°C and 790 W/L of acoustic power density).

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support of the National Institute of Research and Agro-Food Technology (INIA) and co-financed with ERDF funds (RTA2015-00060-C04-03), and the Balearic Government for the research fellowship (FPI/1814/2015) and for the research project AAEE045/2017 of the “Conselleria d’Innovació, Recerca i Turisme”, co-financed with ERDF funds.

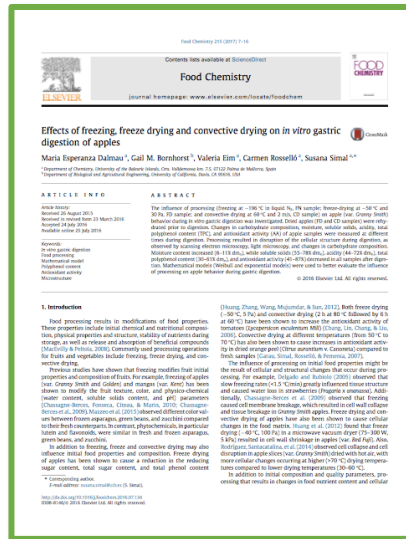
6. REFERENCES

- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M.M., Hu, B., Lei, S., Zeng, X., 2014. Sonication enhances polyphenolic compounds, sugars, carotenoids and mineral elements of apple juice. *Ultrason. Sonochem.* 21, 93–7. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.06.002>
- Ahmad-Qasem, M.H., Cánovas, J., Barrajon-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J.A., García-Pérez, J.V.,

2013. Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 17, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.11.008>
- Bartnick, D.D., Mohler, C.M., Houlihan, M., 2006. Methods for the production of food grade extracts. *Boukroufa, M., Boutekedjiret, C., Petigny, L., Rakotomanomana, N., Chemat, F., 2015. Bio-refinery of orange peels waste: A new concept based on integrated green and solvent free extraction processes using ultrasound and microwave techniques to obtain essential oil, polyphenols and pectin. Ultrason. Sonochem.* 24, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.11.015>
- Cheigh, C.-I., Chung, E.-Y., Chung, M.-S., 2012. Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water. *J. Food Eng.* 110, 472–477. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.12.019>
- Cho, Y.-J., Hong, J.-Y., Chun, H.S., Lee, S.K., Min, H.-Y., 2006. Ultrasonication-assisted extraction of resveratrol from grapes. *J. Food Eng.* 77, 725–730. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.06.076>
- Chung, H.S., Kim, D.S., Kim, H.S., Lee, Y.G., Seong, J.H., 2013. Effect of freezing pretreatment on the quality of juice extracted from Prunus mume fruit by osmosis with sucrose. *LWT - Food Sci. Technol.* 54, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.016>
- Dey, S., Rathod, V.K., 2013. Ultrasound assisted extraction of β -carotene from *Spirulina platensis*. *Ultrason. Sonochem.* 20, 271–276. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.05.010>
- Dranca, F., Oroian, M., 2016. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel. *Ultrason. Sonochem.* 31, 637–46. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.008>
- 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. *Dry. Technol.* 31, 951–962. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.707162>
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H., 2009. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds, Antioxidants, and Anthocyanins from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds. *J. Agric. Food Chem.* 57, 4988–4994. <https://doi.org/10.1021/jf9001439>
- Gironés-Vilaplana, A., Moreno, D. a, García-Viguera, C., 2014. Phytochemistry and biological activity of Spanish Citrus fruits. *Food Funct.* 5. <https://doi.org/10.1039/c3fo60700c>
- González-Centeno, M., 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. *Ultrason. Sonochem.* 22, 506–514. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.027>
- González-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedre, P.-L., 2012. Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.* 60, 11850–11858. <https://doi.org/10.1021/jf303047k>
- He, J.-Z., Shao, P., Liu, J.-H., Ru, Q.-M., 2012. Supercritical Carbon Dioxide Extraction of Flavonoids from Pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) Peel and Their Antioxidant Activity. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 13065–13078. <https://doi.org/10.3390/ijms131013065>
- Hernández-Carranza, P., Ávila-Sosa, R., Guerrero-Beltrán, J.A., Navarro-Cruz, A.R., Corona-Jiménez, E., Ochoa-Velasco, C.E., 2016. Optimization of Antioxidant Compounds Extraction from Fruit By-Products: Apple Pomace, Orange and Banana Peel. *J. Food Process. Preserv.* 40, 103–115. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12588>
- Herranz, B., Fernández-Jalao, I., Dolores Álvarez, M., Quiles, A., Sánchez-Moreno, C., Hernando, I., de Ancos, B., 2019. Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to in vitro gastrointestinal digestion. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 51, 114–125. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.05.014>
- Herrera, H., Meksem, K., Ragin, B., Akond, M., Kassem, M.A., Lightfoot, D.A., Kantartzi, S., Akbay, C., 2015. Effect of Row Spacing on Seed Isoflavone Contents in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Am. J. Plant Sci.* 05, 4003–4010. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.526418>
- Hojnik, M., Škerget, M., Knez, Ž., 2008. Extraction of lutein from Marigold flower petals – Experimental kinetics and modelling. *LWT - Food Sci. Technol.* 41, 2008–2016. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2007.11.017>
- Jeong, S.-M., Kim, S.-Y., Kim, D.-R., Jo, S.-C., Nam, K.C., Ahn, D.U., Lee, S.-C., 2004. Effect of Heat

- Treatment on the Antioxidant Activity of Extracts from Citrus Peels. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3389–3393. <https://doi.org/10.1021/jf049899k>
- 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 Chem.* 119, 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Kimura, T., Sakamoto, T., Leveque, J.-M., Sohmiya, H., Fujita, M., Ikeda, S., Ando, T., 1996. Standardization of ultrasonic power for sonochemical reaction. *Ultrason. Sonochem.* 3, S157–S161. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00021-1)
- Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Číž, M., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R., Trakhtenberg, S., 2003. Apple and pear peel and pulp and their influence on plasma lipids and antioxidant potentials in rats fed cholesterol-containing diets. *J. Agric. Food Chem.* 51. <https://doi.org/10.1021/jf030137j>
- Li, B.B., Smith, B., Hossain, M.M., 2006. Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Sep. Purif. Technol.* 48, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.005>
- Li, W., Wang, Z., Wang, Y., Jiang, C., Liu, Q., Sun, Y., Zheng, Y., 2012. Pressurised liquid extraction combining LC–DAD–ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in *Citrus reticulata* ‘Chachi’ (Guangchenpi). *Food Chem.* 130, 1044–1049. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.129>
- Liu, S.-C., Tsai, C.-W., 2012. Effects of Heating Time on the Antioxidative Capacities of Citrus Fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) By-products. *FOOD Sci. Technol. Res.* 18, 505–513.
- Lou, Z., Wang, H., Zhang, M., Wang, Z., 2010. Improved extraction of oil from chickpea under ultrasound in a dynamic system. *J. Food Eng.* 98, 13–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.11.015>
- M’hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., Ghoul, M., 2015. Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food Bioprod. Process.* 96, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010>
- Ma, Y.-Q., Chen, J.-C., Liu, D.-H., Ye, X.-Q., 2009. Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: effect of ultrasound. *Ultrason. Sonochem.* 16, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2008.04.012>
- Ma, Y.-Q., Ye, X.-Q., Fang, Z.-X., Chen, J.-C., Xu, G.-H., Liu, D.-H., 2008. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts from ultrasonic treatment of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) peels. *J. Agric. Food Chem.* 56, 5682–90. <https://doi.org/10.1021/jf072474o>
- Mason, J.T., Chemat, F., Vinatoru, M., 2011. The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves. *Curr. Org. Chem.* 15, 237–247. <https://doi.org/10.2174/138527211793979871>
- Odrizola-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. *J. Food Eng.* 89, 210–216. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.019>
- Omoba, O.S., Obafaye, R.O., Salawu, S.O., Boligon, A.A., Athayde, M.L., 2015. HPLC-DAD Phenolic Characterization and Antioxidant Activities of Ripe and Unripe Sweet Orange Peels. *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 4, 498–512. <https://doi.org/10.3390/antiox4030498>
- Pinelo, M., Fabbro, P. Del, Manzocco, L., Nuñez, M.J., Nicoli, M.C., 2005. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* byproducts. *Food Chem.* 92, 109–117. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2004.07.015>
- 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. *J. Food Process Eng.* 36, 202–210. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4530.2012.00673.x>
- Rodrigues, S., Pinto, G.A.S., 2007. Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *J. Food Eng.* 80, 869–872. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.08.009>
- Rodríguez, Ó., Ortuño, C., Simal, S., Benedito, J., Femenia, A., Rosselló, C., 2014. Acoustically assisted supercritical CO₂ extraction of cocoa butter: Effects on kinetics and quality. *J. Supercrit. Fluids* 94, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.017>
- Ros, M., Pascual, J.A., Ayuso, M., Belén Morales, A., Ramón Miralles, J., Solera, C., 2012. Salidas valorizables de los residuos y subproductos orgánicos de la industria de los transformados de frutas y hortalizas. *Residuos* 130, 2–9.
- Routray, W., Orsat, V., 2012. Microwave-Assisted Extraction of Flavonoids: A Review. *Food*

- Bioprocess Technol. 5, 409–424. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0573-z>
- Sant'Anna, V., Cladera-Olivera, F., Brandelli, A., 2012. Kinetic and thermodynamic study of thermal inactivation of the antimicrobial peptide P34 in milk. Food Chem. 130, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.001>
- Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2015. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. J. Funct. Foods 18, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Guzun, A.S., Dobre, T., 2011. Empirical models applied for kinetics extraction of β -carotene from *Rosa canina*. Rev. Chim. 62, 344–348.
- Um, M., Han, T.H., Lee, J.W., 2018. Ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity of phenolic and flavonoid compounds and ascorbic acid from rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.) fruit. Food Sci. Biotechnol. 27, 375–382. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0247-3>
- Vinatoru, M., 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrason. Sonochem. 8, 303–313. [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(01\)00071-2](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(01)00071-2)
- Wang, H., Chen, G., Guo, X., Abbasi, A.M., Liu, R.H., 2016. Influence of the stage of ripeness on the phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities in different parts of *Citrus reticulata* Blanco cv. Chachiensis. LWT - Food Sci. Technol. 69, 67–75. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.021>
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., Ye, X., Zhou, Z., 2014. Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. Food Chem. 145, 674–80. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.012>



CAPÍTULO II

Effects of freezing, freeze-drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples

Maria Esperanza Dalmau, Gail M. Bornhorst, Valeria Eim, Carmen Rosselló, Susana Simal

Food Chemistry

Volumen: 215

Páginas: 7-16

Índice de impacto (2017): 4.946

Food science & Technology, Q1 (7/133)



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Effects of freezing, freeze drying and convective drying on *in vitro* gastric digestion of apples



Maria Esperanza Dalmau^a, Gail M. Bornhorst^b, Valeria Eim^a, Carmen Rosselló^a, Susana Simal^{a,*}

^a Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, Ctra. Valldemossa km. 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain

^b Department of Biological and Agricultural Engineering, University of California, Davis, CA 95616, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2015

Received in revised form 23 March 2016

Accepted 24 July 2016

Available online 25 July 2016

Keywords:

In vitro gastric digestion

Food processing

Mathematical model

Polyphenol content

Antioxidant activity

Microstructure

ABSTRACT

The influence of processing (freezing at $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in liquid N_2 , FN sample; freeze-drying at $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 30 Pa, FD sample; and convective drying at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 2 m/s, CD sample) on apple (var. *Granny Smith*) behavior during *in vitro* gastric digestion was investigated. Dried apples (FD and CD samples) were rehydrated prior to digestion. Changes in carbohydrate composition, moisture, soluble solids, acidity, total polyphenol content (TPC), and antioxidant activity (AA) of apple samples were measured at different times during digestion. Processing resulted in disruption of the cellular structure during digestion, as observed by scanning electron microscopy, light microscopy, and changes in carbohydrate composition. Moisture content increased (6–11% dm_0), while soluble solids (55–78% dm_0), acidity (44–72% dm_0), total polyphenol content (30–61% dm_0), and antioxidant activity (41–87%) decreased in all samples after digestion. Mathematical models (Weibull and exponential models) were used to better evaluate the influence of processing on apple behavior during gastric digestion.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Food processing results in modifications of food properties. These properties include initial chemical and nutritional composition, physical properties and structure, stability of nutrients during storage, as well as release and absorption of beneficial compounds (MacEvilly & Peltola, 2008). Commonly used processing operations for fruits and vegetables include freezing, freeze drying, and convective drying.

Previous studies have shown that freezing modifies fruit initial properties and composition of fruits. For example, freezing of apples (var. *Granny Smith* and *Golden*) and mangos (var. *Kent*) has been shown to modify the fruit texture, color, and physico-chemical (water content, soluble solids content, and pH) parameters (Chassagne-Berces, Fonseca, Citeau, & Marin, 2010; Chassagne-Berces et al., 2009). Mazzeo et al. (2015) observed different color values between frozen asparagus, green beans, and zucchini compared to their fresh counterparts. In contrast, phytochemicals, in particular lutein and flavonoids, were similar in fresh and frozen asparagus, green beans, and zucchini.

In addition to freezing, freeze and convective drying may also influence initial food properties and composition. Freeze drying of apples has been shown to cause a reduction in the reducing sugar content, total sugar content, and total phenol content

(Huang, Zhang, Wang, Mujumdar, & Sun, 2012). Both freeze drying ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 Pa) and convective drying (2 h at $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ followed by 6 h at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$) have been shown to increase the antioxidant activity of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill) (Chang, Lin, Chang, & Liu, 2006). Convective drying at different temperatures (from $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $70\text{ }^{\circ}\text{C}$) has also been shown to cause increases in antioxidant activity in dried orange peel (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) compared to fresh samples (Garau, Simal, Rosselló, & Femenia, 2007).

The influence of processing on initial food properties might be the result of cellular and structural changes that occur during processing. For example, Delgado and Rubiolo (2005) observed that slow freezing rates ($<1.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) greatly influenced tissue structure and caused water loss in strawberries (*Fragaria x ananassa*). Additionally, Chassagne-Berces et al. (2009) observed that freezing caused cell membrane breakage, which resulted in cell wall collapse and tissue breakage in *Granny Smith* apples. Freeze drying and convective drying of apples have also been shown to cause cellular changes in the food matrix. Huang et al. (2012) found that freeze drying ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 100 Pa) in a microwave vacuum dryer (75–300 W, 5 kPa) resulted in cell wall shrinkage in apples (var. *Red Fuji*). Also, Rodríguez, Santacatalina, et al. (2014) observed cell collapse and cell disruption in apple slices (var. *Granny Smith*) dried with hot air, with more cellular changes occurring at higher ($>70\text{ }^{\circ}\text{C}$) drying temperatures compared to lower drying temperatures ($30\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$).

In addition to initial composition and quality parameters, processing that results in changes in food nutrient content and cellular

* Corresponding author.

E-mail address: susana.simal@uib.es (S. Simal).

Nomenclature			
AA	antioxidant activity, mg trolox/g dm _o	GAE	gallic acid equivalent
AIR	alcohol insoluble residues, g/100 g dm _o	LM	light microscopy
C	extraction yield, g/g dm _o or g/100 g dm _o	MRE	mean relative error (%)
C _o	initial extraction yield, g/g dm _o or g/100 g dm _o	r ²	coefficient of determination
C _{calc}	calculated value	S _{calc}	standard deviation of the calculated values
C _{eq}	equilibrium extraction yield, g/g dm _o or g/100 g dm _o	S _{exp}	standard deviation of the experimental values
C _{exp}	experimental value	SE	standard error of the estimated parameters
CD	convective drying	SEM	scanning electron microscopy
CI	confidence intervals	SSE	summed square of residuals statistics
dm	dry matter	TPC	total polyphenol content mg GAE/g dm _o
dm _o	initial dry matter	VAR	percentage of explained variance (%)
FD	freeze-drying	α	kinetic reaction constant of the Weibull model s
FN	frozen with liquid nitrogen	β	shape parameter of the Weibull model

structure may also influence the release, bioaccessibility, and bioavailability of nutrients from the food matrix (Parada & Aguilera, 2007). Previous studies have shown that both processing conditions and cellular structure of foods influence the release and absorption of their constituent nutrients. Ellis et al. (2004) showed (*in vivo*) the role of cell walls on the bioavailability of lipids in almond seeds and concluded that intact cell walls prevented the release of intracellular lipids. Furthermore, a theoretical model has been developed relating the bioaccessibility of lipids in almonds to the rupture properties of almond cell walls. This model has been related to the breakdown and size reduction of almond particles during digestion (Grassby et al., 2014).

In fruit and vegetable products, Netzel et al. (2011) found that the liberation of carotenoids, evaluated using an *in vitro* gastric and intestinal digestion model, was higher in a puree of cooked (100 °C, 10 min) or blanched (80 °C, 10 min) carrots compared to fresh carrot puree. Similarly, blanching of carrots (in both water and acidified water (45 g/l citric acid, pH 1.3 at 100 °C for 4 min)) has been shown to promote the release of β-carotene, most likely as a result of cell wall breakdown (Jabbar et al., 2014). Bioaccessibility and bioavailability of β-carotene in carrots has been shown to be influenced by the degree of particle size reduction, heat treatment, and cell wall rupture. Of these factors, cell wall rupture was found to be necessary, prior to release and absorption of β-carotene in carrots. This indicates that cell wall rupture may play a crucial role in nutrient release and absorption in other fruit and vegetable products as well (Tydeman, Parker, Faulks et al., 2010; Tydeman, Parker, Wickham, et al., 2010). Previous studies have shown that processing (freezing, freeze drying and convective drying) may influence both the initial properties and composition as well as the cellular structure of food products. Consequently, modifications in cellular structure of food matrices may result in modification of the release, bioaccessibility, and bioavailability of nutrients from foods. As such, the objective of this study was to evaluate the effects of different processing techniques (freezing, (FN), freeze drying, (FD), and convective drying, (CD)) on the microstructure, chemical characteristics, and release of bioactive compounds from *Granny Smith* apples during *in vitro* gastric digestion.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Apples (*Malus domestica* var. *Granny Smith*) were purchased from a local supermarket (initial moisture content of 6.81 ± 0.04 g/g dm and total soluble solids of 12.1 ± 0.5 °Brix). Apples were stored at 4 °C for a maximum of one week. Cubes were cut (0.01 m edge) from the center regions of the apple tissue, not

including the peel or core, and immediately processed after cutting.

2.2. Freezing, freeze drying and convective drying processes

Apple cubes were frozen by immersion in liquid nitrogen (FN) (boiling point = −196 °C) until the core temperature reached equilibrium with the freezing temperature (~30 s). Once frozen, samples were thawed in a cold chamber at 4 ± 1 °C for approx. 45 min prior to *in vitro* digestion.

Freeze drying (FD) was completed using a freeze-drier (Telstar LyoQuest, Barcelona, Spain) operating at −50 °C and (vacuum pressure of 30 Pa) until a final moisture content of 0.05 ± 0.01 kg water/kg dm.

Convective drying (CD) was completed in a laboratory-scale hot air dryer operating at 60 °C with an air velocity of 2 m/s (Garau et al., 2007). Samples were dried until they reached a final moisture content of 0.20 ± 0.03 kg water/kg dm (136.0 ± 0.8 min).

Before *in vitro* digestion, FD and CD samples were rehydrated by immersion in distilled water at 37 °C until they reached a final moisture content similar to raw samples (6.81 ± 0.04 g/g dm). Distilled water was used to rehydrate the apple samples, as this is similar to what may be done prior to consumption of certain dried products.

2.3. *In vitro* digestion procedure

Apple samples were digested following the *in vitro* gastric digestion method reported by Bornhorst and Singh (2013). Briefly, simulated saliva was prepared by dissolving 1 g/l mucin, 2 g/l α-amylase, 0.117 g/l NaCl, 0.149 g/l KCl, and 2.10 g/l NaHCO₃ in deionized water at pH 7.0. Simulated gastric juice was prepared by dissolving 1 g/l pepsin, 1.50 g/l mucin, 8.78 g/l NaCl in deionized water at pH 1.8–2.0. All solutions were prepared daily.

For all processed and raw apples cubes, samples (10–15 g) were mixed with 10 ml of simulated saliva for 30 s, followed by immersion in 100 ml of simulated gastric juice pre-heated to 37 °C. The mixture was incubated in a shaking water bath (Unitronic 320 OR, Barcelona, Spain) at 37 °C and 100 rpm for up to 3 h. Samples were taken initially (no digestion), after mixing with saliva, and after 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, and 180 min of gastric digestion for moisture, acidity, and soluble solid analyses. Samples were taken initially (no digestion), and after 60, 120, and 180 min of gastric digestion for total polyphenol content, and antioxidant activity analyses. Samples were taken initially (no digestion) and after 180 min of gastric digestion for carbohydrate composition and microstructural analyses. All digestion experiments were performed at least in triplicate, and results were expressed in initial

dry matter basis to facilitate comparison between the different treatments.

2.4. Cell walls

Cell walls were observed by scanning electron microscopy (SEM) and light microscopy (LM). Alcohol insoluble residues (AIRs) were prepared to analyze the carbohydrate composition of raw and processed apple samples before and after digestion.

2.4.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Apple cubes were soaked in liquid nitrogen in order to be fractured with a sharp razor blade, and freeze dried for observation in a scanning electron microscope (SEM): HITACHI S-3400N (Sysmex, Krefeld, Germany), accelerated at 15 kV and under vacuum pressure of 40 Pa.

2.4.2. Light microscopy (LM)

Apple samples were prepared for light microscopy as described by Eim, García-Pérez, Rosselló, Femenia, and Simal (2012) with minor modifications. Samples were fixed in formaldehyde (10%), followed by dehydration, embedding in paraffin (60 °C for 3 h), and sectioning into 4–5 µm slices with a microtome (model Finesse 325, Thermo Shandon, Cheshire, UK). The slices were stained with acid Schiff and haematoxylin to visualize cell walls (Paciulli et al., 2014). Images were obtained using a light microscope (Olympus BX60FS, Japan) at 100× magnification.

2.4.3. Alcohol insoluble residues (AIRs)

AIRs were obtained by immersing apple samples in boiling ethanol (85% (v/v) aq.) as described by Garau et al. (2007). Prior to further analysis, the AIRs were milled using a laboratory grain mill and passed through a 0.5 mm sieve. Results were expressed in gram of AIR per 100 g of initial dry matter (dm_o).

2.4.4. Analysis of carbohydrate composition

Sugars were released from cell wall polysaccharides by acid hydrolysis as described by Garau et al. (2007). AIR samples (~5 mg) were dispersed in 72% H₂SO₄ for 3 h followed by dilution to 1 M and hydrolyzed at 100 °C for 2.5 h (Saeman hydrolysis conditions). A 1 M H₂SO₄ hydrolysis (100 °C for 2.5 h) was also included to determine the cellulose content by difference. Neutral sugars were derivatized as their alditol acetates and isothermally separated by gas chromatography at 220 °C on a 3% OV225 Chromosorb WHP 100/120 mesh column (Hewlett-Packard 5890A, Waldbronn, Germany) with Argon as the carrier gas flowing at 20 ml/min. Injector and FID detector temperatures were 230 °C and 240 °C, respectively. Uronic acids were colorimetrically determined as total uronic acid using AIR samples hydrolyzed for 1 h at 100 °C in 1 M H₂SO₄ as described Blumenkrantz and Asboe-Hansen (1973). Briefly, after hydrolysis of AIR samples, 1.2 ml/g sulfuric acid/tetraborate was added and the tubes were cooled in crushed ice. The cooled mixture was agitated using a Vortex mixer followed by heating at 100 °C for 5 min. After heating, samples were cooled in a water-ice bath and 20 µl of m-hydroxydiphenyl reagent was added. The tubes were shaken and absorbance measurements were made at 520 nm in a Cary Bio 300 (Varian, California, USA) spectrophotometer within 5 min. Galacturonic acid dissolved in saturated benzoic acid was used as standard (0–80 µg/ml). Results were expressed in mg of sugar per 100 g of initial dry matter (dm_o).

2.5. Chemical characteristics: moisture content, soluble solids content, and titratable acidity

Moisture content (method no. 934.06, AOAC, 1997) and soluble solid content (method no. 932.14C, AOAC, 1990) of all samples

were determined according to AOAC official methods and expressed in gram of water or saccharose/g initial dry matter (dm_o), respectively.

Prior to measurement of titratable acidity, a known mass of apple sample (~5 g) was mixed with 20 ml of distilled water with an Ultra-turrax (T25 Digital IKA, Staufen, Germany). Titratable acidity was measured via titration of this sample with 0.1 NaOH to an end point of pH 8.1 using a pH meter (Crison, pH 25, Barcelona, Spain). Results were expressed as gram-equivalents of malic acid per 100 g of initial dry matter (dm_o).

2.6. Release of bioactive compounds: total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA)

Methanol extracts from all samples were prepared according to the methodology described by Eim et al. (2013) with minor modifications. Samples were weighed (~1.0 g), and 20 ml of methanol (MeOH) extraction solvent was added. Mixtures were homogenized using an Ultra-Turrax T25 Digital (IKA, Staufen, Germany) at 13,000 rpm for 1 min at 4 °C, and these solutions were refrigerated overnight. The mixtures were then centrifuged at 4000 rpm for 10 min followed by filtration to obtain the methanol extract. The extracts were refrigerated at 4 °C until analysis.

Total polyphenol content (TPC) was determined using the Folin-Ciocalteu assay as described by Eim et al. (2013). The antioxidant activity (AA) was determined using the ABTS, FRAP, and CUPRAC assays as described by González-Centeno et al. (2012). In all assays, absorbance measurements were carried out at 25 °C in an UV/Vis/NIR spectrophotometer (Thermo Scientific MultiSkan Spectrum, Vantaa, Finland). Absorbance measurements for all the assays were correlated with standard curves. The TPC was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/g initial dry matter (dm_o). The AA was expressed as mg Trolox/g initial dry matter (dm_o).

2.7. Mathematical model

The kinetics of moisture content, soluble solid content, titratable acidity, total polyphenol content, and antioxidant activity (ABTS, FRAP, and CUPRAC assays) in raw and processed apples during *in vitro* digestion were described using the Weibull model (Eq. (1)). This model has previously been used to describe microbial, enzymatic, and chemical degradation, as well as hydration/dehydration kinetics (Eim et al., 2013; González-Centeno, Comas-Serra, Femenia, Rosselló, & Simal, 2015; Rodríguez, Ortuño, et al., 2014; Zura-Bravo, Vega-Gálvez, Lemus-Mondaca, Ah-Hen, & Di Scala, 2013).

$$\frac{C - C_{eq}}{C_0 - C_{eq}} = e^{-\left(\frac{t}{s}\right)^\beta} \quad (1)$$

where α is related to the inverse of the change/input rate (s), β is a characteristic shape parameter, and C_{eq} is the equilibrium concentration (g/100 g dm_o) (González-Centeno et al., 2015). When β equals 1, the equation corresponds to first order kinetics. The terms α , β and C_{eq} were identified for each experimental treatment.

2.8. Data and statistical analysis

Results are presented as mean values with their corresponding standard deviations. Statistical analyses were performed using R 3.1.0 software. Parametric ANOVA and Tukey tests were used to evaluate the existence and the degree of significant differences, respectively. The statistical analyses were replaced by Kruskal-Wallis and pairwise-Wilcox (BH corrected) when data were not normally distributed and/or showed heterogeneity of variances. Significance was assessed at a level of $p < 0.05$.

The identification of the Weibull model parameters α , β and C_{eq} , was carried out using the 'nlinfit' function of the optimization toolbox of Matlab 7.5 (The MathWorks Inc., Natick, USA) which estimates the coefficients of a nonlinear regression function and the residuals using least squares. To determine the 95% confidence intervals (CI) and the standard error of the estimated parameters (SE), the 'nlparci' function and the covariance matrix were used, respectively.

Linear regression analyses were carried out by using "Curve Fitting" Toolbox of Matlab 7.5 (The MathWorks Inc., Natick, USA), to determine the coefficient of determination (square of the correlation between the response values and the predicted response values, r^2) and the summed square of residuals (sum of squares due to error of the fit, SSE) statistics.

The mean relative error (MRE) (Eq. (2)), estimated by the comparison of experimental and simulated data, was calculated to statistically evaluate the accuracy of the proposed mathematical model to simulate change kinetics.

$$MRE = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{|C_{exp} - C_{calc}|}{C_{exp}} \right)}{n} \cdot 100 \quad (2)$$

3. Results and discussion

3.1. Cell walls

3.1.1. Microstructural changes (SEM and LM)

Scanning electron microscopy (SEM) and light microscopy (LM) were used to assess the microstructural changes in apple samples as a result of processing and after 180 min of *in vitro* gastric digestion (Fig. 1). Microstructural differences were observed both as a

result of processing and as a result of *in vitro* gastric digestion when compared to raw, undigested apple samples. Compared to raw apples, freeze dried and convective dried apples exhibited the greatest changes, both before and after digestion. This trend can be observed in both surface (SEM) and cellular (LM) structures.

Fig. 1a₁ and a₂ shows the microstructure of raw apples. Raw apples are composed of many well-arranged pores in a heterogeneous and anisotropic pattern, as was previously observed by Rodríguez, Santacatalina, et al. (2014). After 180 min of digestion (Fig. 1a₃ and a₄) a significant cell lysis was observed, resulting in a smaller number of cells per unit area, along with increases in the intercellular space between remaining cells. Carnachan, Bootten, Mishra, Monro, and Sims (2012) studied the microstructure of kiwi pulp after 30 min *in vitro* gastric digestion (adjusting the pH to 2.5 and adding pepsin), followed by 120 min *in vitro* intestinal digestion (adding pancreatin solution (5% in maleate buffer pH 6.5, 20 mL followed by amyloglucosidase)). Similar to the current study, these authors observed an increase in the intercellular spaces after *in vitro* digestion.

Fig. 1b₁ and b₂ shows the microstructure of frozen apple samples before *in vitro* digestion. These micrographs indicate that freezing by immersion in liquid nitrogen caused irregular shapes, cellular damage, and more intercellular spaces. Similar effects were observed in frozen strawberries by Delgado and Rubiolo (2005). After *in vitro* gastric digestion of frozen apples (Fig. 1b₃ and b₄), cell collapse was evident. The structure became less porous, resulting in an irregular surface where cell walls were less visible, and larger, more irregular shapes were present (Fig. 1b₄). In addition, cell wall fragments resulting from cell lysis could be observed (Fig. 1b₄).

Fig. 1c₁ and c₂ shows the microstructure of freeze dried samples before *in vitro* digestion. The heterogeneity of the pore structure was similar to that of the raw apples. However, a collapse of cell

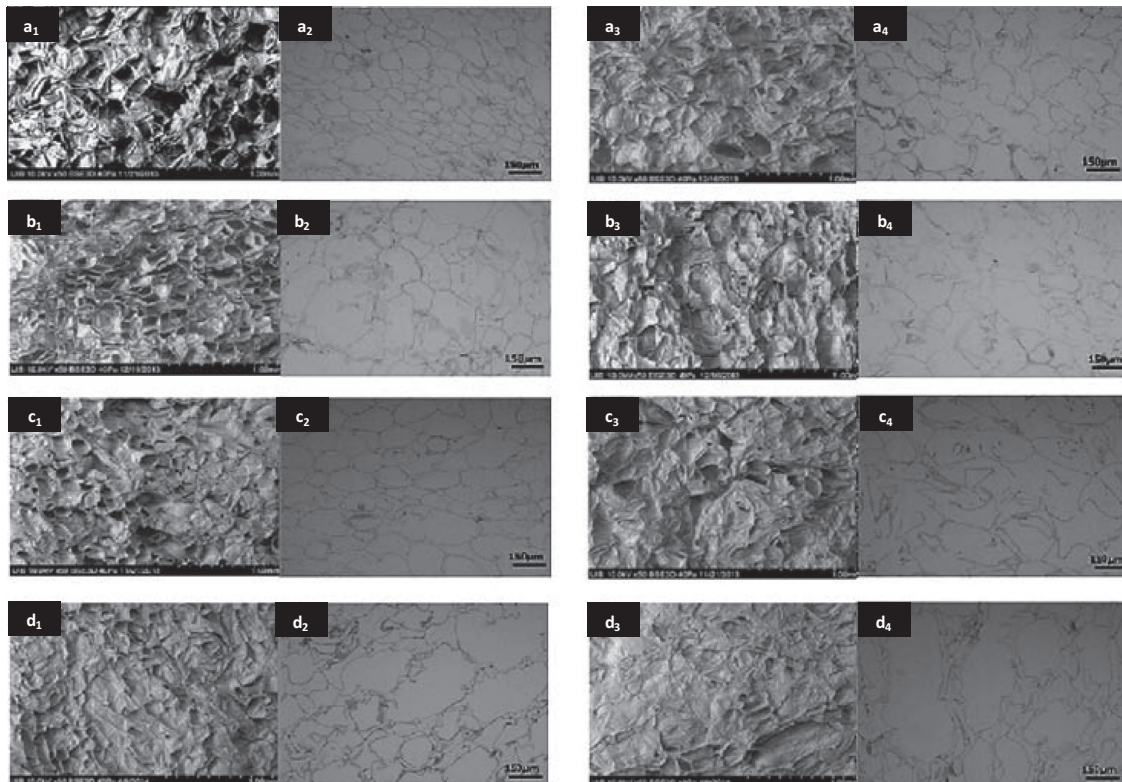


Fig. 1. Microphotographs of the samples of apple: a-Raw, b-FN, c-FD and d-CD. 1-SEM and 2-LM of initial apple samples (prior to *in vitro* digestion). 3-SEM and 4-LM after 180 min of *in vitro* gastric digestion.

membranes was observed. A similar effect was observed in freeze-dried *Red Fuji* apples by Huang et al. (2012) and in freeze-dried *Idared* apples by Lewicki and Pawlak (2003). An additional increase in cell collapse and destruction of cell wall material can be observed as a result of *in vitro* gastric digestion (Fig. 1c₃ and c₄). The changes during digestion eliminated a majority of the pore structure observed in undigested, raw apples.

Cells exhibited shrinkage during convective drying, as can be observed in Fig. 1d₁ and d₂. In addition, there was a reduction in the number and size of pores as well as cellular collapse that was observed in convective dried apples when compared to raw apples. The influence of convective drying on the microstructure of *Granny Smith* apple have been previously studied by several authors (Rodríguez, Santacatalina, et al., 2014; Vega-Gálvez et al., 2012). These authors agreed that during drying, one of the most important phenomena is cell shrinkage, which leads to a major modification of the apple structure and allows the release of water. In addition to the changes that occurring during convective drying, additional cell collapse was visible in CD samples after *in vitro* gastric digestion (Fig. 1d₃ and d₄). Structural modifications that occurred during digestion eliminated the open pores present on the surface and ruptured many of the interior cell walls.

3.1.2. Alcohol insoluble residues (AIRs)

The alcohol insoluble residue (AIR) values from raw and processed apples before (initial) and after 180 min of *in vitro* gastric digestion are shown in Table 1. The initial AIR content of raw apples (17.5 ± 0.1 g AIR/100 g dm₀) was similar to previously reported values (17.0 g AIR/100 g dm, (Christensen, 2009)). All processing methods resulted in a significant decrease in AIR (p < 0.05), with raw apples having the greatest AIR, followed by frozen (16.8 ± 0.5 g AIR/100 g dm₀), freeze dried (15.2 ± 0.1 g AIR/100 g dm₀), and convective dried (13.1 ± 0.6 g AIR/100 g dm₀) apple samples. Convective dried apples had the greatest decrease in AIR of all processing treatments (~25%). This finding is similar to previous studies that have also observed significant decreases in AIR after convective drying (60 °C, 2 m/s), with up to 15 or 20% AIR losses being reported in orange pulp or skin, respectively (Garau et al., 2007).

Apple samples from all processing methods had significant decreases in AIR content after 180 min of *in vitro* gastric digestion (p < 0.05), compared to their initial values. After 180 min of *in vitro* gastric digestion, the AIR content of the raw, FN, FD and CD samples decreased to 16.7 ± 0.1, 15.9 ± 0.1, 12.6 ± 0.1 and 10.8 ± 0.7 dm₀, respectively. FD and CD samples had similar decreases in AIR as a result of digestion (~17% decrease); these decreases were greater than those observed in Raw or FN samples (~5% decrease). The greater changes in AIRs in FD and CD apple samples might be due to the breakdown of cell walls in the FD and CD samples that

was observed in the microstructural analysis, allowing the components to be more accessible to hydrolysis by gastric acid and enzymes during *in vitro* digestion. Yuliarti et al. (2008) also reported decreases in AIR content (32% decrease) as a result of *in vitro* digestion (with commercial enzyme preparations (Cellulyve, NS33048, Celluclast, and Cytolase) at 25 °C for 30 min) of golden kiwifruit.

3.1.3. Analysis of carbohydrate composition

Cell wall polysaccharides of raw and processed apples before and after 180 min of *in vitro* gastric digestion are shown in Table 1. The most abundant neutral sugar of the AIRs in all the samples was glucose, both before and after *in vitro* gastric digestion. Glucose was followed by arabinose, xylose, and galactose; rhamnose, fucose and mannose were minority sugars. The results obtained for the raw apples in this study were in the range of those previously described for *Granny Smith* apples by Chassagne-Berces et al. (2009).

Processed apple samples (before digestion) had significantly lower (p < 0.05) total cell wall polysaccharides compared to raw apples. Frozen samples showed the least change from raw apples, with only ~5% decrease in total sugars compared to raw apples. Chassagne-Berces et al. (2009) also reported a significant decrease of total cell wall polysaccharides in *Granny Smith* apples (~9%) after freezing in liquid nitrogen. However, freeze dried and convective dried apples showed much greater decreases in total sugars compared to raw apples (17 and 45% decrease from the raw value, for freeze and convective dried, respectively). Frozen apples showed a significant increase (p < 0.05) in glucose and decrease (p < 0.05) in uronic acids from raw apples. Freeze dried apples also had a statistically significant decrease in uronic acids, as well as arabinose and xylose. Convective dried apples had significantly lower values for all individual neutral sugars and uronic acids compared to raw apples (p < 0.05). Significant decreases in cell wall carbohydrate composition due to convective drying (60 °C at 2 m/s) of kiwifruit were also reported by Femenia et al. (2009).

No significant differences were observed between the specific carbohydrate composition of the raw apples before and after digestion, except a slight significant (p < 0.05) increase in both mannose and glucose. In addition, total sugars did not change (p > 0.05) in raw apples as a result of *in vitro* gastric digestion. Similar results were reported by Carnachan et al. (2012), who also observed no significant differences between the carbohydrate composition of fresh kiwifruit before and after *in vitro* digestion.

The carbohydrate composition of all processed apples significantly (p < 0.05) changed after digestion for most neutral sugars, except mannose. Additionally, the total sugars significantly decreased after digestion for all processed apples. Frozen and freeze dried apples had similar decreases in total sugars (13–17%

Table 1

Composition of the cell wall polysaccharides of raw and processed apple samples before and after 180 min of *in vitro* gastric digestion. Different lowercase letters indicate significant differences (p < 0.05) for each sugar in a sample before (initial) and after (180 min) *in vitro* gastric digestion. Different capital letters indicate significant differences between the different method of processing (Tukey's test, p < 0.05).

	Carbohydrate analysis (mg/100 g dm ₀)									
	AIRs (g/100 g dm ₀)	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Uronic Acids	Total
Raw Initial	17.5 ± 0.1a A	190 ± 50a A	190 ± 30a A	1400 ± 200a A	1300 ± 200a A	200 ± 20a A	1180 ± 40a A	4100 ± 70a A	2900 ± 500a A	11,500 ± 200a A
Raw 180 min	16.7 ± 0.1b	181 ± 4a	170 ± 10a	1300 ± 20a	1100 ± 90a	241 ± 7b	1140 ± 40a	4400 ± 200b	3190 ± 80a	11,700 ± 200a
FN initial	16.8 ± 0.5a B	200 ± 40a A	160 ± 7a A	1200 ± 100a A	1200 ± 100a A	240 ± 20a A	1300 ± 200a A	4700 ± 200a B	1960 ± 40a B	11,000 ± 200a B
FN 180 min	15.9 ± 0.1b	140 ± 30a	140 ± 10b	990 ± 20b	900 ± 50b	220 ± 20a	1200 ± 200a	3900 ± 300b	1640 ± 30b	9100 ± 300b
FD Initial	15.2 ± 0.1a C	140 ± 20a A	150 ± 10a A	1020 ± 70a B	940 ± 90a B	220 ± 30a A	1120 ± 90a A	4200 ± 400a AB	1700 ± 100a C	9490 ± 40a C
FD 180 min	12.6 ± 0.1b	100 ± 10b	130 ± 10a	810 ± 60b	740 ± 50b	200 ± 20a	1150 ± 90a	3700 ± 200b	1300 ± 100b	8100 ± 700b
CD Initial	13.1 ± 0.6a D	50 ± 5a B	53 ± 7a B	360 ± 20a C	450 ± 25a C	130 ± 30a B	560 ± 40a B	2600 ± 100a C	2000 ± 300a BC	6200 ± 400a D
CD 180 min	10.8 ± 0.7b	21 ± 2b	28 ± 4b	260 ± 30b	310 ± 40b	120 ± 50a	360 ± 50b	1600 ± 90b	1100 ± 200b	3800 ± 200b

of initial value), and convective dried apples had the greatest decrease in total sugars (38% decrease from initial value) during 180 min of *in vitro* gastric digestion. These decreases in total sugars follow a similar trend as the magnitude of microstructural damage observed in the SEM and LM analyses (Fig. 1), where convective drying resulted in the largest changes in microstructure, and freezing and freeze drying both resulted in significant, but similar, microstructural modifications.

3.2. Chemical characteristics

Fig. 2 shows the changes of chemical characteristics (moisture content, soluble solid content, and titratable acidity) of raw and processed apples during *in vitro* gastric digestion. The initial moisture content (Fig. 2a) of raw apples was of 6.81 ± 0.04 g water/g dm. This is similar to previously reported values for *Granny Smith* apples (6.8 – 7.7 g water/g dm (Chassagne-Berces et al., 2010)).

The moisture content (Fig. 2a) increased in all samples during *in vitro* gastric digestion, with raw and processed apples following a similar trend. The percentage of moisture content increase of raw, FN, FD and CD samples after 3 h of *in vitro* digestion were of 6 ± 1 , 10 ± 1 , 11 ± 2 and $8 \pm 1\%$ dm_o, respectively. All processed apples had a greater capacity to absorb water compared to raw apples. This was most likely due to the damage of the cellular structure caused by processing, which facilitated water transport within the food matrix. Previous *in vitro* and *in vivo* studies have reported increases in food moisture content during gastric

digestion. For example, Bornhorst, Chang, Rutherford, Moughan, and Singh (2013) observed moisture content increases of 75 and 23% dm_o in white and brown rice after 180 min of *in vivo* digestion in pigs, and Bornhorst, Roman, Dreschler, and Singh (2014) observed moisture content increases of 79 and 95% dm_o in raw and roasted almonds after 120 min of *in vitro* digestion.

Fig. 2b shows the evolution of the soluble solid content of raw and processed apples during *in vitro* gastric digestion. The initial soluble solid content of raw apples in this study (0.94 ± 0.04 g/g dm_o) was similar but slightly higher than previously reported values for *Granny Smith* apples (0.88 – 0.90 g/g dm_o (Chassagne-Berces et al., 2010)). No significant differences were observed between the soluble solid content of raw and FN samples before *in vitro* digestion. In contrast, FD and CD samples exhibited significant ($p < 0.05$) soluble solid losses (6 and 40% dm_o, respectively) in comparison to raw apples, most likely due to the rehydration step before digestion. These trends are similar to previously reported studies. Chassagne-Berces et al. (2010) also observed no significant effect of freezing on the soluble solid content of *Granny Smith* apples. Schulze, Hubbermann, and Schwarz (2014) reported soluble solid losses (19% dm_o) due to freeze-drying of *Granny Smith* apples. Maldonado, Arnau, and Bertuzzi (2010) reported that the soluble solid content of dried mango decreased by 70% after 100 min of rehydration in water.

As can be observed in Fig. 2b, significant decreases in soluble solid content were observed in all samples after 3 h of *in vitro* digestion (55 ± 4 , 70 ± 1 , 78 ± 5 , and $66 \pm 1\%$ dm_o in raw, FN, FD and CD apples, respectively). Soluble solid losses were higher in processed samples than in raw samples, the opposite trend as seen in the moisture absorption curves (Fig. 2a).

Fig. 2c shows the evolution of the titratable acidity in raw and processed samples during *in vitro* gastric digestion. The acidity of raw apples (5.1 ± 0.2 g/100 g dm) was similar to previously reported values for *Granny Smith* apples (4.2 – 5.4 g/100 g dm (Chassagne-Berces et al., 2010)). Frozen samples did not have significantly different titratable acidity compared to raw apples. However, the titratable acidity of FD and CD samples was significantly lower ($p < 0.05$; 9.5 and 37.5% dm_o, respectively) compared to raw and frozen apples. This decrease was mostly likely due to acid losses during the rehydration step of the dried apples prior to digestion.

The titratable acidity of all samples significantly decreased during *in vitro* digestion (Fig. 2c), with the greatest decreases occurring during the first 90 min. After 180 min of digestion, the acidity losses were of 44 ± 3 , 67 ± 5 , 72 ± 4 and $70 \pm 3\%$ dm_o, in raw, FN, FD and CD samples, respectively. Similar to the trend observed in soluble solid content decrease during digestion, all processed samples showed significantly ($p < 0.05$) greater acidity losses during digestion compared to raw samples. The trends observed in titratable acidity and soluble solid loss were the same as the decreases observed in total cell wall polysaccharides (Table 1) and the microstructural analysis, where raw < frozen < freeze dried < convective dried in terms of total changes from the initial state. These results suggest that microstructural changes during processing and digestion that prompt damage of cell walls result in losses of intercellular material, such as soluble solids and acid.

The Weibull model was used to mathematically describe the kinetics of moisture, soluble solid, and titratable acidity content in raw and processed apples during *in vitro* digestion. Table 2 shows the Weibull model parameters (α , β , C_{eq}) with the corresponding confidence intervals and the standard error associated with each estimated parameter. As can be observed, some confidence intervals and standard errors were high as a result of the simultaneous identification of a high number of parameters. Simulations obtained by disregarding any of the parameters were

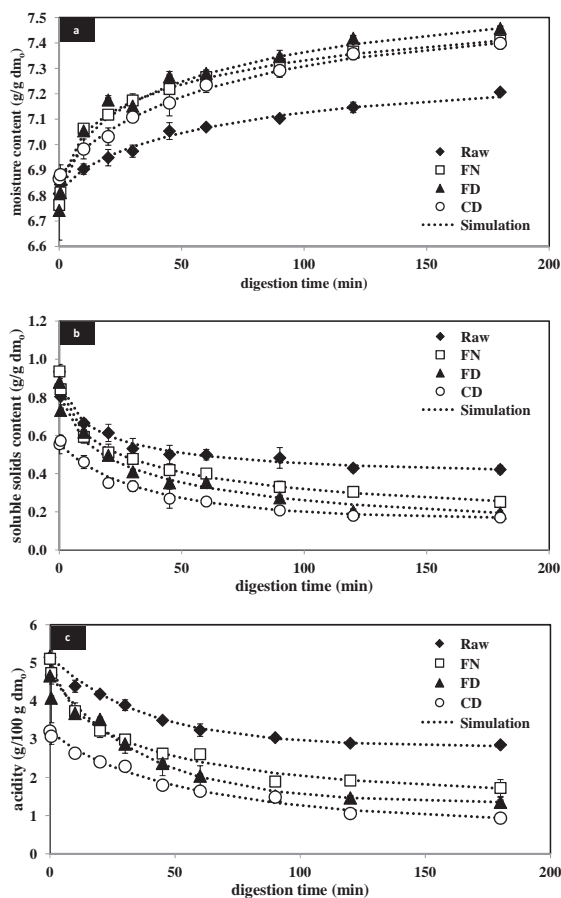


Fig. 2. Evolution of chemical characteristics of raw and processed apple samples during *in vitro* digestion: a-moisture content, b-soluble solids content and c-acidity.

Table 2

Parameters of the Weibull model and the corresponding confidence interval (CI) and standard error (SE) associated with each parameter. Change kinetics of moisture content, soluble solid content and titratable acidity for raw and processed apples during *in vitro* digestion.

		α (s)	CI (s)	SE	β	CI	SE	C_{eq}^a	CI ^a	SE	MRE
Moisture	Raw	11225.3	[-33258.1, 55708.7]	12711.4	0.595	[0.240, 0.950]	0.101	7.45	[6.52, 8.37]	0.26	0.1
	FN	2779.8	[-106.3, 5665.9]	824.7	0.505	[0.348, 0.663]	0.045	7.51	[7.30, 7.71]	0.06	0.1
	FD	2990.2	[-5146.5, 12516.9]	2523.7	0.594	[0.214, 0.730]	0.074	7.54	[7.08, 8.17]	0.16	0.2
	CD	3871.6	[2300.9, 5442.2]	448.8	0.864	[0.676, 1.051]	0.054	7.46	[7.36, 7.55]	0.03	0.1
Soluble solids	Raw	2269.7	[-4592.3, 9131.7]	1960.9	0.364	[0.148, 0.581]	0.062	0.31	[-0.07, 0.68]	0.11	2.6
	FN	2300.8	[333.6, 4268.0]	562.1	0.444	[0.342, 0.546]	0.029	0.15	[0.00, 0.31]	0.04	1.6
	FD	2990.2	[1636.6, 2922.5]	197.8	0.505	[0.204, 0.740]	0.093	0.11	[0.00, 0.23]	0.52	5.3
	CD	2043.3	[1175.8, 2910.8]	247.9	0.920	[0.515, 1.325]	0.116	0.17	[0.11, 0.23]	0.02	3.1
Acidity	Raw	3115.9	[-3699.1, 9930.8]	1947.4	0.646	[0.063, 1.228]	0.166	2.46	[0.56, 4.37]	0.54	2.6
	FN	2859.1	[-1345.8, 7064.1]	1201.6	0.535	[0.280, 0.791]	0.073	1.15	[-0.47, 2.76]	0.46	2.7
	FD	2556.8	[255.7, 4858.0]	657.6	0.885	[0.233, 1.537]	0.186	1.17	[-0.04, 2.37]	0.34	4.5
	CD	4805.9	[-2633.7, 12245.5]	1201.6	0.744	[0.336, 1.152]	0.073	0.45	[-1.22, 2.12]	0.46	4.1

The bold values correspond to the parameters identified with the Weibull model.

^a g/g dm_o for moisture and soluble solids contents and g/100 g dm_o for acidit.

not satisfactory; therefore, all parameters were retained in the model.

To statistically evaluate the accuracy of the proposed mathematical models and their capacity to simulate the experimental results and predict variation within the system, the mean relative error (MRE, Eq. (2)) was calculated for all samples by comparing experimental and predicted values. If the MRE is lower, the model provides a better fit to the experimental data (González-Centeno et al., 2015). The MRE (Table 2), was lower than 5.3% for all parameters of each model with average values of $0.1 \pm 0.1\%$, $3.2 \pm 1.5\%$ and $3.5 \pm 0.9\%$ for the simulation of the moisture, soluble solid, and titratable acidity kinetics, respectively. From these results, it can be seen that the proposed model successfully simulated the changes in moisture, soluble solid, and acidity during *in vitro* gastric digestion in raw and processed apples. The simulated curves of moisture (Fig. 2a), soluble solids (Fig. 2b) and titratable acidity (Fig. 2c) contents are shown with the observed values for all apple samples.

The α parameter of the Weibull model is related to the inverse of the change rate. As such, a lower α indicates a faster rate of change of a given quantity. As can be seen in Table 2, α decreased from 11225.3 s in raw sample to ~ 3000 s in processed apples for moisture content. This indicates that all of the processed samples had a faster rate of change in moisture content compared to the raw apple samples. Differences in α values for soluble solids and acidity kinetics between apple processing treatments were less evident, indicating all apples had similar rates of change of soluble solids and acidity. In the case of the acidity change kinetics, the CD sample had a greater α value, which was nearly 50% higher than that of the raw sample.

The shape parameter β represents a behavior index of the material during the process (González-Centeno et al., 2015). When β is equal to 1, the model corresponds to first order kinetics; with a constant input rate (Eim et al., 2013). However, when β has a value above or below 1, this parameter denotes the concavity (increasing change rate over time) or convexity (decreasing change rate over time) of the curve, respectively (González-Centeno et al., 2015). For all treatments and response variables, β was less than 1, indicating convexity in all of the curves and thus, decreasing change rate over time. For moisture content, convective dried apples had a higher β value (0.864) compared to the raw, frozen and freeze dried samples (β values of 0.595, 0.505 and 0.594, respectively). This may indicate that convective drying hampers hydration during *in vitro* digestion. Similar trends were observed in the soluble solid kinetics, with all samples exhibiting low but similar β values (0.364, 0.444 and 0.505 in raw, FN and FD samples, respectively) except the CD sample, with a β value of 0.920. A similar trend

was not observed in the β values of the acidity kinetics, which may indicate that although graphical trends are similar between acidity and soluble solid losses, their fundamental mechanisms of mass transport may be different.

The equilibrium concentration (C_{eq}) was similar in all samples for the moisture content change (7.49 ± 0.04 g/g dm_o). However, in soluble solid and acidity kinetics, raw samples had almost double the C_{eq} values compared to all of the processed samples, although not statistically significant. This trend may indicate that all processing treatments altered the cellular structure such that the processed apples lost a greater amount of soluble solids or acidity during digestion.

3.3. Release of bioactive compounds

The total polyphenol content and antioxidant activity (ABTS, CUPRAC, and FRAP methods) in raw and processed samples before (0 min) and after 60, 120 and 180 min of *in vitro* gastric digestion are given in Table 3. The TPC of raw apples (4.4 ± 0.2 mg GAE/g dm) was similar to previously reported values for *Granny Smith* apples by Francini and Sebastiani (2013) (4.9 ± 0.5 mg GAE/g dm). Prior to *in vitro* digestion, TPC in CD apples significantly increased ($p < 0.05$) $\sim 16\%$ dm_o while the TPC significantly decreased ($p < 0.05$) in FN and FD samples (45 and 34% dm_o, respectively) compared to raw apples.

The decrease in TPC in frozen and freeze dried apples was similar to previously reported values. Loncaric, Dugalic, Mihajljevic, Jakobek, and Pilizota (2014) observed decreases in the TPC of *Fuji* apples due to freezing and freeze-drying ($\sim 48\%$ dm). However, both increases and decreases in TPC have been seen as a result of convective drying. Some authors have reported TPC losses due to convective drying (Garau et al., 2007), concluding that the long drying times necessary with low process temperatures may promote the degradation of antioxidant compounds. However, in other cases, the TPC of samples dried by hot air increased, exhibiting a similar behavior to that observed in this study. Chang et al. (2006) reported TPC increases of 13–29% dm after convective drying of tomatoes compared to raw samples. The increase in TPC was most likely due to the release of polyphenolic compounds from the food matrix during drying.

As can be seen in Table 3, after 3 h of *in vitro* digestion, the TPC of the raw and FN, FD and CD samples significantly decreased by 32 ± 3 , 58 ± 4 , 55 ± 4 and $47 \pm 3\%$ dm_o, respectively. Similar decreases in TPC (from 44.6 to 62.7%) were reported by Bouayed, Hoffmann, and Bohn (2011) in *Jonaprinz*, *Jonagold*, *Golden* and *Mutza* apples during *in vitro* gastric digestion. After 180 min of digestion, raw apples retained the greatest amount of polyphenols,

Table 3

Total polyphenol content^a and antioxidant activity^b (ABTS, CUPRAC and FRAP methods) of raw and processed apple samples during *in vitro* digestion.

	TPC	ABTS	CUPRAC	FRAP
<i>Raw</i>				
0 min	4.4 ± 0.2a A	7.6 ± 0.3a A	12.5 ± 0.6a A	4.7 ± 0.2a A
60 min	3.7 ± 0.2b	7.4 ± 0.3a	10.7 ± 0.2b	4.4 ± 0.1b
120 min	3.4 ± 0.1c	7.3 ± 0.1a	10.1 ± 0.3b	4.3 ± 0.1b
180 min	3.0 ± 0.1d	7.1 ± 0.2a	9.1 ± 0.3b	4.2 ± 0.1b
<i>FN</i>				
0 min	2.4 ± 0.2a B	3.5 ± 0.1a B	5.4 ± 0.2a B	2.8 ± 0.2a B
60 min	1.9 ± 0.1b	2.5 ± 0.2b	4.9 ± 0.2b	2.1 ± 0.1b
120 min	1.4 ± 0.1c	1.7 ± 0.1c	3.7 ± 0.1c	1.3 ± 0.1c
180 min	1.0 ± 0.1d	0.9 ± 0.1d	2.3 ± 0.1d	0.6 ± 0.1d
<i>FD</i>				
0 min	2.9 ± 0.2a B	4.0 ± 0.3a C	6.9 ± 0.2a C	2.5 ± 0.1a B
60 min	2.4 ± 0.2a	3.3 ± 0.3 b	6.4 ± 0.2b	1.3 ± 0.1b
120 min	1.9 ± 0.1b	2.2 ± 0.2c	4.9 ± 0.3c	0.7 ± 0.1c
180 min	1.3 ± 0.1c	1.1 ± 0.1d	4.1 ± 0.2d	0.4 ± 0.1d
<i>CD</i>				
0 min	5.1 ± 0.4a C	9.4 ± 0.4a D	14.5 ± 0.9a A	5.3 ± 0.4a A
60 min	3.8 ± 0.2b	8.7 ± 0.4a	11.5 ± 0.5b	4.3 ± 0.2b
120 min	3.2 ± 0.2c	6.5 ± 0.3b	8.6 ± 0.8c	3.1 ± 0.3c
180 min	2.7 ± 0.2d	5.5 ± 0.3b	6.3 ± 0.2d	2.3 ± 0.1d

^a Results expressed in mg GAE/g dm₀.

^b Results expressed in mg trolox/g dm₀. For each analytical method and sample, different lowercase letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between different digestion times, and different capital letters indicate significant differences between different processing methods according to pairwise-Wilcoxon test ($p < 0.05$).

with the highest TPC (3.0 mg GAE/g dm₀). Interestingly, although CD samples had the highest initial TPC value (5.1 mg GAE/g dm₀), they did not have the highest TPC value after 180 min of gastric digestion (2.7 mg GAE/g dm₀). These results indicate that not only the initial TPC value, but also the structure of the food matrix, may be important in the release of nutrients from food matrices during digestion. Although bioaccessibility was not directly measured in the current study, these results highlight the influence of processing on nutrient release during *in vitro* gastric digestion, and may lead us to hypothesize that differences in bioaccessibility would be obtained as well. However, bioaccessibility determinations were outside the scope of this work, but are an area that merits future investigation.

In order to provide a more complete view of the antioxidant activity (AA) of the samples, three methods were used to evaluate the AA: ABTS, CUPRAC, and FRAP analyses. Due to the fact that each method is based on a different chemical system and/or reaction, different AA results could be expected depending on the specific analysis performed (González-Centeno et al., 2012). The selection of different methods allows a better understanding of the wide variety and range of action of antioxidant compounds present in apples (González-Centeno et al., 2012). The average values for the AA of raw apples were of 7.6 ± 0.3, 12.5 ± 0.6 and 4.7 ± 0.2 mg trolox/g dm₀ from the ABTS, CUPRAC and FRAP methods, respectively.

As can be observed in Table 3, raw and CD apples had the highest AA values before digestion (0 min), from the CUPRAC and FRAP assays, with no significant differences between them. However, by using the ABTS method, the AA of CD sample was 24% dm higher than that of the raw apples. FN and FD samples exhibited significant decreases ($p < 0.05$) in AA of 57 and 45% dm (CUPRAC assay) and 54 and 47% dm (ABTS assay), respectively, compared to raw apples. However, by using the FRAP method, no significant differences were observed between FN and FD samples, although both FN and FD samples exhibited significant decreases ($p < 0.05$; ~44% dm) compared to raw apples.

The results obtained for the AA of FN and FD samples prior to digestion were similar to those previously described by Loncaric

et al. (2014) for frozen (60% dm loss) and freeze-dried (64% dm loss) Fuji apples. However, antioxidant activity of CD samples did not follow the same trend. In the current study, CD samples had an increase in AA compared to the raw samples. This is different from several previous studies that have reported that convective drying processes may promote a decrease in antioxidant activity (Eim et al., 2013; Rodríguez, Santacatalina, et al., 2014). The differences observed in CD samples in this study are most likely related to the generation and accumulation of different antioxidant compounds having a varying degree of antioxidant activity and developing antagonistic or synergistic effects with themselves or with other constituents of the apple extract. Although a different AA method was used, a similar increase in AA after convective drying was observed by Vega-Gálvez et al. (2012). They found that the AA (using the DPPH method) of Granny Smith apples dried at 60 °C and 1.5 m/s in a convective drier increased by 87% after convective drying compared to raw apples. Other authors have also reported that processing either caused no change in the antioxidant activity of fruit and vegetables or enhanced it due to the improvement of antioxidant properties of naturally occurring compounds or formation of novel compounds such as Maillard reaction products with antioxidant activity (Amarowicz, 2009). Maillard-derived melanoidins, responsible for color change during the drying process, may be associated with increased antioxidant activity of the dried apples observed in the current study.

Raw apples had the least decrease in AA during *in vitro* gastric digestion (Table 3). The AA, as measured by the ABTS method, did not significantly change over 180 min in raw apples ($p < 0.05$). However, the AA, as measured by the CUPRAC and FRAP methods, significantly decreased between 0 and 60 min of digestion, but did not decrease significantly after longer digestion times ($p < 0.05$). These results indicate that although slight decreases in AA of raw apples might occur in the initial stages of digestion, the raw apple AA remained relatively stable throughout the gastric digestion process. These results are similar to those previously described by Bouayed et al. (2011) for the *in vitro* digestion of Jonaprinz, Golden and Mutza apples.

However, similar behavior was not observed in any of the processed apples. Both frozen and freeze dried apples showed significant decreases ($p < 0.05$) in AA across the entire *in vitro* digestion period for all measurement methods. Frozen apples had decreases of 74 ± 6, 57 ± 4 and 76 ± 4% dm₀ in AA after 180 min of gastric digestion as measured by the ABTS, CUPRAC, and FRAP methods, respectively. Similarly, freeze dried apples had decreases of 73 ± 7, 41 ± 3 and 88 ± 3% dm₀ after 180 min of gastric digestion as measured by the ABTS, CUPRAC and FRAP assays, respectively. Convective dried apples had similar results with AA measured by the CUPRAC and FRAP assays, where values significantly decreased ($p < 0.05$) with each increasing digestion time. However, in the AA measurements from the ABTS method, convective dried apples did not show a significant decrease in AA after 60 min of digestion compared to the initial value, but showed a decrease after 120 min of digestion that then stayed constant to 180 min of digestion. These results indicate that processing promoted the release of antioxidant compounds from the apple matrix during *in vitro* gastric digestion, most likely due to structural changes induced by processing. Future studies may be completed to determine if the release of antioxidant compounds during gastric digestion promotes or decreases their bioaccessibility and bioavailability.

With the aim of better evaluating the influence of the processing method on the TPC and AA changes in samples during *in vitro* digestion, the inverse of the input rate was estimated from the slope of the natural logarithm of the ratio of concentration/initial concentration vs the gastric digestion time (assuming a first order reaction with equilibrium concentration equal to zero). Table 4 shows the results obtained from these fittings together with the

Table 4

Kinetic reaction constants (exponential model), coefficient of determinations (r^2) and summed square of residuals (SSE) for TPC and AA (ABTS, CUPRAC and FRAP methods) changes during *in vitro* digestion of raw and processed apple samples.

	TPC			AA (ABTS)			AA (CUPRAC)			AA (FRAP)		
	α (s)	r^2	SSE	α (s)	r^2	SSE	α (s)	r^2	SSE	α (s)	r^2	SSE
Raw	161,800	0.98	0.004	161,900	0.98	0.004	32,750	0.96	0.002	86,700	0.90	0.001
FN	12,090	0.99	0.006	8608	0.97	0.030	14,760	0.91	0.048	7918	0.94	0.083
FD	14,870	0.98	0.008	9580	0.91	0.084	21,710	0.95	0.009	5761	0.97	0.067
CD	16,020	0.96	0.008	20,800	0.95	0.010	13,340	0.99	0.002	13,310	0.99	0.004

coefficients of determination (r^2) and the summed square of residuals (SSE). As can be seen in Table 4, r^2 and SSE had average values of 0.96 ± 0.03 and 0.02 ± 0.03 , respectively; as such, the model was considered satisfactory to describe the data. In general, it can be seen that α decreased with processing, indicating increases in the rate of change of TPC or AA during digestion. For example, α decreased 93, 91 and 90% for TPC in FN, FD and CD apples compared to raw apples. Similarly, α decreased in frozen, freeze dried, and convective dried apples ~ 87 – 95% , 34 – 59% and 85 – 93% for AA measured by ABTS, CUPRAC and FRAP methods, respectively. These results further confirm the finding that processing of apples promoted the release of polyphenols and antioxidant compounds from the apple matrix during *in vitro* gastric digestion.

4. Conclusions

Processing (freezing, freeze drying, and convective drying) modified the microstructure and initial composition of *Granny smith* apples compared to raw apples. Microstructural analyses, both SEM, LM, and carbohydrate composition indicated significant cellular destruction and changes in cell wall composition both as a result of processing and during 180 min of *in vitro* gastric digestion. These structural modifications resulted in behavioral changes in apples during *in vitro* gastric digestion. Processed apples showed faster decreases in soluble solids and titratable acidity compared to raw apples, while moisture content increases were greatest in processed samples during *in vitro* gastric digestion. Freezing and freeze drying resulted in decreases in total polyphenol content and antioxidant activity in apples, both before and during *in vitro* gastric digestion. Convective drying increased initial total polyphenol content and antioxidant activity of apples, but these values decreased during *in vitro* gastric digestion. In contrast, raw apples showed minor decreases in total polyphenol content and antioxidant activity during *in vitro* gastric digestion, and exhibited the greatest retention of polyphenolic and antioxidant compounds. Given the limited knowledge that is available on this subject at present, it would be interesting to deeply investigate in this area to better understand how processing can modify the structural characteristics of the ingested food to modulate the bioaccessibility and bioavailability of active compounds in food matrices.

Acknowledgements

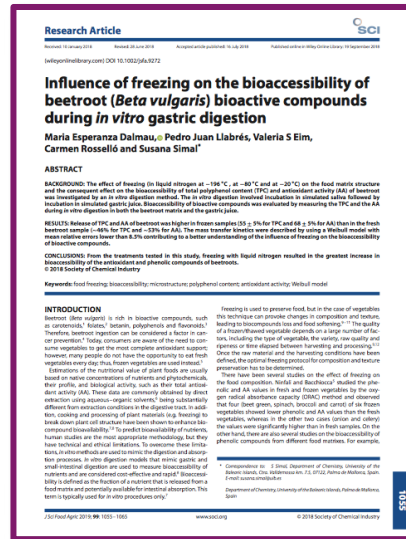
The authors acknowledge the financial support of the Spanish Government (MICINN) and European Regional Development Fund (FEDER) for the research projects DPI2012-37466-C03-02 and AGL 2012-34627, and the Balearic Government (FPI Grant and Project 57/2011) for the research fellowship (FPI/1814/2015) of the “Conselleria d’Innovació, Recerca i Turisme” of the Balearic Islands Government, co-financed by the European Social Fund (FSE).

References

Amarowicz, R. (2009). Antioxidant activity of Maillard reaction products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), 109–111.

- AOAC (1990). *Official method of analysis*. Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC (1997). *Official method of analysis*. Arlington, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54, 484–489.
- Bornhorst, G. M., Chang, L. Q., Rutherford, S. M., Moughan, P. J., & Singh, R. P. (2013). Gastric emptying rate and chyme characteristics for cooked brown and white rice meals *in vivo*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2900–2908.
- Bornhorst, G. M., Roman, M. J., Dreschler, K. C., & Singh, R. (2014). Physical property changes in raw and roasted almonds during gastric digestion *in vivo* and *in vitro*. *Food Biophysics*, 9, 39–48.
- Bornhorst, G., & Singh, R. (2013). Kinetics of *in vitro* bread bolus digestion with varying oral and gastric digestion parameters. *Food Biophysics*, 8(1), 50–59.
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14–21.
- Carnachan, S. M., Bootten, T. J., Mishra, S., Monro, J. A., & Sims, I. M. (2012). Effects of simulated digestion *in vitro* on cell wall polysaccharides from kiwifruit (*Actinidia* spp.). *Food Chemistry*, 133(1), 132–139.
- Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y., & Liu, Y. C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 478–485.
- Chassagne-Berces, S., Fonseca, F., Citeau, M., & Marin, M. (2010). Freezing protocol effect on quality properties of fruit tissue according to the fruit, the variety and the stage of maturity. *LWT – Food Science and Technology*, 43(9), 1441–1449.
- Chassagne-Berces, S., Poirier, C., Devaux, M.-F., Fonseca, F., Lahaye, M., Pigorini, G., et al. (2009). Changes in texture, cellular structure and cell wall composition in apple tissue as a result of freezing. *Food Research International*, 42(7), 788–797.
- Christensen, T. (2009). Nutritional Information, The Danish Food Composition Databank. Retrieved April 20, 2015, from http://www.foodcomp.dk/v7/fcdb_details.asp?FoodId=0336.
- Delgado, A. E., & Rubiolo, A. C. (2005). Microstructural changes in strawberry after freezing and thawing processes. *LWT – Food Science and Technology*, 38(2), 135–142.
- Eim, V. S., García-Pérez, J. V., Rosselló, C., Femenia, A., & Simal, S. (2012). Influence of the addition of dietary fiber on the drying curves and microstructure of a dry fermented sausage (Sobrassada). *Drying Technology*, 30(2), 146–153.
- 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.
- Ellis, P. R., Kendall, C. W. C., Ren, Y. L., Parker, C., Pacy, J. F., Waldron, K. W., & Jenkins, D. J. A. (2004). Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 604–613.
- Femenia, A., Sastre-Serrano, G., Simal, S., Garau, M. C., Eim, V. S., & Rosselló, C. (2009). Effects of air-drying temperature on the cell walls of kiwifruit processed at different stages of ripening. *LWT – Food Science and Technology*, 42(1), 106–112.
- Francini, A., & Sebastiani, L. (2013). Phenolic compounds in apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds characterization and stability during postharvest and after processing. *Antioxidants*, 2(3), 181–193.
- Garau, M. C., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chemistry*, 104(3), 1014–1024.
- 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.
- González-Centeno, M. R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., & Teissedre, P.-L. (2012). Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(48), 11850–11858.
- Grassby, T., Picout, D. R., Mandalari, G., Faulks, R. M., Kendall, C. W., Rich, G. T., et al. (2014). Modelling of nutrient bioaccessibility in almond seeds based on the fracture properties of their cell walls. *Food & Function*.
- Huang, L.-L., Zhang, M., Wang, L.-P., Mujumdar, A. S., & Sun, D.-F. (2012). Influence of combination drying methods on composition, texture, aroma and

- microstructure of apple slices. *LWT – Food Science and Technology*, 47(1), 183–188.
- Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Wu, T., Hashim, M. M., Lei, S., et al. (2014). Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. *LWT – Food Science and Technology*, 55(1), 16–21.
- Lewicki, P. P., & Pawlak, G. (2003). Effect of drying on microstructure of plant tissue. *Drying Technology*, 21(4), 657.
- Loncaric, A., Dugalic, K., Mihaljevic, I., Jakobek, L., & Pilizota, V. (2014). Effects of sugar addition on total polyphenol content and antioxidant activity of frozen and freeze-dried apple puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(7), 1674–1682.
- MacEvilly, C., & Peltola, K. (2008). The effect of agronomy, storage, processing and cooking on bioactive substances in food. *Plants: Diet and Health* (pp. 226–239). Blackwell Science Ltd.
- Maldonado, S., Arnau, E., & Bertuzzi, M. A. (2010). Effect of temperature and pretreatment on water diffusion during rehydration of dehydrated mangoes. *Journal of Food Engineering*, 96(3), 333–341.
- Mazzeo, T., Paciulli, M., Chiavaro, E., Visconti, A., Vincenzo, F., Ganino, T., et al. (2015). Impact of the industrial freezing process on selected vegetables Part II. Colour and bioactive compounds. *Food Research International*, 75, 89–97.
- Netzel, M., Netzel, G., Zabarás, D., Lundin, L., Day, L., & Addepalli, R. (2011). Release and absorption of carotenes from processed carrots (*Daucus carota*) using in vitro digestion coupled with a Caco-2 cell trans-well culture model. *Food Research International*, 44(4), 868–874.
- Paciulli, M., Ganino, T., Pellegrini, N., Rinaldi, M., Zaupa, M., Fabbri, A., et al. (2014). Impact of the industrial freezing process on selected vegetables Part I. Structure, texture and antioxidant capacity. *Food Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.019>.
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), R21–R32.
- Rodríguez, Ó., Ortuño, C., Simal, S., Benedito, J., Femenia, A., & Rosselló, C. (2014a). Acoustically assisted supercritical CO₂ extraction of cocoa butter: Effects on kinetics and quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 30–37.
- Rodríguez, Ó., Santacatalina, J. V., Simal, S., Garcia-Perez, J. V., Femenia, A., & Rosselló, C. (2014b). Influence of power ultrasound application on drying kinetics of apple and its antioxidant and microstructural properties. *Journal of Food Engineering*, 129, 21–29.
- Schulze, B., Hubbermann, E. M., & Schwarz, K. (2014). Stability of quercetin derivatives in vacuum impregnated apple slices after drying (microwave vacuum drying, air drying, freeze drying) and storage. *LWT – Food Science and Technology*, 57(1), 426–433.
- Tydemann, E. A., Parker, M. L., Faulks, R. M., Cross, K. L., Fillery-Travis, A., Gidley, M. J., et al. (2010a). Effect of carrot (*Daucus carota*) microstructure on carotene bioaccessibility in the upper gastrointestinal tract. 2. In vivo digestions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9855–9860.
- Tydemann, E. A., Parker, M. L., Wickham, M. S. J., Rich, G. T., Faulks, R. M., Gidley, M. J., et al. (2010b). Effect of carrot (*Daucus carota*) microstructure on carotene bioaccessibility in the upper gastrointestinal tract. 1. In vitro simulations of carrot digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9847–9854.
- Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Chacana, M., Vergara, J., Martínez-Monzó, J., García-Segovia, P., et al. (2012). Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices. *Food Chemistry*, 132(1), 51–59.
- Yuliarti, O., Goh, K., Matia-Merino, L., Mawson, J., Drummond, L., & Brennan, C. S. (2008). Effect of extraction techniques and conditions on the physicochemical properties of the water soluble polysaccharides from gold kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *International Journal of Food Science & Technology*, 43(12), 2268–2277.
- Zura-Bravo, L., Vega-Gálvez, A., Lemus-Mondaca, R., Ah-Hen, K. S., & Di Scala, K. (2013). Effect of temperature on rehydration kinetics, functional properties, texture and antioxidant activity of Red Pepper Var. Hungarian (*Capsicum Annuum* L.). *Journal of Food Processing and Preservation*, 37(1), 74–85.



CAPÍTULO III

Influence of freezing on the bioaccessibility of beetroot (*Beta vulgaris*) bioactive compounds during in vitro digestion

Maria Esperanza Dalmau, Pedro Juan Llabrés, Valeria S. Eim, Carmen Rosselló, Susana Simal

Journal of the science of food and agriculture

Volumen: 99

Páginas: 1055-1065

Índice de impacto (2017): 2.379

Agriculture, Multidisciplinary, Q1 (8/57)

Research Article

Received: 10 January 2018

Revised: 28 June 2018

Accepted article published: 16 July 2018

Published online in Wiley Online Library: 19 September 2018

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.9272

Influence of freezing on the bioaccessibility of beetroot (*Beta vulgaris*) bioactive compounds during *in vitro* gastric digestion

Maria Esperanza Dalmau,  Pedro Juan Llabrés, Valeria S Eim, Carmen Rosselló and Susana Simal*

ABSTRACT

BACKGROUND: The effect of freezing (in liquid nitrogen at -196°C , at -80°C and at -20°C) on the food matrix structure and the consequent effect on the bioaccessibility of total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA) of beetroot was investigated by an *in vitro* digestion method. The *in vitro* digestion involved incubation in simulated saliva followed by incubation in simulated gastric juice. Bioaccessibility of bioactive compounds was evaluated by measuring the TPC and the AA during *in vitro* digestion in both the beetroot matrix and the gastric juice.

RESULTS: Release of TPC and AA of beetroot was higher in frozen samples ($55 \pm 5\%$ for TPC and $68 \pm 5\%$ for AA) than in the fresh beetroot sample ($\sim 46\%$ for TPC and $\sim 53\%$ for AA). The mass transfer kinetics were described by using a Weibull model with mean relative errors lower than 8.5% contributing to a better understanding of the influence of freezing on the bioaccessibility of bioactive compounds.

CONCLUSIONS: From the treatments tested in this study, freezing with liquid nitrogen resulted in the greatest increase in bioaccessibility of the antioxidant and phenolic compounds of beetroots.

© 2018 Society of Chemical Industry

Keywords: food freezing; bioaccessibility; microstructure; polyphenol content; antioxidant activity; Weibull model

INTRODUCTION

Beetroot (*Beta vulgaris*) is rich in bioactive compounds, such as carotenoids,¹ folates,² betanin, polyphenols and flavonoids.³ Therefore, beetroot ingestion can be considered a factor in cancer prevention.⁴ Today, consumers are aware of the need to consume vegetables to get the most complete antioxidant support; however, many people do not have the opportunity to eat fresh vegetables every day; thus, frozen vegetables are used instead.⁵

Estimations of the nutritional value of plant foods are usually based on native concentrations of nutrients and phytochemicals, their profile, and biological activity, such as their total antioxidant activity (AA). These data are commonly obtained by direct extraction using aqueous–organic solvents,⁶ being substantially different from extraction conditions in the digestive tract. In addition, cooking and processing of plant materials (e.g. freezing) to break down plant cell structure have been shown to enhance bio-compound bioavailability.^{7,8} To predict bioavailability of nutrients, human studies are the most appropriate methodology, but they have technical and ethical limitations. To overcome these limitations, *in vitro* methods are used to mimic the digestion and absorption processes. *In vitro* digestion models that mimic gastric and small-intestinal digestion are used to measure bioaccessibility of nutrients and are considered cost-effective and rapid.⁸ Bioaccessibility is defined as the fraction of a nutrient that is released from a food matrix and potentially available for intestinal absorption. This term is typically used for *in vitro* procedures only.⁷

Freezing is used to preserve food, but in the case of vegetables this technique can provoke changes in composition and texture, leading to biocompounds loss and food softening.^{9–11} The quality of a frozen/thawed vegetable depends on a large number of factors, including the type of vegetable, the variety, raw quality and ripeness or time elapsed between harvesting and processing.^{9,12} Once the raw material and the harvesting conditions have been defined, the optimal freezing protocol for composition and texture preservation has to be determined.

There have been several studies on the effect of freezing on the food composition. Ninfali and Bacchiocca⁵ studied the phenolic and AA values in fresh and frozen vegetables by the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method and observed that four (beet green, spinach, broccoli and carrot) of six frozen vegetables showed lower phenolic and AA values than the fresh vegetables, whereas in the other two cases (onion and celery) the values were significantly higher than in fresh samples. On the other hand, there are also several studies on the bioaccessibility of phenolic compounds from different food matrixes. For example,

* Correspondence to: S Simal, Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, Ctra. Valldemossa km. 7.5, 07122, Palma de Mallorca, Spain. E-mail: susana.simal@uib.es

Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, Palma de Mallorca, Spain

Kamiloglu and Capanoglu¹³ evaluated the *in vitro* bioaccessibility of active compounds measuring the AA, total proanthocyanidin content and the major phenolic content of gastric juice after different phases of simulated gastrointestinal (GI) digestion of fresh and sun-dried 'Sarilop' (yellow) and 'Bursa siyahi' (purple) fig cultivars. The results of *in vitro* GI digestion revealed that AA in the gastric juice of the whole-fresh yellow and purple figs digestion increased by 9–26% and 1–22% respectively. Moreover, drying caused an increase of total antioxidant capacity, total proanthocyanidin content and chlorogenic acid content in the gastric juice during GI digestion of yellow (38%, 140%, and 50% respectively) and purple figs (18%, 60% and 5% respectively).

According to Bourne,¹⁴ the texture of foods is derived from their structure. Many studies have focused on the effects of freezing on textural quality of vegetables –including green asparagus stems, zucchini and green beans¹¹ and carrots¹⁵ – through mechanical and/or sensorial measurements of frozen/thawed vegetables or through microscopic measurements.¹⁶ Some workers^{10,17} have investigated chemical modifications during freezing that are responsible for pH, soluble solid, water content or color changes of frozen/thawed fruits and vegetables. In general, it is accepted that local structure is preserved better with fast freezing than slow freezing. Fast freezing induces the formation of an amount of small ice crystals; these cause less breakage of cell walls and less migration of water, and consequently the texture has a lower deterioration.¹⁶ However, the kinetics of too fast freezing can promote breakage of cell walls due to the differences of ice density with water, which leads to texture modification. In any case, the changes in the vegetable microstructure due to freezing, besides modifying the food texture, could also contribute to increasing the bioavailability of important biocompounds that could be easily released during digestion.

A Weibull model was previously used to describe enzymatic, chemical and microbial degradations, release extractions and hydration–dehydration kinetics.¹⁸ From a food engineering point of view, mathematical modeling has been used to understand the mass transfer mechanism, since it provides a quick and inexpensive determination of the effects of the conditions on the outcome of the digestion process.

Within this context, the main aim of this work was to evaluate the influence of different freezing methods on the bioaccessibility of bioactive compounds of beetroots (*B. vulgaris*) using an *in vitro* gastric digestion method.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Beetroot (*B. vulgaris* var. *conditiva*) was purchased from a local supermarket (initial moisture content of $6670 \pm 40 \text{ g kg}^{-1}$ dry matter (DM) and total soluble solids of 10.8 ± 0.4 °Brix), and stored at 4 °C for a maximum of 1 week. Cubes were cut (0.01 m edge) from the center regions of the beetroot tissue, not including the peel, and they were immediately processed.

Freezing processes

Three freezing protocols were used: immersion in liquid nitrogen (boiling point -196 °C; FN sample), at -80 °C in an ultra-freezer (CVF 525/86 Ing. Climas, Barcelona Spain) (F80 sample) and at -20 °C in a cold chamber (ACCV-125-2, Coreco, Barcelona Spain; F20 sample). For each treatment, samples were frozen until the sample core temperature reached the equilibrium with the freezing temperature (432 °C min^{-1} , 2.5 °C min^{-1} and 1.33 °C min^{-1} for

FN, F80 and F20 samples respectively). Once frozen, samples were thawed in a cold chamber at 4 ± 1 °C for *ca* 100 min, 60 min and 40 min for FN, F80 and F20 samples respectively. After thawing, samples were immediately subjected to *in vitro* digestion. Moreover, fresh beetroots (RAW) were used as a control.

In vitro digestion procedure

Beetroot samples (RAW, FN, F80 and F20) were digested following the *in vitro* gastric digestion method reported by Bornhorst *et al.*¹⁹ Briefly, simulated saliva was prepared with 1 g L^{-1} mucin, 2 g L^{-1} α -amylase, 0.117 g L^{-1} sodium chloride, 0.149 g L^{-1} potassium chloride and 2.10 g L^{-1} sodium bicarbonate solution at pH 7.0. Simulated gastric juice was prepared with 1 g L^{-1} pepsin, 1.50 g L^{-1} mucin and 8.78 g L^{-1} sodium chloride, mixed in deionized water with a pH of 1.8–2.0. All solutions were prepared daily.

Beetroot cubes (*ca* 200 g) were mixed with 80 mL of simulated saliva for 30 s, followed by immersion in 800 mL of simulated gastric juice previously heated to 37 °C. The mixture was incubated in a shaking water bath (Unitronic 320 OR, Selecta, Spain) at 37 °C and 100 rpm for up to 3 h. Beetroot samples were taken initially (no digestion), after mixing with saliva, and after 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min and 24 h of gastric digestion for moisture, acidity, total polyphenol content (TPC) and AA analyses; and initially (no digestion) and after 180 min of gastric digestion for microstructural analyses. Samples of gastric juice were taken after 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min and 24 h of *in vitro* gastric digestion for TPC and AA analyses. All digestion experiments were performed at least in triplicate, and results were expressed in initial DM (DM_0) to better compare among the different samples.

Microstructural analyses

Cell walls were observed by scanning electron microscopy (SEM) of raw and frozen beetroot samples before and after digestion. For SEM observation, beetroot cubes were soaked in liquid nitrogen, in order to be fractured with a sharp razor blade, and freeze-dried. Gold coating was performed using E-5400 equipment (Polaron, UK; 10^{-4} mbar, 20 mA, 80 s). Samples were then observed in an S-3400N Hitachi scanning electron microscope (Germany), accelerated at 15 kV and with vacuum pressure of 40 Pa.

Chemical analyses

Moisture of all beetroot samples was determined according to the AOAC official method no. 934.06²⁰ and expressed in grams water per gram DM_0 . Acidity of beetroot samples was determined according to the AOAC official method no. 942.15²¹ and expressed in malic acid equivalent per kilogram DM_0 .

To determine the TPC and AA, methanol extracts from beetroot samples were prepared according to the methodology described by Eim *et al.*¹⁸ Samples were accurately weighed (~ 2.0 g), and 20 mL of methanol extraction solvent was added. Mixtures were homogenized using an Ultra-Turrax T25 Digital (IKA, Staufen, Germany) at 13 000 rpm for 1 min at 4 °C, and the solutions were refrigerated overnight. Mixtures were centrifuged at 4000 rpm for 10 min, followed by filtration. The extracts were further refrigerated at 4 °C until analysis. Gastric juice samples were analyzed directly without further extraction.

The TPC was determined by means of the Folin–Ciocalteu assay according to Eim *et al.*¹⁸ The AA was determined by using the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS;

radical cation scavenging activity) assay, FRAP (ferric reducing antioxidant power) assay, and CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) assay according to González-Centeno *et al.*²² The TPC was expressed as grams of gallic acid equivalent (GAE) per kilogram DM_o for beetroots and grams of GAE per liter for gastric juice. The AA was expressed as grams of Trolox per kilogram DM_o for beetroots and grams of Trolox per liter for gastric juice. The TPC and AA of the beetroot cubes will be represented as bioaccessibility:

$$\text{bioaccessibility} = \frac{C}{C_o} \times 100 \quad (1)$$

All the analyses were performed in triplicate on samples from each digestion.

Mathematical model

Changes in the TPC and the AA (ABTS, FRAP, and CUPRAC assays) at different times during *in vitro* gastric digestion in both the beetroot matrix and the gastric juice were evaluated. The bioaccessibility kinetics were mathematically described by a Weibull model:

$$\frac{C - C_{eq}}{C_o - C_{eq}} = e^{-(t/\alpha)^\beta} \quad (2)$$

where C_{eq} is the equilibrium concentration. The shape parameter β represents a behavior index of the material during the process.²³ $\beta = 1$ corresponds to a model with first-order kinetics, which has a constant input rate.¹⁸ $\beta > 1$ or $\beta < 1$ indicates the concavity (increasing change rate over time) or convexity (decreasing change rate over time) of the curve respectively.²⁴ The α parameter can be related to the inverse of the change rate. The fitting parameters of the model were α and β . The C_{eq} was assumed to be equal to the experimental value after 24 h of *in vitro* digestion.²⁵

Statistical analysis

Statistical analyses were carried out using R 3.1.0 software. All data, averages of three replicates, are presented as mean values with their standard deviations. Results were analyzed by parametric analysis of variance and Tukey's tests at $P < 0.05$ to evaluate the existence of significant differences among samples.

The identification of the Weibull model parameters α and β was carried out by using the 'fitnlm' function of the optimization toolbox of Matlab R2014a (The MathWorks Inc., Natick, MA, USA) which estimates the coefficients of a nonlinear regression function and the residuals using least squares. To determine the confidence intervals (CIs, 95%) of the parameters and the standard error of the estimated parameters (SE), the 'coefCI' function and the covariance matrix were used respectively. The mean relative error (MRE), given in Eqn (3), estimated the capacity to simulate the experimental values.²⁵ The lower the MRE, the better the fit provided by the model.²⁶

$$\text{MRE} = \frac{\sum_{i=1}^n (|C_{exp} - C_{calc}|/C_{exp})}{n} \times 100 \quad (3)$$

where C_{exp} and C_{calc} are the experimental and calculated average concentration respectively and n is the number of experimental data.

RESULTS AND DISCUSSION

Changes in food matrix structure during *in vitro* digestion

Microstructural changes (SEM)

The images of raw and freezing samples before and after 180 min of *in vitro* gastric digestion are shown in Fig. 1. Figure 1(a₁) shows the microstructure of RAW samples prior to *in vitro* gastric digestion. RAW samples were composed almost of isodiametrical and polyhedral cells with few intercellular spaces, as was previously observed by Nayak *et al.*²⁷ Significant cell lysis was observed after 180 min of *in vitro* gastric digestion (Fig. 1(a₂)), resulting in an increment in the intercellular space with a smaller number of cells per unit area, which may be due to the hydration of cells. Similar to the present study, Carnachan *et al.*²⁸ observed cell lysis and an increase in the intercellular space after *in vitro* digestion of kiwi pulp. Also, Dalmau *et al.*²⁹ observed a significant cell lysis after 180 min of gastric digestion in raw 'Granny Smith' apples.

Figure 1(b₁) shows the microstructure of FN samples before *in vitro* digestion. This image indicates that freezing by immersion in liquid nitrogen resulted in cracks in the sample matrix compared with the RAW samples. Similar effects were observed by Chassagne-Berces *et al.*⁹ in apples that were frozen by immersion in liquid nitrogen. Otero *et al.*³⁰ observed fruit freeze-cracking during the freezing of both peach and mango with liquid nitrogen, which resulted in irreversible macroscopic damage. Less porous structure and cell collapse was evident after 180 min of *in vitro* gastric digestion (Fig. 1(b₂)) of FN samples. Similar effects were observed in apples frozen by immersion in liquid nitrogen by Dalmau *et al.*²⁹

The cellular structure of F80 samples did not differ much from the RAW samples (Fig. 1(c₁)). Chassagne-Berces *et al.*⁹ observed that the cellular structure of apple after freezing at -80°C was not affected by the process, similar to the present study. After 180 min of *in vitro* gastric digestion, cellular collapse was more visible compared with RAW beetroot samples after digestion (Fig. 1(c₂)).

Figure 1(d₁) shows the microstructure of beetroot samples frozen at -20°C (F20 samples). Freezing at -20°C induced larger changes of the cellular structure than in the other freezing methods; significant cell wall collapse was observed in addition to more and larger intercellular spaces. These effects were also observed in frozen strawberries and apples.^{9,16} These authors observed more and larger intercellular spaces, and cell walls collapsed, resulting in large changes in the cellular structure induced by freezing at -20°C . After 180 min of *in vitro* gastric digestion (Fig. 1(d₂)), less porous structure and cell collapse were evident, resulting in cell walls less visible compared with other samples. The F20 samples exhibited the greatest changes compared with F80 and FN samples (faster freezing), probably caused by the osmotic imbalance due to ice crystal formation.^{9,31}

Overall, microstructural changes were observed as a result of both freezing and *in vitro* gastric digestion compared with the undigested RAW beetroot samples. Compared with the RAW beetroots, F20 beetroots exhibited the greatest changes, both before and after digestion; however, FN and F80 beetroots exhibited less changes, both before and after digestion.

Moisture and acidity content

Table 1 shows the changes in moisture and acidity contents of raw and frozen beetroot during *in vitro* gastric digestion. The initial moisture content (6670 ± 40 g water per kilogram DM) of RAW beetroot samples was similar to the previously reported value for beetroot by the United States Department of Agriculture³²

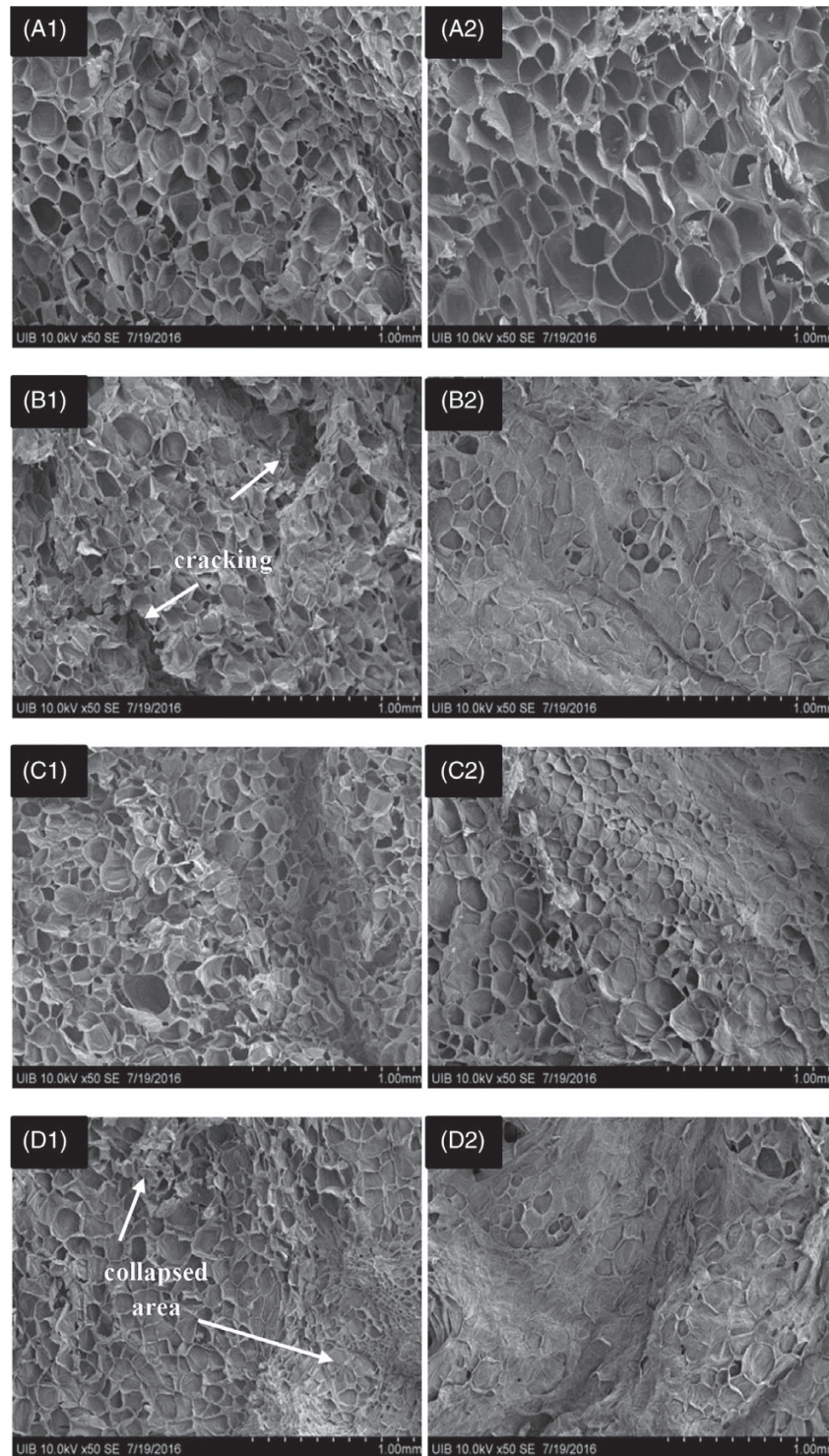


Figure 1. SEM images of beetroot samples: (a₁, a₂) fresh beetroot, (b₁, b₂) frozen at -196°C by immersion in liquid nitrogen, (c₁, c₂) frozen at -80°C and (d₁, d₂) frozen at -20°C ; subscripts 1 and 2 indicate initial beetroot samples (prior to *in vitro* digestion) and after 180 min of *in vitro* gastric digestion respectively.

Table 1. Changes in moisture and acidity content of raw and frozen beetroots during *in vitro* digestion

Digestion time (min)	Moisture content (g water/kg DM _o)				Acidity (g malic acid/kg DM _o)			
	RAW	FN	F80	F20	RAW	FN	F80	F20
0	6670 ± 40c	6660 ± 70c	6850 ± 20b	6930 ± 70a	790 ± 20b	980 ± 30a	550 ± 60c	480 ± 50c
0.5	6750 ± 10	6790 ± 40	6900 ± 20	6950 ± 30	760 ± 10	1020 ± 30	640 ± 10	580 ± 10
10	6860 ± 20	6990 ± 40	7100 ± 30	7120 ± 20	820 ± 20	1090 ± 10	680 ± 20	730 ± 90
20	6910 ± 30	7060 ± 80	7130 ± 20	7150 ± 10	940 ± 30	1150 ± 20	860 ± 30	900 ± 50
30	6920 ± 30	7120 ± 80	7170 ± 30	7190 ± 10	1030 ± 10	1300 ± 90	1170 ± 10	1220 ± 50
45	6950 ± 40	7160 ± 80	7190 ± 10	7240 ± 20	1220 ± 10	1500 ± 80	1320 ± 60	1540 ± 10
60	6990 ± 40	7180 ± 60	7240 ± 20	7260 ± 10	1430 ± 10	1640 ± 40	1500 ± 30	1830 ± 50
90	7030 ± 10	7230 ± 50	7250 ± 20	7280 ± 10	1500 ± 10	1650 ± 90	1620 ± 30	1990 ± 90
120	7040 ± 20	7240 ± 50	7280 ± 10	7290 ± 20	1450 ± 20	1690 ± 90	1740 ± 90	2000 ± 60
180	7080 ± 30	7290 ± 20	7300 ± 10	7310 ± 10	1440 ± 20	1550 ± 60	1720 ± 50	1980 ± 90

Different lowercase letters for the same parameter indicate significant differences between samples. RAW, fresh beetroot; FN, frozen at -196°C by immersion in liquid nitrogen; F80, frozen at -80°C ; F20, frozen at -20°C .

(7100 ± 700 g water per gram DM). No significant differences ($P < 0.05$) were observed among the initial moisture contents of RAW and FN samples; the same behavior was observed by Dalmau *et al.*²⁹ in frozen apples by immersion in liquid nitrogen. However, initial moisture contents of F80 and F20 samples were significantly higher ($P < 0.05$; $3.2 \pm 0.9\%$ DM_o) than that of the RAW beetroot. This may be because the slower freezing at -20 and -80°C causes the formation of large ice crystals. These ice crystals grow at an extracellular level by drawing water from cells, resulting in cellular dehydration and irreversible damage to cell structure and texture.¹⁵ Marín *et al.*¹⁷ observed that the moisture of mango samples frozen at -40°C depended on the variety. For example, the moisture of Palmer variety mangoes increased 1.5% in fresh weight after freezing, whereas the moisture content of Davis-Haden variety mangoes decreased 1.1% in fresh weight after freezing.

The moisture content increased in all samples after 180 min *in vitro* gastric digestion by 6.1%, 9.1%, 9.3% and 9.4% DM_o for RAW, FN, F80 and F20 samples respectively. All of the frozen samples after digestion had a similar moisture content without significant differences between them. The largest changes in moisture took place during the first 20 min of digestion (3.5%, 6.0%, 4.1% and 3.1% DM_o for RAW, FN, F80 and F20 samples respectively). Frozen samples exhibited a higher capacity to absorb water than the RAW samples did. This could be due to water transport within the food matrix being facilitated by the damage of the cellular structure caused by freezing.³³ Previous *in vitro* digestion studies have also reported increases in food moisture content. For example, Bornhorst *et al.*¹⁹ observed an increase of moisture content of 79 and 95% DM_o in raw and roasted almonds after 120 min of *in vitro* digestion. Dalmau *et al.*²⁹ observed a moisture content increase of $10 \pm 1\%$ DM_o in frozen *Granny Smith* apples by immersion in liquid nitrogen after 180 min of *in vitro* gastric digestion.

The initial acidity of RAW beetroots ($790 \pm 2\text{ g kg}^{-1}$ DM) was similar to the values (700–900 g malic acid/kg DM) previously reported by Chandra *et al.*³⁴ for beetroot. Acidity of FN samples was significantly higher ($P < 0.05$; 25% DM_o increase), whereas it was significantly lower ($P < 0.05$; $35 \pm 7\%$ DM_o decrease) in F80 and F20 samples, compared with RAW sample. This was probably due to the damage of the cellular structure promoted by the low freezing rates, promoting lixiviation of acids during thawing. Similar increases were observed in frozen mango (-40°C) by Marín *et al.*¹⁷

The acidity of all samples significantly increased during *in vitro* digestion, with the highest increases taking place during the first 60 min and values remaining almost constant from 60 to 180 min. After 180 min of digestion, the acidity gains were of $83 \pm 1\%$, $97 \pm 2\%$, $119 \pm 1\%$ and $153 \pm 4\%$ DM_o in the RAW, FN, F80 and F20 samples respectively. All frozen samples showed significantly ($P < 0.05$) higher acidity gains during digestion compared with the RAW samples. These results suggest that microstructural changes during freezing, thawing and digestion promoted the damage of cell walls, resulting in different rates of acid uptake. The F20 samples had the largest increase in acidity during *in vitro* gastric digestion compared with the other beetroot samples. This could be due to the slower freezing rate, which promoted the formation of larger crystals. These crystals may have caused more damage to the cellular structure and facilitated the solute-water transport. The results obtained in this study are contrary to those obtained by Dalmau *et al.*²⁹ who observed that the acidity of raw and 'Granny Smith' apples frozen by liquid nitrogen decreased significantly during *in vitro* digestion. The decreases in acidity during digestion observed in this previous study were hypothesized to be caused by the greater acidity of raw apples before digestion ($510 \pm 20\text{ g kg}^{-1}$ malic acid), which may have been higher than the acidity of the gastric juice. However, the acidity of raw beetroots before digestion only was of $790 \pm 20\text{ g kg}^{-1}$ malic acid (DM), which was significantly lower than the acidity of gastric juice, resulting in acid uptake into the beetroot sample when immersed in gastric juice. However, Mennah-Govela and Bornhorst³⁵ saw increases in acidity, like in this study, of gastric juice from digestion on sweet potatoes.

Bioaccessibility of bioactive compounds

In order to evaluate the bioaccessibility of bioactive compounds during *in vitro* gastric digestion of beetroot samples, TPC and AA were measured at different times during the experiments in both the food and the gastric juice.

Figure 2 shows the bioaccessibility of TPC (Fig. 2(A)) and AA (ABTS method in Fig. 2(B), CUPRAC method in Fig. 2(C), and FRAP method in Fig. 2(D)) of RAW and frozen beetroots matrix during 180 min of *in vitro* gastric digestion. The equilibrium values (after 24 h of *in vitro* gastric digestion) for each sample are shown in Table 2.

The same initial TPC in RAW samples ($4.2 \pm 0.2\text{ g GAE/kg DM}$) was previously reported for *B. vulgaris* beetroots by Kujala *et al.*³⁶

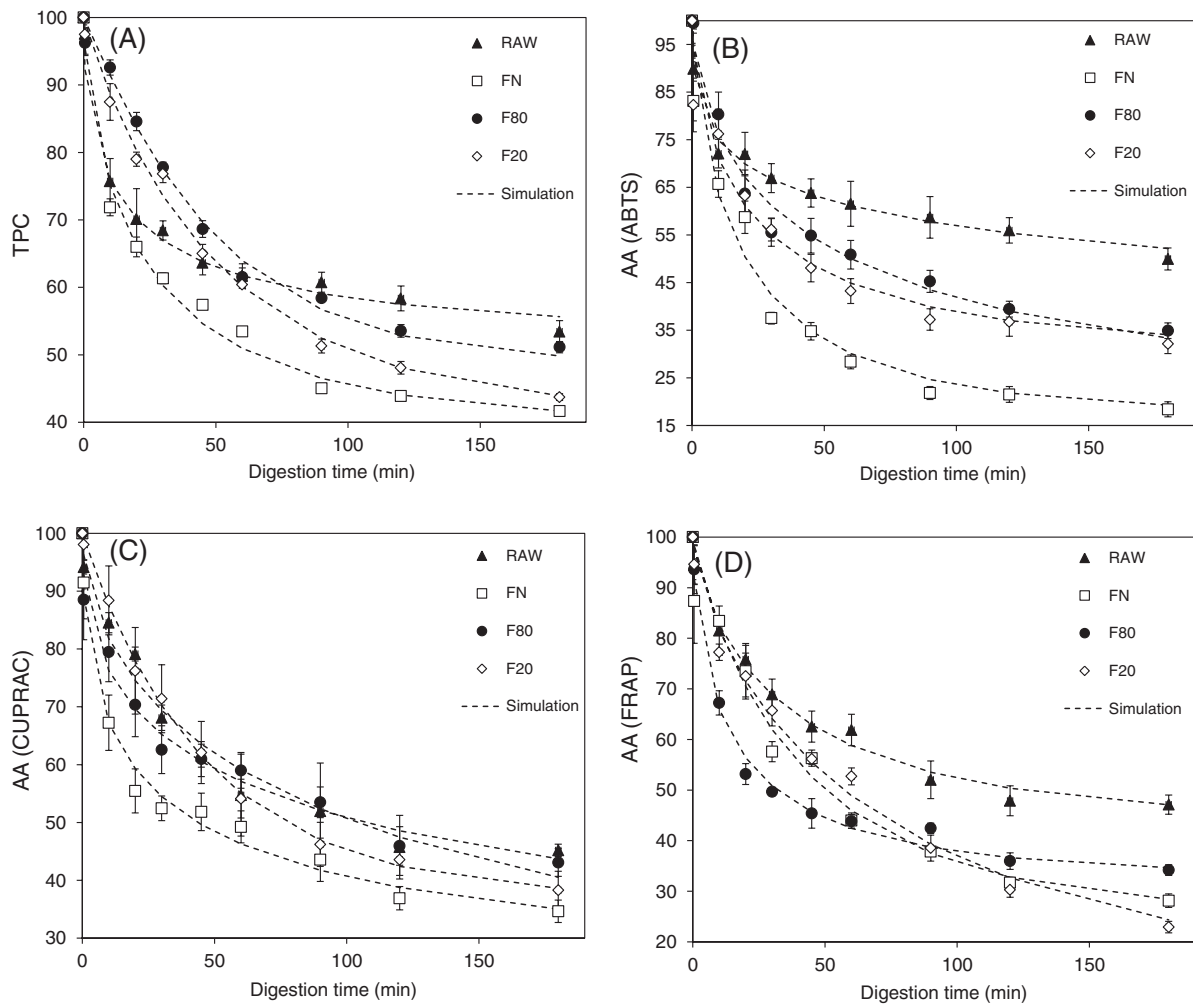


Figure 2. Bioaccessibility. Release of (A) total polyphenol content (TPC) and (B–D) antioxidant activity (AA) from the raw and frozen beetroot samples during *in vitro* gastric digestion. ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); FRAP, ferric reducing antioxidant power; CUPRAC, cupric reducing antioxidant capacity.

The frozen samples had, on average, a $38 \pm 6\%$ decrease in initial TPC compared with the RAW samples ($P < 0.05$). Similar decreases in TPC in other frozen agricultural products have been observed in previous studies. A 48% decrease in TPC was observed in frozen 'Fuji' apples by Loncaric *et al.*³⁷ Similarly, Dalmau *et al.*²⁹ observed TPC losses (46%) in 'Granny Smith' apples frozen by immersion in liquid nitrogen. However, Ninfali and Bacchiocca⁵ observed higher TPC losses (69%) in frozen (-18°C) beetroot greens than those observed in the present study for frozen beetroot.

Not only was the initial TPC of frozen beetroot samples lower than that of the RAW samples, but also the frozen beetroot samples exhibited greater decreases in TPC ($58.3 \pm 0.4\%$, $48.9 \pm 0.6\%$ and $56.3 \pm 0.8\%$ in FN, F80 and F20 samples respectively) than the RAW sample ($46.6 \pm 0.2\%$) after 180 min of *in vitro* gastric digestion. The equilibrium (after 24 h) values of TPC (Table 2) were significantly lower in frozen samples than in the RAW samples. The FN samples had the lowest value (0.95 g GAE/kg DM) compared with raw beetroots (2.20 g GAE/kg DM). Similar decreases in TPC (of 44.6%)

were reported by Bouayed *et al.*⁶ in 'Jonaprinz' apples during 60 min of *in vitro* gastric digestion. Similarly, Kamiloglu *et al.*³⁸ observed a 65% TPC decrease in black carrots after 120 min of *in vitro* gastric digestion. Chen *et al.*³⁹ observed that the TPC significantly decreased in 25 of the 33 fruits examined (8–73% decrease) during *in vitro* gastric digestion, including apple, orange and sugar cane. Dalmau *et al.*²⁹ observed a $32 \pm 3\%$ and $58 \pm 4\%$ decrease in the TPC of 'Granny Smith' apples that were raw and frozen with liquid nitrogen respectively after 180 min of *in vitro* gastric digestion.

Three methods were used to evaluate the AA of both the beetroot samples and the gastric juice: ABTS, CUPRAC and FRAP analyses. The selection of different methods allows a better understanding of the wide variety and range of action of antioxidant compounds present in beetroots. The average values for the AA of RAW beetroot were of $12.4 \pm 0.9 \text{ g Trolox/kg DM}$, $25.5 \pm 0.9 \text{ g Trolox/kg DM}$ and $12.1 \pm 0.8 \text{ g Trolox/kg DM}$ as measured by the ABTS, CUPRAC and FRAP methods respectively.

Table 2. Bioaccessibility. Release of total polyphenol content and antioxidant activity (ABTS, CUPRAC and FRAP) from raw and frozen beetroot samples during *in vitro* gastric digestion. The equilibrium values C_{eq}^a were measured experimentally as the value after 24 h *in vitro* gastric digestion. The identified parameters of the Weibull model and the corresponding confidence interval (CI) and standard error (SE) associated with each parameter were determined using Matlab and the mean relative error (MRE) calculated by comparing experimental and predicted values

	C_{eq}^a	$\alpha \times 10^3$ (s)	CI (s)	SE	β	CI	SE	MRE
<i>Total polyphenol content</i>								
RAW	2.20 ± 0.02a	1.394	[1.114, 1.673]	0.121	0.536	[0.430, 0.643]	0.046	1.9
FN	0.95 ± 0.08c	1.693	[1.323, 2.063]	0.160	0.658	[0.484, 0.832]	0.075	2.6
F80	1.24 ± 0.07b	2.991	[2.693, 3.288]	0.129	1.057	[0.886, 1.229]	0.074	1.8
F20	1.19 ± 0.01b	3.099	[2.849, 3.349]	0.109	0.934	[0.821, 1.048]	0.049	1.3
<i>Antioxidant activity</i>								
<i>ABTS</i>								
RAW	4.46 ± 0.18a	4.340	[3.618, 5.063]	0.313	0.351	[0.301, 0.402]	0.022	1.5
FN	1.31 ± 0.11d	1.366	[0.964, 1.767]	0.174	0.652	[0.429, 0.876]	0.097	6.8
F80	1.59 ± 0.11c	3.572	[2.900, 4.244]	0.291	0.565	[0.442, 0.688]	0.053	3.7
F20	2.83 ± 0.02b	1.650	[1.117, 2.183]	0.231	0.600	[0.383, 0.817]	0.094	4.6
<i>CUPRAC</i>								
RAW	4.24 ± 0.18a	7.257	[5.620, 8.894]	0.710	0.561	[0.438, 0.684]	0.053	3.9
FN	1.84 ± 0.12d	2.017	[1.660, 2.374]	0.155	0.439	[0.365, 0.513]	0.032	3.4
F80	2.10 ± 0.01c	5.179	[4.144, 6.215]	0.449	0.447	[0.362, 0.533]	0.037	2.8
F20	3.12 ± 0.11b	2.870	[2.722, 3.018]	0.064	0.965	[0.888, 1.042]	0.033	1.4
<i>FRAP</i>								
RAW	5.33 ± 0.21a	2.406	[2.090, 2.722]	0.137	0.708	[0.587, 0.829]	0.053	2.0
FN	1.06 ± 0.08c	2.637	[2.094, 3.180]	0.236	0.861	[0.602, 1.120]	0.112	4.3
F80	2.15 ± 0.11b	1.104	[0.915, 1.292]	0.082	0.565	[0.471, 0.659]	0.041	2.8
F20	0.76 ± 0.03d	4.477	[3.979, 4.975]	0.216	0.726	[0.623, 0.829]	0.045	3.7

For each analytical method different lowercase letters indicate significant differences between different samples. RAW, fresh beetroot; FN, frozen at -196°C by immersion in liquid nitrogen; F80, frozen at -80°C ; F20, frozen at -20°C ; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); FRAP, ferric reducing antioxidant power; CUPRAC, cupric reducing antioxidant capacity.
^a Units: g GAE/kg DM₀ for total polyphenol content; g Trolox/kg DM₀ for antioxidant activity.

Figure 2(B–D) shows changes in the antioxidant bioaccessibility (ABTS, CUPRAC and FRAP assays respectively) in raw and frozen beetroot samples during *in vitro* digestion.

Before *in vitro* digestion, RAW beetroots had the highest AA values. Owing to freezing, FN samples exhibited higher ($P < 0.05$) AA decreases ($\sim 40\%$ by the ABTS method, $\sim 72\%$ by the CUPRAC method and $\sim 66\%$ by the FRAP method), compared with the RAW samples. FN samples also had a greater decrease than the samples frozen at higher temperatures (F80 and F20 samples; $\sim 33\%$ by the ABTS method, $\sim 67\%$ by the CUPRAC method and $\sim 44\%$ by the FRAP method respectively). Loncaric *et al.*³⁷ obtained similar results for frozen 'Fuji' apples (60% loss according to the ABTS method). Moreover, Dalmau *et al.*²⁹ obtained similar results for the AA for 'Granny Smith' apples samples frozen with liquid nitrogen with the ABTS, CUPRAC and FRAP methods (54%, 57% and 40% decrease respectively).

The RAW beetroot sample had the smallest decrease in AA during *in vitro* gastric digestion ($53 \pm 1\%$), whereas the FN sample had the greatest AA decrease ($73 \pm 8\%$) after 180 min of digestion. The F20 and F80 samples exhibited similar AA decreases during *in vitro* digestion, except when AA was measured by using the FRAP method (Fig. 2(B–D)). These trends indicate that all freezing treatments altered the cellular structure such that the freezing beetroot lost greater amounts of polyphenols and antioxidant compounds during *in vitro* gastric digestion. However, the frozen samples had lower initial antioxidant contents than the RAW samples, which may have also influenced the rate of release during digestion.

In order to evaluate whether the losses in bioactive compounds observed in the beetroot samples during *in vitro* digestion were due to their release to the gastric juice or due to their degradation during *in vitro* gastric digestion, the TPC and AA (ABTS, CUPRAC and FRAP methods) were also measured in the gastric juice at different times during the *in vitro* gastric digestion of raw and frozen samples (Fig. 3). Figure 3(A) shows the TPC of the gastric juice during *in vitro* digestion of beetroot samples. Although the final TPC of gastric juice from all of the samples after 3 h was similar, (average of 0.16 ± 0.01 g GAE/L), the release rates were different (Fig. 3(A)). Gastric juice from RAW, FN and F20 sample digestion exhibited the lowest increases in TPC during the *in vitro* gastric digestion ($102 \pm 5\%$), whereas the F80 sample had the highest (111%) among the processed samples. The equilibrium content of TPC (after 24 h of *in vitro* gastric digestion) was not significantly different between all treatments. Figure 3(B–D) shows the AA (ABTS, CUPRAC and FRAP assays respectively) in the gastric juice from during *in vitro* digestion of beetroot samples. Gastric juice of all samples exhibited a similar increase in AA during the *in vitro* gastric digestion ($100 \pm 4\%$).

By comparing Figs 2 and 3, it can be seen that the percentages of TPC and AA gain in gastric juice after 180 min of *in vitro* digestion were higher than the TPC and AA losses from the raw and frozen samples, especially in the RAW sample. For example, the gain of TPC in gastric juice from the F80 sample after 180 min of *in vitro* digestion was 111%. However, this sample lost 49% of TPC from beetroot cubes after 180 min of *in vitro* digestion. These TPC and AA increases in gastric juice after *in vitro* digestion

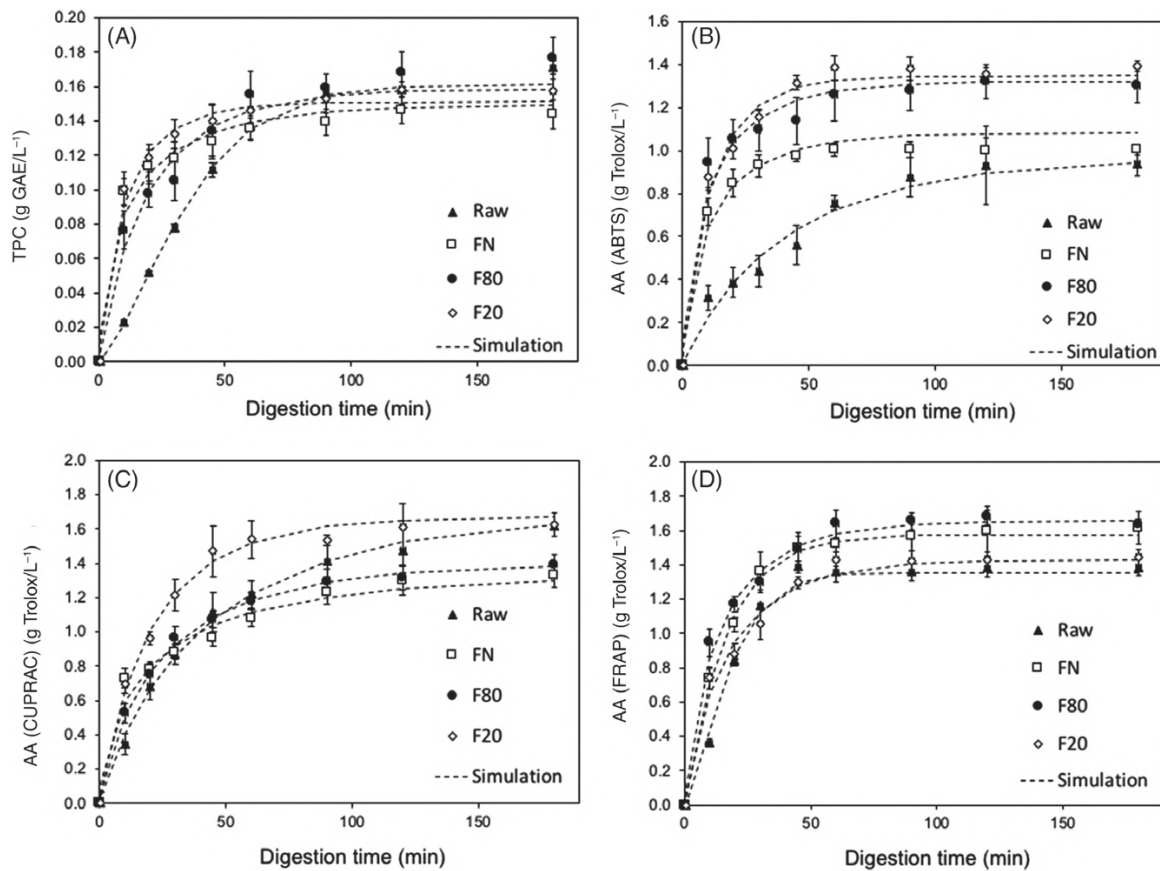


Figure 3. Uptake of (A) total polyphenol content (TPC) and (B–D) antioxidant activity (AA) in the gastric juice from raw and frozen beetroot samples during *in vitro* gastric digestion. ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); FRAP, ferric reducing antioxidant power; CUPRAC, cupric reducing antioxidant capacity.

could be due to the degradation of molecules with no original AA, present in the food matrix, to smaller molecules with AA. Wootton-Beard and Ryan⁴⁰ pointed out that the pH of a substance is known to affect racemization of molecules, possibly creating two chiral enantiomers with different biological reactivity. Fazzari *et al.*⁴¹ indicated that the moderate increase in the total phenolics and a slight increase in anthocyanins in frozen sweet cherries following pepsin digestion were possible because pepsin released phenolic compounds from the cherry fruit matrix. Furthermore, Rodríguez-Roque *et al.*⁴² indicated that the low pH and the enzyme action of gastric digestion could hydrolyze phenolic compounds bound to proteins and carbohydrates from orange, kiwi and pineapple juice, increasing the concentration of phenolic compounds after digestion. There is also the suggestion that, depending on the structural changes that occur during digestion, the resulting metabolites may react differently across different assays. The release of certain antioxidant components from food constituents with no original AA, such as amino acids, sugars and uronic acids, may increase the values of certain total antioxidant capacity assays, leading to overestimated results if the AA of a specific compound is compared before and after digestion.⁴³ Also, it has been previously reported that polyphenols and other food constituents, such as glucids, amino acids and proteins in

aqueous solutions, may produce a positive result in ORAC and Trolox equivalent antioxidant capacity assays.⁴⁴

Mass transfer kinetics

A Weibull model was used to mathematically describe the bioaccessibility kinetics for both the release of TPC and AA from the beetroot matrix and their uptake by the gastric juice during *in vitro* digestion. By using the experimental results obtained at different digestion times, the α and β parameters of the Weibull model were identified for each measured quantity in each sample, and the corresponding CIs and the SE were estimated. Also, the MRE (Eqn. (3)) was calculated by comparing experimental and predicted values. Tables 2 (measurements carried out on the food matrix) and 3 (measurements carried out on the gastric juice) show these results. The simulated curves by using the Weibull model are also presented together with the experimental data for all samples in Figs 2 and 3 by dashed lines.

The MREs obtained (Tables 2 and 3) were similar or lower than 5% in most of the cases. From these results (Tables 2 and 3), and the comparison with the experimental results shown in Figs. 2 and 3, it can be concluded that the proposed model successfully simulated the bioaccessibility kinetics of the different measured quantities in raw and frozen beetroots during *in vitro* gastric digestion. Dalmau *et al.*²⁹ also simulated satisfactorily the mass transfer kinetics of

Table 3. Uptake of total polyphenol content and antioxidant activity (ABTS, CUPRAC and FRAP) in the gastric juice during *in vitro* digestion. The equilibrium values C_{eq}^a were measured experimentally as the value after 24 h *in vitro* gastric digestion. The identified parameters of the Weibull model and the corresponding confidence interval (CI) and standard error (SE) associated with each parameter were determined using Matlab and the mean relative error (MRE) calculated by comparing experimental and predicted values

	C_{eq}^a	$\alpha \times 10^3$ (s)	CI (s)	SE	β	CI	SE	MRE
<i>Total polyphenol content</i>								
RAW	0.16 ± 0.02a	2.363	[2.213, 2.494]	0.061	1.424	[1.246, 1.602]	0.077	2.6
FN	0.15 ± 0.02a	0.784	[0.512, 1.057]	0.118	0.639	[0.416, 0.863]	0.097	4.5
F80	0.16 ± 0.01a	1.233	[0.904, 1.561]	0.143	0.867	[0.516, 1.218]	0.152	7.0
F20	0.15 ± 0.02a	0.652	[0.484, 0.821]	0.073	0.819	[0.550, 1.088]	0.117	3.7
<i>Antioxidant activity</i>								
<i>ABTS</i>								
RAW	0.96 ± 0.02b	2.510	[2.082, 2.937]	0.185	0.913	[0.677, 1.150]	0.103	8.6
FN	1.08 ± 0.09b	0.689	[0.436, 0.942]	0.110	0.714	[0.427, 1.002]	0.125	5.1
F80	1.32 ± 0.08a	0.644	[0.396, 0.892]	0.108	0.692	[0.417, 0.967]	0.119	4.3
F20	1.35 ± 0.11a	0.696	[0.527, 0.865]	0.073	0.865	[0.573, 1.157]	0.127	4.2
<i>CUPRAC</i>								
RAW	1.69 ± 0.17a	2.702	[2.519, 2.885]	0.079	0.861	[0.776, 0.946]	0.037	3.7
FN	1.34 ± 0.08b	1.424	[1.047, 1.801]	0.163	0.618	[0.436, 0.801]	0.079	5.4
F80	1.40 ± 0.04b	1.622	[1.496, 1.748]	0.055	0.789	[0.703, 0.875]	0.037	1.6
F20	1.67 ± 0.10a	1.320	[1.162, 1.477]	0.068	0.863	[0.707, 1.019]	0.068	3.2
<i>FRAP</i>								
RAW	1.39 ± 0.07b	1.189	[1.033, 1.486]	0.098	1.393	[0.982, 1.471]	0.063	4.7
FN	1.58 ± 0.04a	0.993	[0.910, 1.076]	0.036	1.033	[0.879, 1.187]	0.067	2.3
F80	1.66 ± 0.10a	0.895	[0.733, 1.057]	0.070	0.804	[0.607, 1.000]	0.085	3.3
F20	1.43 ± 0.16ab	1.086	[0.882, 1.290]	0.089	0.867	[0.621, 1.113]	0.107	4.9

^a Units: g GAE/L for total polyphenol content; mg Trolox/mL for antioxidant activity.
For each analytical method different lowercase letters indicate significant differences between different samples.
RAW, fresh beetroot; FN, frozen at -196°C by immersion in liquid nitrogen; F80, frozen at -80°C ; F20, frozen at -20°C ; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid); FRAP, ferric reducing antioxidant power; CUPRAC, cupric reducing antioxidant capacity.

the different compounds (moisture content, soluble solids content and acidity) by using the Weibull model for raw and processed apples during *in vitro* gastric digestion.

It can be seen in Table 2 that the highest C_{eq} figure was observed in the RAW sample in TPC and AA. Dalmau *et al.*²⁹ observed similar results in AA, measured using the ABTS, CUPRAC and FRAP methods, in raw and frozen by liquid nitrogen apple samples after 180 min of *in vitro* digestion.

It can be seen in Table 2 that the α parameter for TPC release increased 21%, 115% and 122% in FN, F80 and F20 samples respectively compared with the value for the RAW sample. This indicates a decrease in the rate of change of TPC for the F80 and F20 samples, and a slight decrease in FN samples. The β parameter was closer to 1 for TPC loss kinetics in the F80 and F20 samples, and lower for the RAW and FN samples. Two groups of TPC loss kinetics were observed with no significant differences in the identified values for α and β , one for the RAW and FN samples, and the other one for the F80 and F20 samples. In each group, there were only differences in the C_{eq} values for the different treatments.

Although the Weibull model also allowed the satisfactory simulation of the AA change determined according to the three analytical methods, extracting clear conclusions seems to be difficult. However, the α parameter clearly decreased in frozen samples, specially in the FN and F20 samples (~66%), compared with the RAW sample, when the ABTS and CUPRAC methods were used to evaluate the AA, which means a faster rate of change in these samples.

The identified β parameter for AA mass transfer kinetics was <1 in all cases, indicating convexity in the change curves and thus a

decreasing rate of change over time. However, the β parameter was higher when samples were frozen according to the ABTS method, but only increased in the F20 sample according to the CUPRAC method. In the rest of the cases, the differences with those figures for the RAW sample were smaller. These different values in the β parameter may indicate that, although graphical trends are similar, the fundamental mechanisms of mass transport of antioxidant compounds out of beetroot samples may have been modified during freezing.

With regard to the identified figures for the Weibull model parameters for kinetics of TPC increases in the gastric juice, α for the RAW samples was significantly higher than those for extraction from the frozen samples (FN, F80 and F20 samples), which means that freezing promoted faster TPC transfer from samples to the gastric juice. On the other hand, the β parameter was >1 for the extraction rate of TPC on gastric juice from the RAW sample but <1 for the rest of the samples. This could be explained by the fact that the original cellular structure of the RAW sample prevents TPC extraction; thus, the extent of the effects of the gastric juice components in modifying the structure to facilitate the release increased with time. In frozen samples, the TPC extraction rate was high from the beginning of the gastric digestion probably because the original structure of the food matrix was already altered.

Results of AA in gastric juice during *in vitro* digestion followed similar trends to those observed for TPC. It can be seen in Fig. 3(B–D) that antioxidant release from the frozen samples (FN, F80 and F20) was faster and higher than from the RAW samples. These trends are also shown by lower α figures and higher

equilibrium values (Table 3). These results further confirm the aforementioned finding that freezing of beetroots promoted the extraction of polyphenols and antioxidant compounds from the beetroot matrix during *in vitro* gastric digestion.

CONCLUSIONS

Freezing modified the microstructure and initial composition of frozen beetroots compared with RAW beetroots. Microstructural analyses indicated significant cellular damage as a result of freezing and of *in vitro* gastric digestion. These structural modifications resulted in behavioral changes in beetroots during *in vitro* gastric digestion. In general, frozen beetroots showed higher moisture and acidity content increases than RAW beetroots did during *in vitro* gastric digestion. Although freezing promoted decreases in total polyphenol content and AA in beetroots before *in vitro* gastric digestion, frozen beetroots showed higher release and better bioaccessibility of bioactive compounds (TPC and AA). However, the TPC and AA increases in gastric juice were higher than the corresponding decreases in beetroot during *in vitro* digestion. Moreover, it was observed that, after freezing by immersion in liquid nitrogen, samples had a greater loss of phenolic compounds and a higher gain of these compounds in gastric juice. From the treatments tested in this study, freezing with liquid nitrogen resulted in the greatest increase in bioavailability of the antioxidant and phenolic compounds of beetroots. Furthermore, it was found that the Weibull model was able to describe the mass transfer process occurring during *in vitro* digestion, both of the antioxidant compounds leaving the beetroot matrix and of the uptake of these compounds into the gastric juice. Weibull model parameters were utilized to compare the rates of release/uptake of antioxidant and phenolic compounds from beetroots, and it was observed that freezing increased the bioaccessibility of antioxidant and phenolic compounds during *in vitro* gastric digestion.

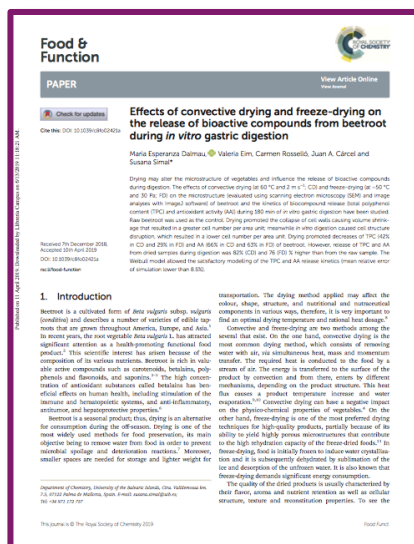
ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge the financial support of the National Institute of Research and Agro-Food Technology (INIA) and co-financed with ERDF funds (RTA2015-00060-C04-03), and the and the Balearic Government for the research fellowship (FPI/1814/2015) and research project AAEE04S/2017 of the "Conselleria D'Innovació, Recerca i Turisme", co-financed by the European Social Fund (FSE and ERDF, respectively).

REFERENCES

- Dias MG, Camões MFGFC and Oliveira L, Carotenoids in traditional Portuguese fruits and vegetables. *Food Chem* **113**:808–815 (2009).
- Jastrebova J, Witthöft C, Grahn A, Svensson U and Jägerstad M, HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chem* **80**:579–588 (2003).
- Váli L, Stefanovits-Bányai E, Szentmihályi K, Fébel H, Sárdi E, Lugasi A et al., Liver-protecting effects of table beet (*Beta vulgaris* var. *rubra*) during ischemia-reperfusion. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* **23**:172–178 (2007).
- Kapadia GJ, Tokuda H, Konoshima T and Nishino H, Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer Lett* **100**:211–214 (1996).
- Ninfali P and Bacchiocca M, Polyphenols and antioxidant capacity of vegetables under fresh and frozen conditions. *J Agric Food Chem* **51**:2222–2226 (2003).
- Bouayed J, Hoffmann L and Bohn T, Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem* **128**:14–21 (2011).
- Hedrn E, Mulokozi G and Svanberg U, *In vitro* accessibility of carotenes from green leafy vegetables cooked with sunflower oil or red palm oil. *Int J Food Sci Nutr* **53**:445–453 (2002).
- Parada J and Aguilera JM, Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci* **72**:21–32 (2007).
- Chassagne-Berces S, Poirier C, Devaux MF, Fonseca F, Lahaye M, Pigorini G et al., Changes in texture, cellular structure and cell wall composition in apple tissue as a result of freezing. *Food Res Int* **42**:788–797 (2009).
- Moraga G, Martínez-Navarrete N and Chiralt A, Compositional changes of strawberry due to dehydration, cold storage and freezing–thawing processes. *J Food Process Preserv* **30**:458–474 (2006).
- Paciulli M, Ganino T, Pellegrini N, Rinaldi M, Zaupa M, Fabbri A et al., Impact of the industrial freezing process on selected vegetables – part I. Structure, texture and antioxidant capacity. *Food Res Int* **74**:329–337 (2015).
- Marani CM, Agnelli ME and Mascheroni RH, Osmo-frozen fruits: mass transfer and quality evaluation. *J Food Eng* **79**:1122–1130 (2007).
- Kamiloglu S and Capanoglu E, Investigating the *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in fresh and sun-dried figs (*Ficus carica* L.). *Int J Food Sci Technol* **48**:2621–2629 (2013).
- Bourne M, *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement*, 2nd edn. Academic Press, New York, NY (2002).
- Neri L, Hernando I, Pérez-Munuera I, Sacchetti G, Mastrocola D and Pitta P, Mechanical properties and microstructure of frozen carrots during storage as affected by blanching in water and sugar solutions. *Food Chem* **144**:65–73 (2014).
- Delgado AE and Rubiolo AC, Microstructural changes in strawberry after freezing and thawing processes. *LWT – Food Sci Technol* **38**:135–142 (2005).
- Marín MA, Cano P and Fuster C, Freezing preservation of four Spanish mango cultivars (*Mangifera indica* L.): chemical and biochemical aspects. *Z Lebensm-Unters Forsch* **194**:566–569 (1992).
- Eim VS, Urrea D, Rosselló C, García-Pérez JV, Femenia A and Simal S, Optimization of the drying process of carrot (*Daucus carota* v. Nantes) on the basis of quality criteria. *Drying Technol* **31**:951–962 (2013).
- Bornhorst GM, Roman MJ, Dreschler KC and Singh RP, Physical property changes in raw and roasted almonds during gastric digestion *in vivo* and *in vitro*. *Food Biophys* **9**:39–48 (2014).
- AOAC, AOAC official method 934.06: moisture in dried fruits, in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th edn, 3rd rev edn. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, VA (1997).
- AOAC, AOAC official method 942.15: acidity (titratable) of fruit products, in *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th edn, 4rd rev edn. AOAC International, Arlington, VA (1998).
- González-Centeno MR, Jourdes M, Femenia A, Simal S, Rosselló C and Teissedre P-L, Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *J Agric Food Chem* **60**:11850–11858 (2012).
- Sturzoiu A, Stroescu M, Guzun AS and Dobre T, Empirical models applied for kinetics extraction of β -carotene from *Rosa canina*. *Rev Chim* **62**:344–348 (2011).
- Odrizola-Serrano I, Soliva-Fortuny R, Gimeno-Añó V and Martín-Belloso O, Modeling changes in health-related compounds of tomato juice treated by high-intensity pulsed electric fields. *J Food Eng* **89**:210–216 (2008).
- González-Centeno MR, Comas-Serra F, Femenia A, Rosselló C and Simal S, Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): experimental kinetics and modeling. *Ultrasound Sonochem* **22**:506–514 (2015).
- Baş D and Boyacı IH, Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *J Food Eng* **78**:836–845 (2007).
- Nayak CA, Suguna K, Narasimhamurthy K and Rastogi NK, Effect of gamma irradiation on histological and textural properties of carrot, potato and beetroot. *J Food Eng* **79**:765–770 (2007).
- Carnachan SM, Bootten TJ, Mishra S, Monro JA and Sims IM, Effects of simulated digestion *in vitro* on cell wall polysaccharides from kiwifruit (*Actinidia* spp.). *Food Chem* **133**:132–139 (2012).
- Dalmau ME, Bornhorst GM, Eim V, Rosselló C and Simal S, Effects of freezing, freeze drying and convective drying on *in vitro* gastric digestion of apples. *Food Chem* **215**:7–16 (2017).

- 30 Otero L, Martino M, Zaritzky N, Solas M and Sanz PD, Preservation of microstructure in peach and mango during high-pressure-shift freezing. *J Food Sci* **65**:466–470 (2000).
- 31 Mazur P, Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol Cell Physiol* **247**:C125–C142 (1984).
- 32 United States Department of Agriculture (USDA), *National Nutrient Database for Standard Reference Release 28* [Online]. (2016). Available: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>
- 33 Van Buggenhout S, Messagie I, Maes V, Duvetter T, Van Loey A and Hendrickx M, Minimizing texture loss of frozen strawberries: effect of infusion with pectinmethylesterase and calcium combined with different freezing conditions and effect of subsequent storage/thawing conditions. *Eur Food Res Technol* **223**:395–404 (2006).
- 34 Chandra D, Choi AJ, Kim YP and Kim JG, Physicochemical, microbial and sensory quality of fresh-cut red beetroots in relation to sanitization method and storage duration. *Ital J Food Sci* **27**:208–220 (2015).
- 35 Mennah-Govela YA and Bornhorst GM, Acid and moisture uptake in steamed and boiled sweet potatoes and associated structural changes during *in vitro* gastric digestion. *Food Res Int* **88**(Part B):247–255 (2016).
- 36 Kujala TS, Loponen JM, Klika KD and Pihlaja K, Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. *J Agric Food Chem* **48**:5338–5342 (2000).
- 37 Loncaric A, Dugalic K, Mihaljevic I, Jakobek L and Pilizota V, Effects of sugar addition on total polyphenol content and antioxidant activity of frozen and freeze-dried apple puree. *J Agric Food Chem* **62**:1674–1682 (2014).
- 38 Kamiloglu S, Pasli AA, Ozcelik B, Van Camp J and Capanoglu E, Influence of different processing and storage conditions on *in vitro* bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. *Food Chem* **186**:74–82 (2015).
- 39 Chen G-L, Chen S-G, Zhao Y-Y, Luo C-X, Li J and Gao Y-Q, Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after *in vitro* digestion. *Ind Crops Prod* **57**:150–157 (2014).
- 40 Wootton-Beard PC and Ryan L, A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. *J Funct Foods* **3**:329–334 (2011).
- 41 Fazzari M, Fukumoto L, Mazza G, Livrea MA, Tesoriere L and Di Marco L, *In vitro* bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *J Agric Food Chem* **56**:3561–3568 (2008).
- 42 Rodríguez-Roque MJ, Rojas-Graü MA, Elez-Martínez P and Martín-Belloso O, Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro* gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *J Agric Food Chem* **61**:1859–1867 (2013).
- 43 Cilla A, González-Sarriás A, Tomás-Barberán FA, Espín JC and Barberá R, Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chem* **114**:813–820 (2009).
- 44 Pérez-Jiménez J and Saura-Calixto F, Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Res Int* **39**:791–800 (2006).



CAPÍTULO IV

Effects of convective drying and freeze-drying on release of bioactive compounds from beetroot during in vitro digestion

Maria Esperanza Dalmau, Valeria Eim, Carmen Rosselló, Juan A. Cárcel, Susana Simal

Food & Functions

Volumen: 10

Páginas: 3209-3223


Índice de impacto (2017): 3.289

Food science & Technology, Q1 (20/133)



Cite this: DOI: 10.1039/c8fo02421a

Effects of convective drying and freeze-drying on the release of bioactive compounds from beetroot during *in vitro* gastric digestion

Maria Esperanza Dalmau,  Valeria Eim, Carmen Rosselló, Juan A. Cárcel and Susana Simal*

Drying may alter the microstructure of vegetables and influence the release of bioactive compounds during digestion. The effects of convective drying (at 60 °C and 2 m s⁻¹; CD) and freeze-drying (at -50 °C and 30 Pa; FD) on the microstructure (evaluated using scanning electron microscopy (SEM) and image analyses with ImageJ software) of beetroot and the kinetics of biocompound release (total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA)) during 180 min of *in vitro* gastric digestion have been studied. Raw beetroot was used as the control. Drying promoted the collapse of cell walls causing volume shrinkage that resulted in a greater cell number per area unit; meanwhile *in vitro* digestion caused cell structure disruption, which resulted in a lower cell number per area unit. Drying promoted decreases of TPC (42% in CD and 29% in FD) and AA (66% in CD and 63% in FD) of beetroot. However, release of TPC and AA from dried samples during digestion was 82% (CD) and 76 (FD) % higher than from the raw sample. The Weibull model allowed the satisfactory modelling of the TPC and AA release kinetics (mean relative error of simulation lower than 8.5%).

Received 7th December 2018,
Accepted 10th April 2019

DOI: 10.1039/c8fo02421a

rsc.li/food-function

1. Introduction

Beetroot is a cultivated form of *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* (*conditiva*) and describes a number of varieties of edible taproots that are grown throughout America, Europe, and Asia.¹ In recent years, the root vegetable *Beta vulgaris* L. has attracted significant attention as a health-promoting functional food product.² This scientific interest has arisen because of the composition of its various nutrients. Beetroot is rich in valuable active compounds such as carotenoids, betalains, polyphenols and flavonoids, and saponins.³⁻⁵ The high concentration of antioxidant substances called betalains has beneficial effects on human health, including stimulation of the immune and hematopoietic systems, and anti-inflammatory, antitumor, and hepatoprotective properties.⁶

Beetroot is a seasonal product; thus, drying is an alternative for consumption during the off-season. Drying is one of the most widely used methods for food preservation, its main objective being to remove water from food in order to prevent microbial spoilage and deterioration reactions.⁷ Moreover, smaller spaces are needed for storage and lighter weight for

transportation. The drying method applied may affect the colour, shape, structure, and nutritional and nutraceutical components in various ways, therefore, it is very important to find an optimal drying temperature and rational heat dosage.⁸

Convective and freeze-drying are two methods among the several that exist. On the one hand, convective drying is the most common drying method, which consists of removing water with air, *via* simultaneous heat, mass and momentum transfer. The required heat is conducted to the food by a stream of air. The energy is transferred to the surface of the product by convection and from there, enters by different mechanisms, depending on the product structure. This heat flux causes a product temperature increase and water evaporation.^{9,10} Convective drying can have a negative impact on the physico-chemical properties of vegetables.⁴ On the other hand, freeze-drying is one of the most preferred drying techniques for high-quality products, partially because of its ability to yield highly porous microstructures that contribute to the high rehydration capacity of the freeze-dried foods.¹¹ In freeze-drying, food is initially frozen to induce water crystallization and it is subsequently dehydrated by sublimation of the ice and desorption of the unfrozen water. It is also known that freeze-drying demands significant energy consumption.

The quality of the dried products is usually characterized by their flavor, aroma and nutrient retention as well as cellular structure, texture and reconstitution properties. To see the

Department of Chemistry, University of the Balearic Islands, Ctra. Valldemossa km. 7.5, 07122 Palma de Mallorca, Spain. E-mail: susana.simal@uib.es; Tel: +34 971 172 757

effect of processing on the cellular structure of food generally requires microscopic examination. The light microscope is the principal tool, but confocal microscopy, electron microscopy, atomic force microscopy, magnetic resonance or computer tomographic imaging, among other methods, can be also used for different purposes. The image that these techniques generate is usually digitized and analyzed using computer technology. Measurement of the image characteristics to obtain microstructural information can be efficiently carried out using different analysis techniques. Among the different types of image texture analysis, that of statistical texture is one of the most widely used in the food industry for its high accuracy and shorter computation time. This methodology analyzes the gray spatial distribution and derives a set of statistics from the distributions of local characteristics.¹²

On the other hand, *in vitro* digestion could be used to assess the effect of processing on the release of nutrients. *In vitro* digestion assays simulate the physiological conditions of digestion *in vivo* and are useful tools for studying and understanding changes, interactions, as well as the bioaccessibility of nutrients.¹³ Paustenbach (2000) defined the bioaccessibility of a substance as the fraction that is soluble in the gastrointestinal environment and is available for absorption.¹⁴ The application of *in vitro* simulated digestion has demonstrated that food components or food matrices have different effects on bioactive compounds, and, in some cases, only a minor fraction of the total quantity of these compounds in foods is potentially bioaccessible.^{15,16} In the present study, the release of compounds during the gastric phase will be evaluated.

Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of two different drying methods (convective and freeze-drying) on the cellular matrix of beetroot (*Beta vulgaris*) and on the release of its bioactive compounds during *in vitro* gastric digestion.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Beetroot (*Beta vulgaris* var. *conditiva*) was purchased from a local supermarket (initial moisture content of 6.67 ± 0.04 g g⁻¹ dm and total soluble solids of $10.8 \pm 0.4^\circ$ Brix). It was stored at 4 °C for a maximum of one week before processing. Cubes were cut (0.01 m edge) from the central parts of the beetroot tissue, not including the peel, and immediately processed.

2.2. Convective-drying- and freeze-drying processes

Convective drying (CD) was carried out in a laboratory-scale hot air dryer previously described,¹⁷ operating at 60 °C with an air velocity of 2 m s⁻¹. Samples were dried to a final moisture content of 0.17 ± 0.03 g water per g dm.

Freeze-drying (FD) of the cubes was carried out in a freeze-drier (Telstar LyoQuest, Barcelona) operating at -50 °C and a vacuum pressure of 30 Pa, to a final moisture content of 0.07 ± 0.01 g water per g dm.

Before *in vitro* digestion, CD and FD samples were rehydrated by immersion in distilled water (25 : 100 (g beetroot per ml water)) at 37 °C until they reached a final moisture content similar to that of the raw samples (6.67 ± 0.04 g g⁻¹ dm) (approx. 90 and 80 min, respectively).

2.3. *In vitro* digestion procedure

The beetroot samples were digested following the *in vitro* gastric digestion method reported by Bornhorst and Singh.¹⁸ Briefly, simulated saliva was prepared with 1.000 g l⁻¹ mucin, 2.000 g l⁻¹ α -amylase (1500 U ml⁻¹), 0.117 g l⁻¹ NaCl, 0.149 g l⁻¹ KCl and 2.100 g l⁻¹ NaHCO₃ solution at pH 7.0. Simulated gastric juice was prepared with 1.000 g l⁻¹ pepsin (25 000 U ml⁻¹), 1.500 g l⁻¹ mucin, and 8.780 g l⁻¹ NaCl, mixed in de-ionized water at a pH of 1.8–2.0. All solutions were prepared daily.

The beetroot cubes (ca. 200 g) were mixed with 80 ml of simulated saliva for 30 s, followed by immersion in 800 ml of simulated gastric juice previously heated to 37 °C.¹⁸ The mixture was incubated in a shaking water bath (Unitronic 320 OR, Selecta, Spain) at 37 °C and 100 rpm for up to 3 h. Sequential samples were taken initially (no digestion), 30 s after mixing with saliva, and after 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min and then 24 h of gastric digestion, in triplicate, assessing moisture, acidity, total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA); and also, initially (no digestion) and after 180 min of gastric digestion, for microstructural analyses. Sequential samples of gastric juice were taken in triplicate, after 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180 min and 24 h of gastric digestion for total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (AA) analyses.

All digestion experiments were performed at least in triplicate, and results were expressed on an initial dry matter basis (dm₀) to better compare the different samples.

2.4. Microstructural analyses

2.4.1. Scanning electron microscopy (SEM). Cell walls of raw and dried beetroot before (CD and FD samples) and after (raw180, CD180 and FD180) 180 min of *in vitro* gastric digestion were observed using scanning electron microscopy (SEM). For SEM observation, samples were soaked in liquid nitrogen in order to be cut with a sharp razor blade and freeze-dried. Gold coating was performed using a Bio-Rad E-5400 sputter coater (Polaron, UK) (10⁻⁴ mbar, 20 mA, 80 s). Samples were then observed in an S-3400N Hitachi SEM (Germany), accelerated at 15 kV and under a vacuum pressure of 40 Pa.

2.4.2. Image analysis. Scanning electron microscope photographs were analyzed using an automatic image processing method with ImageJ 2.0.0 software (Creative Commons license). The images were calibrated by the application “Set scale” of the same software. Subsequently, the images were transformed to a binary image. Finally, the images were analyzed with the application “Analyze particles” of the software.¹⁹ To establish a representative structural analysis, fifteen scanning electron microscope photographs of each sample were analyzed.

The percentile profile of cell areas and the cell number per unit of tissue surface of each sample were calculated using the “prtile” function of Matlab 2017b software (The Mathworks Inc., USA).

2.5. Chemical analyses

The moisture content of all beetroot samples was determined according to the AOAC official method no. 934.06 (AOAC, 1997) and expressed in g water per g initial dry matter (dm_o). The acidity of the samples was determined according to the AOAC official method no. 942.15 (AOAC, 1998) and expressed in malic acid equivalent/100 g of initial dry matter (dm_o).

To determine the total polyphenol content (TPC) and the antioxidant activity (AA), methanol extracts from the samples were prepared according to the methodology described by Eim *et al.*²⁰ with minor modifications. Samples were accurately weighed (~2.0 g), and 20 ml of methanol (MeOH) extraction solvent was added. The mixtures were homogenized using an Ultra-Turrax homogenizer (T25 Digital, IKA, Germany) at 13 000 rpm for 1 min at 4 °C, and the solutions were refrigerated overnight. They were centrifuged at 2700g for 10 min followed by filtration, and then refrigerated at 4 °C until analysis. Gastric juice samples were analyzed directly without further extraction.

Total polyphenol content (TPC) was determined by means of the Folin-Ciocalteu assay according to Eim *et al.*²⁰ Antioxidant activity (AA) was determined using the ABTS (radical cation scavenging activity), FRAP (ferric reducing antioxidant power assay), and CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) assays according to Gonzalez-Centeno *et al.*²¹ In all assays, absorbance measurements were carried out at 25 °C in an UV/Vis/NIR spectrophotometer (MultiSkan Spectrum, Thermo Scientific, Finland) and correlated with standard curves. TPC was expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per g initial dry matter (dm_o) and AA was expressed as mg Trolox per g initial dry matter (dm_o) for beetroot.²² The dimensionless release (ψ) of TPC and AA from beetroot cubes has been defined as indicated in eqn (1), and the dimensionless release measured in gastric juice (θ), is indicated in eqn (2); both are presented as a percentage.

$$\psi = \frac{C_0 - C_i}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\theta = \frac{C_i}{C_{\max}} \times 100 \quad (2)$$

where C_0 is the initial concentration, C_i is the concentration at time i and C_{\max} is the maximum concentration released from the beetroot to the gastric juice (experimentally measured after 24 h of gastric digestion). All the analyses were performed in triplicate on samples from each digestion.

2.6. Mathematical model

Changes in total polyphenol content and antioxidant activity (ABTS, FRAP, and CUPRAC assays) at different times during

in vitro digestion in both the beetroot matrix and the gastric juice were analyzed and fitted to the Weibull model (eqn (3)).

$$\frac{C_i - C_{\text{eq.}}}{C_o - C_{\text{eq.}}} = e^{\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right]} \quad (3)$$

The equilibrium release, represented by $C_{\text{eq.}}$, was assumed to be equal to the experimental value after 24 h of *in vitro* digestion.²¹ The fitting parameters of the model were α and β . The α parameter can be related to the inverse of the change rate. As such, a lower α indicates a faster rate of change. The shape parameter β represents a behavior index of the material during the process.²³ When β is equal to 1, the model corresponds to a first-order kinetic with a constant input rate.²⁰ However, when β has a value above or below 1, this parameter denotes the concavity (increasing change rate over time) or convexity (decreasing change rate over time) of the curve, respectively.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R 3.1.0 software. Results are presented as mean values with their corresponding standard deviations. Parametric ANOVA and Tukey's tests were used to evaluate the existence of significant differences among samples (moisture content, TPC and results from image analysis). These statistical analyses were replaced by the Kruskal-Wallis and pairwise-Wilcox (BH corrected) tests, when data were not normally distributed and/or showed heterogeneity of variances (AA measured using the ABTS, CUPRAC and FRAP methods). Differences at $p < 0.05$ were considered significant.

The identification of the Weibull model parameters α and β was carried out using the ‘fitnlm’ function of the optimization toolbox of MATLAB R2017 (The MathWorks Inc., USA), which estimates the coefficients of a nonlinear regression function and the residuals using the least number of squares. To determine the 95% confidence intervals (CI) and the standard error of the estimated parameters (SE), the ‘coefCI’ function and the covariance matrix were used, respectively. To statistically evaluate the accuracy of the proposed mathematical model and its capacity to simulate the experimental results and predict variations within the system, the mean relative error (MRE) (eqn (4)) was estimated by the comparison of experimental and simulated data. The lower the MRE, the better the fit provided by the model.²⁴

$$\text{MRE} = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{|V_{\text{exp}} - V_{\text{calc}}|}{V_{\text{exp}}} \right)}{n} \times 100 \quad (4)$$

where V_{exp} and V_{calc} are the experimental and calculated values and n is the number of experimental data.

3. Results and discussion

3.1. Changes in food matrix structure during *in vitro* gastric digestion

3.1.1. Microstructural images (SEM). The images of raw and processed samples before and after 180 min of *in vitro*

gastric digestion are shown in Fig. 1. Fig. 1a₁ shows the microstructure of the raw sample prior to *in vitro* gastric digestion. Raw samples are composed of almost isodiametrical and polyhedral cells with few intercellular spaces, as was previously observed by Nayak *et al.*²⁵ After 180 min of digestion (Fig. 1a₂) a significant cell lysis was observed, resulting in a smaller

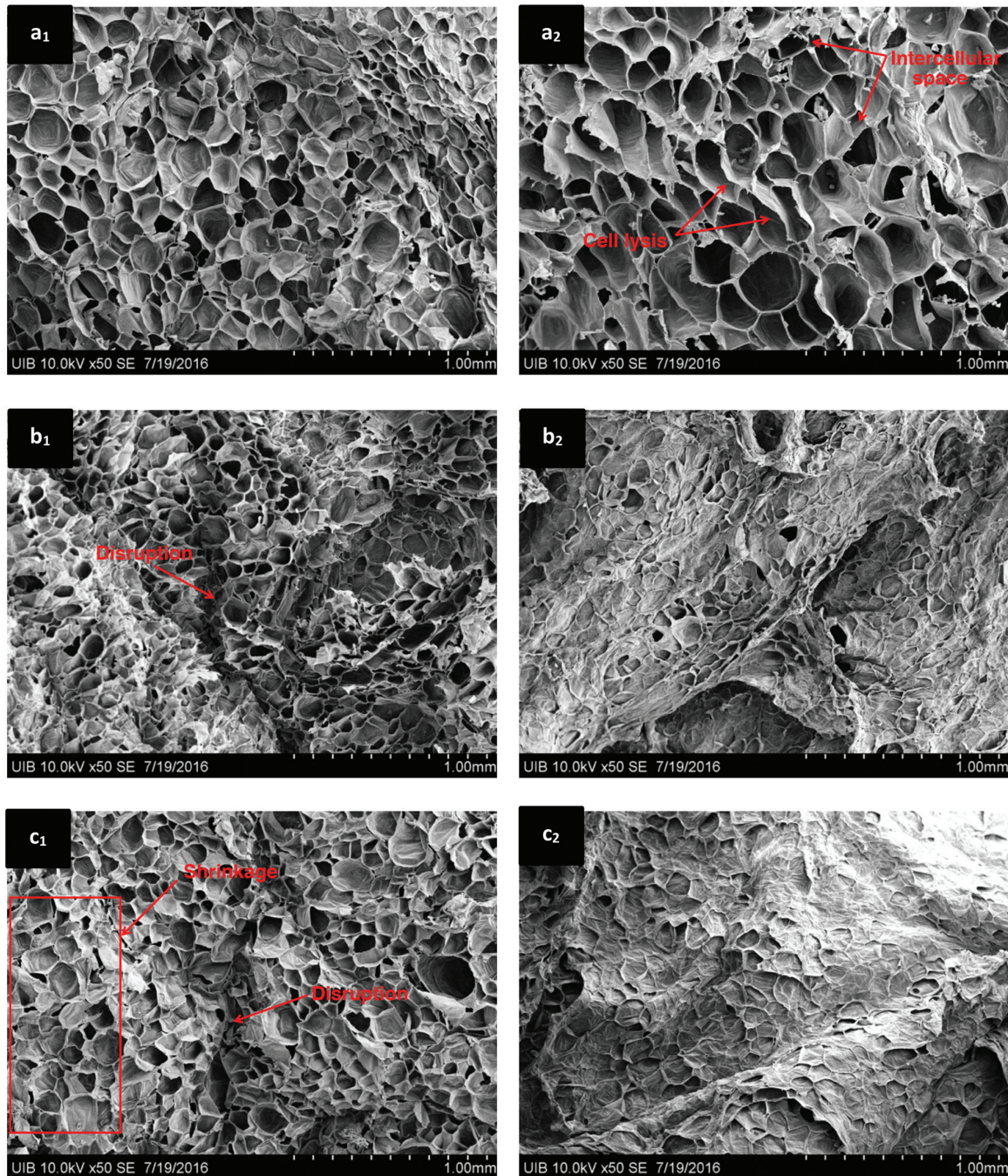


Fig. 1 SEM images of beetroot samples: a-Raw, b-CD and c-FD. 1-Before *in vitro* gastric digestion. 2-After 180 min of *in vitro* gastric digestion.

number of cells per unit area along with increases in the intercellular space between remaining cells. Carnachan *et al.*²⁶ studied the microstructure of kiwi pulp after *in vitro* gastric digestion for 30 min, followed by *in vitro* intestinal digestion by stirring for 120 min. Similar to the current study, these authors observed an increase in the intercellular space after *in vitro* digestion.

Cell walls act as the main natural structural physical barriers governing biocompound release. Pectin composition and the presence of other polysaccharides in the cell wall influence the bioaccessibility of biocompounds by interacting differently with the target compounds.^{27,28} Moreover, a strong correlation between the physical state of the chromoplast substructures and the efficiency of biocompound release during digestion were found in previous studies.^{29–31} It has been observed^{32–34} that drying may alter the microstructure of fruits and vegetables by breaking or/weakening the cell walls, and therefore, modifying the release of biocompounds during digestion.

Cells exhibited shrinkage after convective drying, as can be observed in Fig. 1b₁, resulting in a disruption of the cellular structure. Several authors^{13,17} have agreed that during convective drying, one of the most important phenomena is cell shrinkage, which leads to a major modification of the product structure and allows the release of water. Smith *et al.*³⁵ observed that convective drying caused cell rupture and dislocation resulting in a denser food porosity. This can be seen in Fig. 1b₂, after *in vitro* gastric digestion, where the open pores on the surface of the structure have been eliminated and many of the interior cell walls ruptured. Fig. 1c₁ shows the microstructure of the FD sample before *in vitro* digestion. A certain disruption and shrinkage of the cell structure was observed, although to a lesser extent than in convective drying. This effect was also observed in freeze-dried Red Fuji apple by Huang *et al.*³⁶ and in freeze-dried Idared apple by Lewicki and Pawlak.³⁷ Also, Smith *et al.*³⁵ observed that freeze-dried carrots shrank very little but had visible surface cracks and loss of color. An increase in the destruction of cell-wall material can be observed as a result of the *in vitro* gastric digestion process (Fig. 1c₂). Changes resulted in an almost complete elimination of the initial porous structure seen in undigested raw beetroot. A similar result was observed by Dalmau *et al.*³⁸ in freeze-dried Granny Smith apples after 180 min of *in vitro* gastric digestion, when changes during digestion eliminated most of the pore structure observed in undigested raw apple.

Overall, microstructural changes were observed as a result of both drying and *in vitro* gastric digestion compared to the undigested raw beetroot microstructure. Compared to raw beetroot, CD beetroot exhibited the greatest changes, both before and after digestion.

3.1.2. Image analysis. Using the previously described method, the scanning electron microscope photographs were analyzed and the cell number per unit of tissue surface and the cell area percentile profiles of untreated and dried beetroot samples before (raw, CD and FD samples) and after *in vitro* gastric digestion (raw180, CD180 and FD180) were estimated. Results are presented in Table 1 (cell number per unit of

Table 1 Cell number per unit of tissue surface of raw and dried (CD and FD) beetroot before and after 180 min of *in vitro* gastric digestion. Significant differences ($p < 0.05$) before and after *in vitro* digestion are indicated by different lowercase letters, among raw and processed samples by different capital letters and among digested samples by numbers (Tukey's test, $p < 0.05$)

Sample	Cell number/mm ²
Raw	289 ± 4 aC
Raw180	171 ± 5 b2
CD	425 ± 1 aB
CD180	250 ± 18 b1
FD	370 ± 40 aA
FD180	190 ± 20 b2

tissue surface) and Fig. 2 (cell area percentile profiles). In Fig. 2, the percentiles represent the percentages of cells whose areas are equal or smaller to the value obtained; thus, they can help to evaluate changes in the microstructure, reflecting and quantifying the cell size change observed in SEM images.

As can be seen in Table 1, dried samples (CD and FD) before digestion exhibited significantly higher cell numbers per area unit ($p < 0.05$) than raw beetroot, the CD sample being the one with the highest cell number ($p < 0.05$) (47 ± 2% higher than in raw sample). As can be seen in Fig. 2, different percentile profiles were obtained for each sample. The percentage of larger areas was higher ($p < 0.05$) in the raw sample than in CD and FD samples; for example, 80% of areas were smaller than 0.067 mm² in the raw sample but smaller than 0.016 mm² and 0.025 mm² in CD and FD samples, respectively. Therefore, 80% of cells were approximately 76% and 63% smaller ($p < 0.05$) when samples were dried by convective drying or freeze-drying, respectively. Although both CD and FD samples exhibited important cell shrinkage, this effect was greater when beetroot was dried convectively. From these results it can be concluded that drying caused a collapse of the cell walls causing volume shrinkage, which resulted in bigger cell numbers per area unit and smaller sizes according to the percentile profiles.^{39,40}

All samples after gastric *in vitro* digestion presented significantly ($p < 0.05$) lower cell numbers per area unit (41–49% less) than samples before *in vitro* digestion (Table 1). Ramirez *et al.*⁴¹ also observed reductions of cell numbers per area unit between 34 and 66% after different treatments, which can affect the original microstructure, such as immersion in boiling water, vacuum impregnation, freezing/thawing and compression. Also, significantly ($p < 0.05$) larger cell sizes were measured after *in vitro* gastric digestion; for example, 80% of areas were smaller ($p < 0.05$) than 0.067 mm² and 0.310 mm² in raw samples before and after 180 min of gastric *in vitro* digestion, respectively; smaller ($p < 0.05$) than 0.016 mm² and 0.116 mm² in CD samples before and after 180 min of gastric *in vitro* digestion, respectively; and smaller ($p < 0.05$) than 0.025 mm² and 0.130 mm² in FD samples before and after 180 min of gastric *in vitro* digestion, respectively. However, the integrity of the dried samples was higher exhibiting smaller sizes.

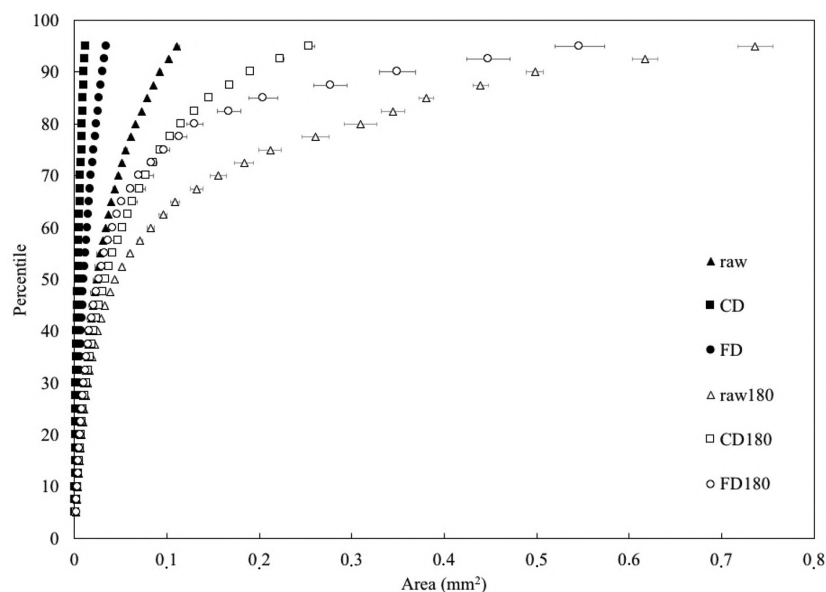


Fig. 2 Cell area percentile profiles of raw, convectively dried and freeze-dried samples before and after 180 min of gastric *in vitro* digestion.

Therefore, *in vitro* gastric digestion caused considerable disruption of the cell wall structure, which resulted in a notable decrease of the cell number per area unit and, at the same time, relevant increase of the measured areas, which could be attributed not only to hydration and swelling of cells but also to the holes left by several broken cells or cell walls.

3.1.3. Moisture content and acidity. Table 2 shows the changes in moisture and acidity contents of raw and dried beetroot during *in vitro* gastric digestion. The initial moisture content (6.67 ± 0.04 g water per g dm) of raw beetroot was similar to the previously reported value for beetroot by Ng *et al.*⁴² No significant differences ($p < 0.05$) were

observed among the initial moisture content of raw and dried samples.

The moisture content increased significantly ($p < 0.05$) in all samples after 180 min *in vitro* gastric digestion by about 73, 153, and 79% dm in raw, CD and FD samples, respectively. However, the most important change in moisture took place during the first 45 min of digestion (48, 119 and 41% dm significant increase ($p < 0.05$) for raw, CD and FD samples, respectively). The CD sample exhibited the highest capacity ($p < 0.05$) to absorb water (153% dm) after 180 min of digestion. The equilibrium moisture content, measured after 24 h of *in vitro* gastric digestion, corresponded to significant moisture increases ($p < 0.05$) of 107%

Table 2 Changes in moisture and acidity content of raw and dried beetroots during *in vitro* digestion. 9 replicates for each sample were done. The results are expressed as value \pm standard deviation

Digestion time (min)	Moisture content (g water per g dm _o)			Acidity (g malic acid per g dm _o)		
	Raw	CD	FD	Raw	CD	FD
0	6.67 \pm 0.04Aa	6.64 \pm 0.02Aa	6.60 \pm 0.03Aa	0.79 \pm 0.02Aa	0.85 \pm 0.01Ba	0.77 \pm 0.03Aa
0.5	7.16 \pm 0.01b	8.65 \pm 0.02b	6.78 \pm 0.02b	0.76 \pm 0.01b	1.02 \pm 0.05b	0.89 \pm 0.02b
10	8.28 \pm 0.02c	10.39 \pm 0.03c	6.93 \pm 0.03c	0.82 \pm 0.02c	0.98 \pm 0.20b	1.00 \pm 0.03c
20	8.78 \pm 0.03d	11.56 \pm 0.03d	7.09 \pm 0.04d	0.94 \pm 0.03d	1.21 \pm 0.01c	1.06 \pm 0.03c
30	8.90 \pm 0.03e	12.03 \pm 0.02e	7.93 \pm 0.02e	1.03 \pm 0.01e	1.39 \pm 0.13d	1.13 \pm 0.03d
45	9.32 \pm 0.04f	13.70 \pm 0.02f	8.42 \pm 0.02f	1.22 \pm 0.01f	1.67 \pm 0.15e	1.22 \pm 0.06e
60	9.89 \pm 0.04g	14.60 \pm 0.01g	9.31 \pm 0.02g	1.43 \pm 0.01g	1.81 \pm 0.14f	1.26 \pm 0.02f
90	10.62 \pm 0.01h	16.14 \pm 0.02h	10.23 \pm 0.01h	1.40 \pm 0.01g	1.83 \pm 0.01f	1.29 \pm 0.04g
120	10.80 \pm 0.02i	16.46 \pm 0.02i	10.52 \pm 0.03i	1.45 \pm 0.02g	1.83 \pm 0.03f	1.34 \pm 0.06h
180	11.61 \pm 0.03j	16.82 \pm 0.01j	11.87 \pm 0.01j	1.44 \pm 0.02g	1.82 \pm 0.05f	1.42 \pm 0.04i
Ceq.	13.82 \pm 0.02k	18.12 \pm 0.02k	14.96 \pm 0.02k	1.43 \pm 0.11g	1.80 \pm 0.06f	1.58 \pm 0.09j

Different lowercase letters for the same parameter and same sample indicates significant differences in time. Different capital letters for the same parameter indicate significant differences between initial samples.

dm_o, 153% dm_o and 109% dm for raw, CD and FD samples, respectively. This could be due to the damage of the cellular structure caused by drying, which facilitated water transport within the food matrix.⁴³ Previous *in vitro* and *in vivo* studies have also reported increases in food moisture content during gastric digestion. For example, Bornhorst *et al.*⁴⁴ observed moisture content increases of 75 and 23% dm in white and brown rice after 180 min of *in vivo* digestion in pigs, and Bornhorst *et al.*⁴⁵ observed moisture content increases of 79 and 95% dm in raw and roasted almonds after 120 min of *in vitro* digestion. Dalmau *et al.*³⁸ reported that the moisture content increased after 180 min of *in vitro* digestion in raw, freeze-dried and convective-dried Granny Smith apples by 6 ± 1, 8 ± 1 and 11 ± 2% dm_o, respectively, the convectively dried sample being the one with the highest water content.

The initial acidity of raw beetroot (0.79 ± 0.02 g per 100 g dm_o) was within the range (0.7–0.9 g malic acid per 100 g dm_o) previously reported by Chandra *et al.*⁴⁶ No significant differences were observed between the acidity of the raw and dried samples. The acidity of all samples significantly increased during *in vitro* digestion, the highest increases taking place during the first 60 min (82 ± 1, 113 ± 1 and 57 ± 1% dm_o, in raw, CD and FD samples, respectively). After 180 min of digestion, the acidity gains were of 83 ± 1, 114 ± 1 and 78 ± 1% dm_o, in raw, CD and FD samples, respectively.

CD samples exhibited acidity gains significantly ($p < 0.05$) higher during digestion than the raw sample. The microstructural changes during drying and digestion promoted the damage of cell walls resulting in different rates of acid uptake. The equilibrium acid content in CD and FD samples (1.80 and 1.58 g per 100 g dm_o, respectively) was significantly higher ($p < 0.05$) than that of the raw sample (1.43 g per 100 g dm_o). The results obtained in this study are the opposite to those obtained by Dalmau *et al.*,³⁸ where they observed that raw, CD and FD acidity of Granny Smith apples significantly decreased during *in vitro* digestion. The decreases in acidity during digestion observed in this previous study were hypothesized to be caused by the higher acidity of raw apples before digestion (5.1 ± 0.2 g per 100 g malic acid), which might be higher than the acidity of the gastric juice. However, the acidity of raw beetroot before

digestion was 0.79 ± 0.02 g per 100 g dm_o malic acid, which was significantly lower than the acidity of the gastric juice, resulting in acid uptake by beetroot when immersed in gastric juice. Similarly, Mennah-Govela *et al.*⁴⁷ observed acidity increases in sweet potatoes, during *in vitro* gastric digestion.

3.2. Release of bioactive compounds

Table 3 shows the TPC and AA (measured using the ABTS, CUPRAC and FRAP methods) of raw and dried samples. The same initial TPC in raw samples (4.2 ± 0.2 mg GAE per g dm) was previously reported for *Beta vulgaris* beetroot by Kujala *et al.*⁴⁸

Beetroot samples after processing (drying followed by rehydration, CD and FD samples) exhibited significant changes ($p < 0.05$) in their bioactive compound content. When comparing the results for the dried samples (CD and FD) to those for the raw one, it can be seen that processing promoted higher ($p < 0.05$) TPC losses in the FD sample (74%) than in the CD sample (41%). Guiné *et al.*⁴⁹ reported no significant TPC changes due to convective drying and freeze-drying of cucumber, concluding that these processes do not affect the TPC. In other cases, the TPC of the samples decreased due to drying, exhibiting similar behavior to that observed in this study. Vega-Gálvez *et al.*⁵⁰ and Ferreira *et al.*⁵¹ reported TPC decreases of 74% and 68% after convective drying (60 °C and 2 m s⁻¹) of red pepper and sun-drying of pear, respectively, compared to raw samples. Asami *et al.*⁵² reported TPC decreases of 33% in strawberries after freeze-drying.

Three methods were used to evaluate the antioxidant activity (AA) of both the beetroot samples and the gastric juice: ABTS, CUPRAC and FRAP analyses. Due to the fact that each method is based on a different chemical system and/or reaction, different results of AA could be expected, depending on the method used for analysis. The selection of different methods allows a better understanding of the wide variety and range of action of antioxidant compounds present in beetroot.⁵³ The average values for the AA of raw beetroot were 12.4 ± 0.9, 25.5 ± 0.9 and 12.1 ± 0.8 mg Trolox per g dm_o as measured by the ABTS, CUPRAC and FRAP methods, respect-

Table 3 TPC and AA (measured using the ABTS, CUPRAC and FRAP methods) of raw and dried samples. 9 replicates for each sample were done. The results are expressed as value ± standard deviation

		TPC (mg GAE per g dm _o)	Antioxidant activity (mg Trolox per g dm _o)		
			ABTS	CUPRAC	FRAP
C _o Beetroot cubes	Raw	4.2 ± 0.2 a	12.4 ± 0.9 a	25.4 ± 0.9 a	12.1 ± 0.8 a
	CD	2.5 ± 0.2 b	6.3 ± 0.3 b	9.7 ± 0.8 b	5.8 ± 0.4 b
	FD	1.1 ± 0.2 c	8.3 ± 0.7 c	9.1 ± 0.8 b	5.8 ± 0.4 b
C _{eq.} Beetroot cubes	Raw	2.20 ± 0.02 a	4.46 ± 0.18 a	4.24 ± 0.18 a	5.3 ± 0.2 a
	CD	0.77 ± 0.03 b	0.12 ± 0.02 c	0.09 ± 0.02 b	0.84 ± 0.07 b
	FD	0.51 ± 0.02 b	0.41 ± 0.03 b	0.09 ± 0.02 b	0.37 ± 0.02 c
C _{eq.} Gastric juice	Raw	5.21 ± 0.02 a	31.16 ± 0.09 a	54.63 ± 0.06 a	43.78 ± 0.06 a
	CD	5.28 ± 0.02 b	17.83 ± 0.08 b	35.77 ± 0.06 b	30.21 ± 0.08 b
	FD	2.25 ± 0.02 c	13.46 ± 0.11 c	16.07 ± 0.06 c	25.63 ± 0.06 c

Different lowercase letters for the same parameter indicates significant differences between samples.

ively. The same initial values of ABTS and FRAP in raw samples was previously reported for *Beta vulgaris* beetroot by Sawicki *et al.*⁵⁴ and Raikos *et al.*,⁵⁵ respectively.

After processing, the AA decreased more ($p < 0.05$) in the CD sample (49%) than in the FD sample (33%) according to the ABTS method, and by approximately the same according to CUPRAC (62–64% decrease) and FRAP (52% decrease) methods. Loncaric *et al.*⁵⁶ measured an AA decrease (ABTS method) in freeze-dried Fuji apples of ca. 64%.

In order to evaluate the release of bioactive compounds during the *in vitro* gastric digestion of beetroot samples (raw, CD and FD samples), the total polyphenol content (TPC) and the antioxidant activity (AA) were measured at different times during the experiments in both the food and gastric juice.

Fig. 3 shows the release of TPC (Fig. 3a) and AA (measured using the ABTS method in Fig. 3b, CUPRAC method in Fig. 3c, and FRAP method in Fig. 3d) of raw and dried beetroot matrix during 180 min of *in vitro* gastric digestion. The equilibrium values (after 24 h of *in vitro* gastric digestion) used to estimate the release according to eqn (1) are shown in Table 3. It can be seen that both TPC and AA initial (before digestion) were lower in processed samples than raw samples.

The TPC releases from the raw, CD and FD samples (after 180 min of *in vitro* gastric digestion) were 1.9 ± 0.1 , 1.6 ± 0.1 and 0.6 ± 0.1 mg gallic acid per g dm₀, respectively. Also, the AA measured using the CUPRAC method was decreased ($p < 0.05$) by 14.6 ± 0.6 mg Trolox per g dm in the raw sample, but by 6.8 ± 0.4 and 6.0 ± 0.4 mg Trolox per g dm₀ in CD and FD samples, respectively. However, when the AA was measured using the ABTS and FRAP methods, decreases ($p < 0.05$) were less different. These results indicate that although the bioactive compound contents were significantly ($p < 0.05$) lower in processed samples, the total quantity released from these samples was comparable, probably due to the damaged microstructure which eased the mass transfer between the solid and the gastric juice.

Dried beetroot exhibited higher release ($p < 0.05$) of TPC (64.1 ± 0.6 and $53.6 \pm 0.9\%$ in CD and FD samples, respectively) than in the raw sample ($46.6 \pm 0.2\%$) after 180 min of *in vitro* gastric digestion. Similar decreases in TPC (of 44.6%) were reported by Bouayed *et al.*⁵⁷ in Jonaprinz apples during 60 min of *in vitro* gastric digestion. Kamiloglu *et al.*⁵⁸ observed a 65% decrease in the TPC of black carrots after 120 min of *in vitro* gastric digestion. Chen *et al.*⁵⁹ observed that TPC significantly decreased in 25 of the 33 studied fruits (8–73%) and

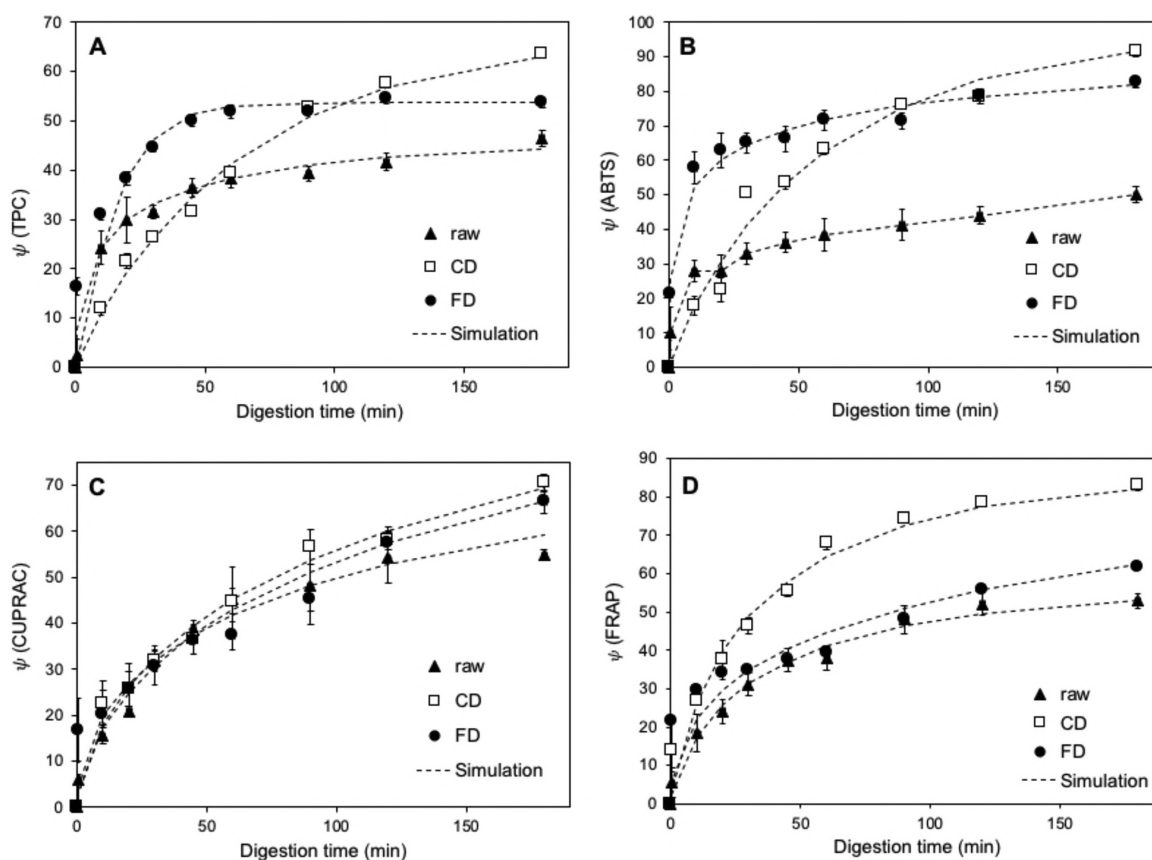


Fig. 3 Release of TPC (A) and AA (B: ABTS, C: CUPRAC and D: FRAP) from the raw and dried beetroot samples during *in vitro* digestion.

increased in the remaining eight, during the gastric stage of *in vitro* digestion. These results indicate that not only the initial TPC value, but also the structure of the food matrix, may be important in the release of nutrients from food matrices during digestion.

Although raw beetroot exhibited the highest AA figure before digestion, this sample had the smallest release ($p < 0.05$) ($53 \pm 1\%$ as the average of the three ABTS, CUPRAC and FRAP methods) after 180 min of *in vitro* gastric digestion. The AA releases in dried samples after 180 min of digestion were higher ($p < 0.05$) (82% in the CD sample and 76% in FD samples, as averages). Thus, both drying treatments altered the cellular structure resulting in samples with higher release.

The total polyphenol content (TPC) and antioxidant activity (ABTS, CUPRAC, and FRAP methods) were also measured in the gastric juice at different times, including 24 h to estimate the equilibrium figure, during the *in vitro* gastric digestion of raw and dried samples.

To facilitate the interpretation of the results, the TPC and AA figures measured in the gastric juice, including the equilibrium figures measured after 24 h of *in vitro* gastric digestion, were expressed in $\text{mg g}^{-1} \text{dm}$ taking into account the mass of sample/volume of gastric juice ratio used in the experiments and the moisture content of beetroot samples at each time during the *in vitro* gastric digestion experiments. The equilibrium TPC and AA figures, expressed using this methodology, are also shown in Table 3.

It can be seen in Table 3 that the equilibrium TPC and AA were significantly higher than the expected values, taking into account the initial figures in the solid matrix. After 24 h of *in vitro* gastric digestion, the TPC in the gastric juice was 25%, 114% and 104% higher ($p < 0.05$) than the initial concentration in raw, CD and FD beetroot, respectively. Similarly, the AA in the gastric juice increased more than was expected, the equilibrium AA being 61–182% (ABTS method), 76–270% (CUPRAC method) and 262–420% (FRAP method) higher than the initial AA in beetroot samples. It is worth mentioning that the highest increases were observed in CD samples. These TPC and AA increases in gastric juice after *in vitro* digestion could be due to the degradation of molecules with no original antioxidant activity, present in the food matrix, to smaller molecules with antioxidant activity; it may also be that there are molecules with initial antioxidant activity but then they degrade and lose that activity. However, the balance between the two effects is positive and there is a release greater than 100%. Wootton-Beard *et al.*⁶⁰ pointed out that the pH of a substance is known to affect the racemisation of molecules, possibly creating two chiral enantiomers with different biological reactivities. In the literature, there is also the suggestion that depending on the structural changes which occur, the resulting metabolites may react differently across different assays. Fazzari *et al.*⁶¹ indicated that moderate increase in the total phenolics and a slight increase in anthocyanins for frozen sweet cherries following pepsin digestion were possible because pepsin digestion released phenolic compounds from the cherry fruit matrix. Additionally, further increases in anti-

oxidant activity could be caused by the acid pH of digestion (~ 2), which favors the formation of some anthocyanin derivatives. Similar increases in anthocyanins following pepsin digestion have been observed for pomegranate juice.⁶² Furthermore, Rodríguez-Roque *et al.*⁶³ indicated that the low pH and the enzyme action of gastric digestion could hydrolyze phenolic compounds bound to proteins and carbohydrates from orange, kiwi and pineapple juice, increasing the concentration of phenolic compounds after digestion. There is also the suggestion that depending on the structural changes which occur during digestion, the resulting metabolites may react differently across different assays. The release of certain antioxidant components from food constituents with no original antioxidant activity such as amino acids, sugars and uronic acids may increase the values of certain total antioxidant capacity assays, leading to overestimated results if the antioxidant activity of a specific compound is compared before and after digestion.⁶⁴ Also, it has been previously reported that polyphenols and other food constituents such as glucids, amino acids and proteins in aqueous solutions may produce a positive result in ORAC and TEAC antioxidant capacity assays.⁶⁵

In order to estimate the release of the biocompounds in the gastric juice according to eqn (2), the maximum concentration was considered to be equal to the initial concentration in the beetroot sample before digestion (Table 3). Results of release in gastric juice are shown in Fig. 4 (for TPC in Fig. 4a; for AA according to ABTS, CUPRAC and FRAP methods in Fig. 4b, c and d, respectively).

It can be seen in Fig. 4 that the TPC and AA release measured in the gastric juice after 180 min of *in vitro* gastric digestion was higher than 100% in all cases. TPC release increased ($p < 0.05$) by 132%, 188% and 140% in raw, CD and FD samples, respectively, in comparison with the maximum estimated quantity (initial TPC in beetroot samples before digestion). These increments were even higher ($p < 0.05$) in the AA release (154–279% according to the ABTS method; 168–331% according to the CUPRAC method; and 369–537% according to the FRAP method). When comparing among beetroot samples, it can be observed that the CD sample exhibited the highest release in all cases.

These trends may indicate that drying treatments altered the cellular structure such that the dried beetroot released a higher amount of polyphenols and antioxidant compounds and provoked the degradation of molecules with no original antioxidant activity to smaller molecules with antioxidant activity during *in vitro* gastric digestion.

3.3. Mass transfer kinetics

The Weibull model was used to mathematically describe the release kinetics for both the release of the total polyphenol contents and the antioxidant activity from the beetroot matrix and their uptake by gastric juice during *in vitro* digestion. Using the experimental results obtained at different digestion times, the α and β parameters of the Weibull model were identified for each measured quantity in each sample, and the

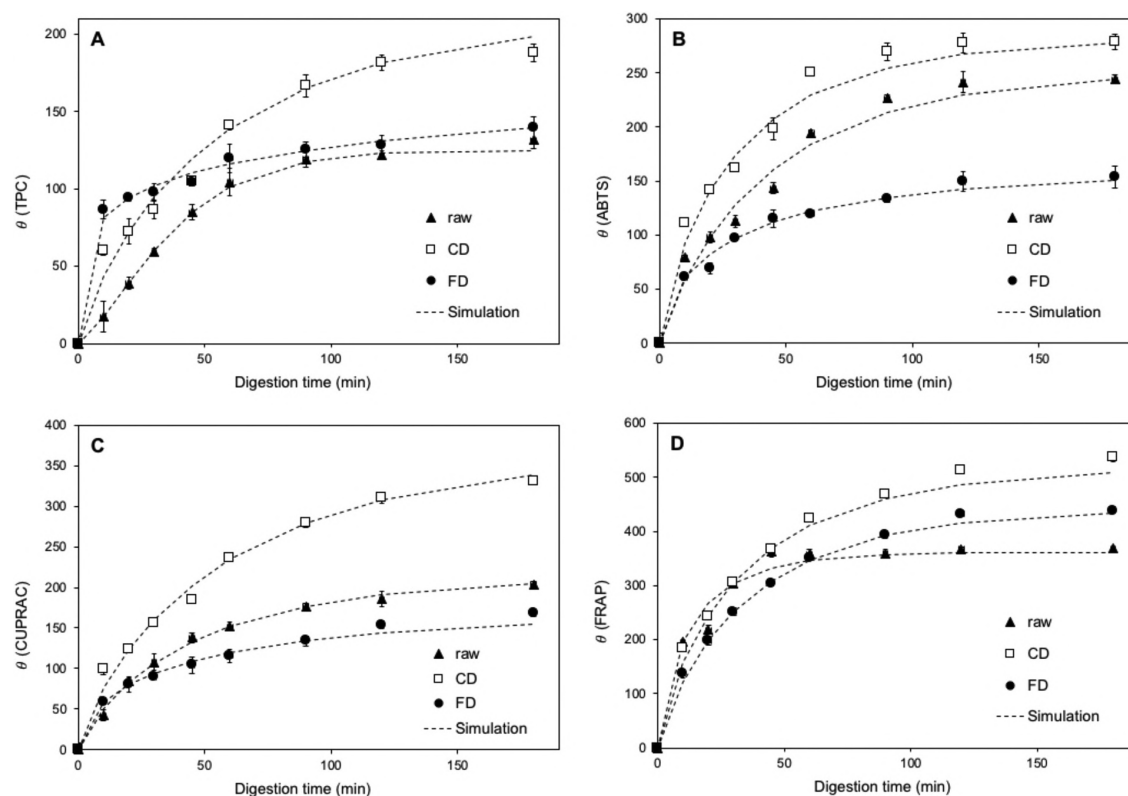


Fig. 4 Release of TPC (A) and AA (B: ABTS, C: CUPRAC, and D: FRAP) in the gastric juice from the raw and dried beetroot samples during *in vitro* digestion.

Table 4 Release of the TPC (A) and AA (B: ABTS, C: CUPRAC and D: FRAP) from raw and dried beetroot samples during *in vitro* digestion. Equilibrium values, identified parameters of the Weibull model and confidence interval (CI) and standard error (SE) associated with each parameter

		$\psi_{eq.}$	$\alpha \times 10^{-3}$ (s)	CI (s)	SE	β	CI	SE	MRE
TPC	Raw	47.3 ± 0.2	1.219	[1.114, 1.673]	0.121	0.465	[0.430, 0.643]	0.046	1.9
	CD	68.1 ± 0.3	3.889	[3.538, 4.239]	0.152	0.942	[0.817, 1.068]	0.054	2.2
	FD	53.6 ± 0.8	0.990	[0.974, 2.724]	0.379	1.137	[0.218, 0.508]	0.063	5.9
AA (ABTS)	Raw	63.9 ± 1.8	4.340	[3.618, 5.063]	0.313	0.351	[0.301, 0.402]	0.022	1.5
	CD	98.0 ± 0.1	3.538	[2.835, 4.242]	0.305	0.904	[0.642, 1.165]	0.113	7.0
	FD	95.1 ± 0.3	1.208	[0.890, 1.527]	0.138	0.313	[0.254, 0.372]	0.025	5.6
AA (CUPRAC)	Raw	83.4 ± 1.8	7.221	[5.620, 8.894]	0.710	0.524	[0.438, 0.684]	0.053	3.9
	CD	99.09 ± 0.09	8.035	[6.816, 9.254]	0.528	0.619	[0.527, 0.712]	0.040	3.2
	FD	98.96 ± 0.02	9.092	[6.217, 16.54]	2.238	0.610	[0.336, 0.691]	0.077	5.7
AA (FRAP)	Raw	56 ± 2	2.406	[2.090, 2.722]	0.137	0.708	[0.587, 0.829]	0.053	2.0
	CD	85.6 ± 0.7	2.277	[1.867, 2.687]	0.178	0.740	[0.562, 0.918]	0.077	5.2
	FD	93.7 ± 0.2	8.902	[3.801, 27.57]	5.154	0.482	[0.179, 0.410]	0.050	6.0

corresponding confidence intervals and the standard error associated with the parameters were estimated. Also, the mean relative error (MRE, eqn (4)) was calculated by comparing experimental and predicted values. Tables 4 (measurements carried out on the food matrix) and 5 (measurements carried out on the gastric juice) show these results. The simulated curves using the Weibull model are also represented together with the experimental values for all samples in Fig. 3 and 4 by dashed lines. The release in beetroot cubes and in gastric juice (eqn (5) and (6), respectively) is calculated taking into account

the definitions described in eqn (3) and (4), together with the Weibull model (eqn (3)).

$$\psi_{calc} = \left(1 - \frac{C_{eq.}}{C_0}\right) \times e^{\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right]} \quad (5)$$

$$\theta_{calc} = 1 - \left(1 - \frac{C_{eq.}}{C_0}\right) \times e^{\left[-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^\beta\right]} \quad (6)$$

The obtained MREs (Tables 4 and 5) were similar to or lower than 8.5% in most of the cases. From these results

Table 5 Uptake of TPC (A) and AA (B: ABTS, C: CUPRAC, and D: FRAP) in the gastric juice during *in vitro* digestion. Equilibrium values, identified parameters of the Weibull model and corresponding confidence interval (CI) and standard error (SE) associated with each parameter

		$\Psi_{eq.}$	$\alpha \times 10^{-3}$ (s)	CI (s)	SE	β	CI	SE	MRE
TPC	Raw	125 ± 7	2.451	[2.213, 2.501]	0.061	1.355	[1.246, 1.602]	0.077	1.5
	CD	210 ± 10	3.387	[2.994, 3.984]	0.215	0.848	[0.622, 0.916]	0.064	6.5
	FD	204 ± 7	6.542	[2.832, 7.855]	1.089	0.285	[0.220, 0.510]	0.063	3.9
AA (ABTS)	Raw	252 ± 7	2.652	[2.082, 2.937]	0.185	0.888	[0.677, 1.150]	0.103	8.4
	CD	282 ± 3	1.890	[1.424, 2.002]	0.125	0.805	[0.625, 1.035]	0.089	5.9
	FD	161 ± 3	2.044	[1.687, 2.248]	0.122	0.609	[0.571, 0.826]	0.055	4.0
AA (CUPRAC)	Raw	214 ± 2	2.812	[2.519, 2.901]	0.079	0.850	[0.776, 0.946]	0.037	3.9
	CD	370 ± 9	3.583	[3.208, 3.937]	0.158	0.820	[0.659, 0.867]	0.045	5.0
	FD	176 ± 9	2.909	[2.266, 3.012]	0.162	0.570	[0.539, 0.770]	0.050	3.5
AA (FRAP)	Raw	360 ± 10	0.823	[0.624, 1.486]	0.098	0.777	[0.569, 1.471]	0.063	5.0
	CD	520 ± 4	2.097	[1.669, 2.112]	0.091	0.820	[0.698, 0.974]	0.060	3.7
	FD	443 ± 9	2.204	[1.844, 2.437]	0.060	0.871	[0.776, 0.958]	0.039	2.3

(Tables 4 and 5), and the comparison with the experimental results shown in Fig. 2 and 3, it can be concluded that the proposed model successfully simulated the release kinetics of the different measured quantities in raw and drying beetroots during *in vitro* gastric digestion. Dalmau *et al.*³⁸ also simulated satisfactorily the mass transfer kinetics of the different compounds using the Weibull model in raw and processed apples during *in vitro* gastric digestion.

It can be seen in Table 4 that the α parameter for TPC release increased 219% in CD samples and decreased 18.5% in FD samples compared to the value for the raw sample. This indicates a decrease in the rate of change of TPC of CD samples, and a slight increase in the FD sample. The β parameter for TPC loss kinetics was 0.465 in the raw sample but close to 1 in CD and FD samples. This indicates that, in dried samples, the kinetic was close to a first-order kinetic with a constant rate.²⁰

Regarding the AA change kinetics measured by the ABTS method, α decreased by 23 and 72% in CD and FD samples, compared to the raw sample. The α figure for the AA change kinetics measured using CUPRAC and FRAP was similar in both raw and CD samples (only 11% higher and 5% lower in the CD sample according to the CUPRAC and FRAP assays, respectively) but was much higher in the FD sample (26% and 270% higher in the FD sample according to CUPRAC and FRAP assays, respectively). The identified β parameter for AA change kinetics was lower than 1 in all cases, indicating convexity in the change curves and thus, a decreasing change rate over time. However, the β figures showed different trends depending on the method used to measure the AA. It can be seen that the β parameter for the CD sample according to all methods was higher than those for the other samples. This may indicate that convective drying eased the release of phenolic compounds during *in vitro* digestion. These different tendencies may indicate that although graphical trends are similar, their fundamental mechanisms of mass transport may have been modified by the processing method.

With regard to the identified figures for the Weibull model parameters for the kinetics of TPC increases in the gastric juice, α values for the raw and CD samples were similar and significantly lower than those for extraction from the FD

samples (increased 167% in comparison with that for the raw sample), reflecting the slower process of TPC release from the FD sample to the gastric juice. As can be seen in Fig. 4, most of the TPC release from the FD sample took place during the first 10 min of the digestion, the release kinetic later on being slower. On the other hand, the β parameter was higher than 1 for the extraction rate of TPC for gastric juice from the raw sample but lower than 1 for the rest of the samples. This could be explained by the fact that the original cellular structure of the raw sample prevents the TPC release. Thus, the extent of the effects of the gastric juice components in modifying the structure to facilitate the release increased with time. In dried samples, the TPC extraction rate remained high from the beginning of the gastric digestion probably because the original structure of the food matrix was already altered.

Results of AA in gastric juice during *in vitro* digestion followed trends similar to those observed for the TPC. The gastric juice from FD sample digestion exhibited the lowest AA, together with those for the CD sample, both with higher α figures and lower equilibrium values (Table 5) than those obtained for the raw sample. On the other hand, the β parameter was lower than 1 for the extraction rate of AA for gastric juice for all samples with all assays. The β parameters for the raw and CD samples were similar and significantly higher than that for extraction from the FD samples with ABTS and CUPRAC assays (increased 32% in comparison with that for the raw sample). This could also be explained by the fact that the original cellular structure of the raw sample prevents AA release, and in the same way, the extent of the effects of the gastric juice components in modifying the structure to facilitate the release increased with time.

These results further confirm the above-mentioned finding that drying of beetroot affects the microstructure facilitating the extraction of polyphenols and antioxidant compounds from the beetroot matrix during *in vitro* gastric digestion.

4. Conclusions

Drying modified the microstructure and initial composition of dried beetroot compared to raw beetroot. Microstructural ana-

Paper

lyses indicated significant cellular damage and changes as a result of drying and *in vitro* gastric digestion. These structural modifications resulted in behavioral changes in beetroot during *in vitro* gastric digestion. In general, dried beetroot showed faster decreases in titratable acidity while moisture content increases were higher in processed samples, compared to raw beetroot, during *in vitro* gastric digestion. Although drying promoted decreases in total polyphenol content and antioxidant activity before *in vitro* gastric digestion, dried beetroot showed higher release and better release of bioactive compounds (TPC and AA). However, the TPC and AA increases in gastric juice were higher than the corresponding decreases in beetroot during *in vitro* digestion, possibly due to the degradation of molecules with no original antioxidant activity, present in the food matrix, to smaller molecules with antioxidant activity. Moreover, it was observed that the CD sample exhibited both a higher loss of phenolic compounds and a higher gain of these compounds in gastric juice, leading to the conclusion that this drying process favors the release of the phenolic compounds of beetroot more than in the FD samples. Furthermore, the Weibull model allowed the satisfactory description of the mass transfer process occurring during *in vitro* digestion, of both the antioxidant compounds leaving the beetroot matrix, and the uptake of these compounds by the gastric juice. Weibull model parameters were utilized to compare the rate of release/uptake of antioxidant and phenolic compounds from beetroot, and it was observed that drying increased the release of antioxidant and phenolic compounds during *in vitro* gastric digestion. Given the limited knowledge that is available on this subject at present, it would be interesting to investigate further to better understand how processing can modify the structural characteristics of the ingested foods to modulate the release of active compounds in food matrices.

Nomenclature

AA	Antioxidant activity (mg Trolox per g dm _o)
C_{\max}	Maximum concentration (g g ⁻¹ dm _o or g per 100 g dm _o)
C_o	Initial concentration (g g ⁻¹ dm _o or g per 100 g dm _o)
C_{calc}	Calculated concentration (g g ⁻¹ dm _o or g per 100 g dm _o)
C_{eq}	Equilibrium concentration (g g ⁻¹ dm _o or g per 100 g dm _o)
C_{exp}	Experimental concentration (g g ⁻¹ dm _o or g per 100 g dm _o)
CD	Convective drying
C_i	Concentration at time i (g g ⁻¹ dm _o or g per 100 g dm _o)
CI	Confidence intervals
dm	Dry matter (g)
dm _o	Initial dry matter (g)
FD	Freeze-drying
GAE	Gallic acid equivalent
MRE	Mean relative error (%)
SE	Standard error of the estimated parameters
SEM	Scanning electron microscopy
TPC	Total polyphenol content (mg GAE per g dm _o)

α	Inverse kinetic reaction constant of the Weibull model (s)
β	Shape parameter of the Weibull model

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the financial support of the National Institute of Research and Agro-Food Technology (INIA), co-financed with the ERDF funds (RTA2015-00060-C04-03), and the Balearic Government for the research fellowship (FPI/1814/2015).

Notes and references

- 1 J. Wruss, G. Waldenberger, S. Huemer, P. Uygun, P. Lanzerstorfer, U. Müller, *et al.* Compositional characteristics of commercial beetroot products and beetroot juice prepared from seven beetroot varieties grown in Upper Austria, *J. Food Compos. Anal.*, 2015, **42**, 46–55.
- 2 T. Clifford, G. Howatson, D. J. West and E. J. Stevenson, The potential benefits of red beetroot supplementation in health and disease, *Nutrients*, 2015, **7**(4), 2801–2822.
- 3 A. Figiel, Drying kinetics and quality of beetroots dehydrated by combination of convective and vacuum-microwave methods, *J. Food Eng.*, 2010, **98**(4), 461–470.
- 4 K. Kaur and A. K. Singh, Drying kinetics and quality characteristics of beetroot slices under hot air followed by microwave finish drying, *Afr. J. Agric. Res.*, 2014, **9**(12), 1036–1044.
- 5 S. J. Kowalski and J. M. Lechtańska, Drying of red beetroot after osmotic pretreatment: Kinetics and quality considerations, *Chem. Process Eng.*, 2015, **36**(3), 345–354.
- 6 S. Kamiloglu, C. Grootaert, E. Capanoglu, C. Ozkan, G. Smagghe, K. Raes, *et al.* Anti-inflammatory potential of black carrot (*Daucus carota* L.) polyphenols in a co-culture model of intestinal Caco-2 and endothelial EA.hy926 cells, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2017, **61**(2), 1600455.
- 7 K. Ruse, T. Rakcejeva, R. Galoburda and L. Dukalska, Anthocyanin content in Latvian cranberries dried in convective and microwave vacuum driers, in *Research for Rural Development*, 2011, pp. 100–106.
- 8 S. J. Kowalski and J. Szadzińska, Convective-intermittent drying of cherries preceded by ultrasonic assisted osmotic dehydration, *Chem. Eng. Process.*, 2014, **82**, 65–70.
- 9 C. V. Bezerra, L. H. Meller da Silva, D. F. Corrêa and A. M. C. Rodrigues, A modeling study for moisture diffusivities and moisture transfer coefficients in drying of passion fruit peel, *Int. J. Heat Mass Transfer*, 2015, **85**, 750–755.
- 10 M. A. García-Alvarado, F. M. Pacheco-Aguirre and I. I. Ruiz-López, Analytical solution of simultaneous heat and mass

- transfer equations during food drying, *J. Food Eng.*, 2014, **142**, 39–45.
- 11 S. P. Ishwarya and C. Anandharamakrishnan, Spray-Freeze-Drying approach for soluble coffee processing and its effect on quality characteristics, *J. Food Eng.*, 2015, **149**, 171–180.
 - 12 J. C. Russ, Image analysis of food microstructure, in *Computer Vision Technology in the Food and Beverage Industries*, 2012, pp. 233–252.
 - 13 Z. Zhang, X. Wang, Y. Li, Q. Wei, C. Liu, M. Nie, *et al.* Evaluation of the impact of food matrix change on the in vitro bioaccessibility of carotenoids in pumpkin (*Cucurbita moschata*) slices during two drying processes, *Food Funct.*, 2017, **8**(12), 4693–4702.
 - 14 D. J. Paustenbach, The practice of exposure assessment: a state-of-the-art review, *J. Toxicol. Environ. Health, Part B*, 2000, **3**(3), 179–291.
 - 15 F. J. Barba, L. R. B. Mariutti, N. Bragagnolo, A. Z. Mercadante, G. V. Barbosa-Cánovas and V. Orlien, Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing, *Trends Food Sci. Technol.*, 2017, **67**, 195–206.
 - 16 M. Zahir, V. Fogliano and E. Capuano, Food matrix and processing modulate in vitro protein digestibility in soybeans, *Food Funct.*, 2018, (9), 6326–6336.
 - 17 Ó. Rodríguez, J. V. Santacatalina, S. Simal, J. V. García-Pérez, A. Femenia and C. Rosselló, Influence of power ultrasound application on drying kinetics of apple and its antioxidant and microstructural properties, *J. Food Eng.*, 2014, **129**, 21–29.
 - 18 G. M. Bornhorst and R. P. Singh, Kinetics of in Vitro Bread Bolus Digestion with Varying Oral and Gastric Digestion Parameters, *Food Biophys.*, 2013, **8**(1), 50–59.
 - 19 M. Devaux, P. Robert, J. Melcion and F. Le Deschault de Monredon, Particle size analysis of bulk powders using mathematical morphology, *Powder Technol.*, 1997, **90**(2), 141–147.
 - 20 V. S. Eim, D. Urrea, C. Rosselló, J. V. García-Pérez, A. Femenia and S. Simal, Optimization of the Drying Process of Carrot (*Daucus carota* v. Nantes) on the Basis of Quality Criteria, *Drying Technol.*, 2013, **31**, 951–962.
 - 21 M. R. González-Centeno, F. Comas-Serra, A. Femenia, C. Rosselló and S. Simal, Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling, *Ultrason. Sonochem.*, 2015, **22**, 506–514.
 - 22 D. Moreira, B. Gullón, P. Gullón, A. Gomes and F. Tavaría, Bioactive packaging using antioxidant extracts for the prevention of microbial food-spoilage, *Food Funct.*, 2016, **7**(7), 3273–3282.
 - 23 A. Sturzoiu, M. Stroescu, A. S. Guzun and T. Dobre, Empirical models applied for kinetics extraction of β -carotene from *Rosa canina*, *Rev. Chim.*, 2011, **62**, 344–348.
 - 24 D. Baş and İ. H. Boyacı, Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *J. Food Eng.*, 2007, **78**, 836–845.
 - 25 C. A. Nayak, K. Suguna, K. Narasimhamurthy and N. K. Rastogi, Effect of gamma irradiation on histological and textural properties of carrot, potato and beetroot, *J. Food Eng.*, 2007, **79**(3), 765–770.
 - 26 S. M. Carnachan, T. J. Bootten, S. Mishra, J. a. Monro and I. M. Sims, Effects of simulated digestion in vitro on cell wall polysaccharides from kiwifruit (*Actinidia* spp.), *Food Chem.*, 2012, **133**(1), 132–139.
 - 27 H. Palafox-Carlos, J. F. Ayala-Zavala and G. A. González-Aguilar, The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants, *J. Food Sci.*, 2011, **76**(1), R6–15.
 - 28 S. Van Buggenhout, M. Almingier, L. Lemmens, I. Colle, G. Knockaert, K. Moelants, *et al.* In vitro approaches to estimate the effect of food processing on carotenoid bioavailability need thorough understanding of process induced microstructural changes, *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, **21**(12), 607–618.
 - 29 J. Jeffery, A. Holzenburg and S. King, Physical barriers to carotenoid bioaccessibility, Ultrastructure survey of chromoplast and cell wall morphology in nine carotenoid-containing fruits and vegetables, *J. Sci. Food Agric.*, 2012, **92**(13), 2594–2602.
 - 30 J. L. Jeffery, N. D. Turner and S. R. King, Carotenoid bioaccessibility from nine raw carotenoid-storing fruits and vegetables using an in vitro model, *J. Sci. Food Agric.*, 2012, **92**(13), 2603–2610.
 - 31 R. M. Schweiggert, D. Mezger, F. Schimpf, C. B. Steingass and R. Carle, Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato, *Food Chem.*, 2012, **135**(4), 2736–2742.
 - 32 K. An, D. Zhao, Z. Wang, J. Wu, Y. Xu and G. Xiao, Comparison of different drying methods on Chinese ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): Changes in volatiles, chemical profile, antioxidant properties, and microstructure, *Food Chem.*, 2016, **197**, 1292–1300.
 - 33 H. C. P. Karunasena, R. J. Brown, Y. T. Gu and W. Senadeera, Application of meshfree methods to numerically simulate microscale deformations of different plant food materials during drying, *J. Food Eng.*, 2015, **146**, 209–226.
 - 34 M. L. Rojas and P. E. D. Augusto, Microstructure elements affect the mass transfer in foods: The case of convective drying and rehydration of pumpkin, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2018, **93**, 102–108.
 - 35 B. G. Smith, B. J. James and C. a. L. Ho, Microstructural Characteristics of Dried Carrot Pieces and Real Time Observations during Their Exposure to Moisture, *Int. J. Food Eng.*, 2007, **3**(4), DOI: 10.2202/1556-3758.1242.
 - 36 L. L. Huang, M. Zhang, L. P. Wang, A. S. Mujumdar and D. F. Sun, Influence of combination drying methods on composition, texture, aroma and microstructure of apple slices, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2012, **47**(1), 183–188.
 - 37 P. P. Lewicki and G. Pawlak, Effect of Drying on Microstructure of Plant Tissue, *Drying Technol.*, 2003, **21**, 657.

- 38 M. E. Dalmau, G. M. Bornhorst, V. Eim, C. Rosselló and S. Simal, Effects of freezing, freeze drying and convective drying on in vitro gastric digestion of apples, *Food Chem.*, 2017, 215.
- 39 Ó. Rodríguez, P. Llabrés, S. Simal, A. Femenia and C. Rosselló, Intensification of Predrying Treatments by Means of Ultrasonic Assistance: Effects on Water Mobility, PPO Activity, Microstructure, and Drying Kinetics of Apple, *Food Bioprocess Technol.*, 2014, 1–13.
- 40 A. Vega-Gálvez, K. Ah-Hen, M. Chacana, J. Vergara, J. Martínez-Monzó, P. García-Segovia, *et al.* Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of apple (var. Granny Smith) slices, *Food Chem.*, 2012, 132(1), 51–59.
- 41 C. Ramírez, E. Troncoso, J. Muñoz and J. M. Aguilera, Microstructure analysis on pre-treated apple slices and its effect on water release during air drying, *J. Food Eng.*, 2011, 106(3), 253–261.
- 42 M. L. Ng and R. Sulaiman, Development of beetroot (*Beta vulgaris*) powder using foam mat drying, *LWT – Food Sci. Technol.*, 2018, 88, 80–86.
- 43 S. Van Buggenhout, M. Lille, I. Messagie, A. Van Loey, K. Autio and M. Hendrickx, Impact of pretreatment and freezing conditions on the microstructure of frozen carrots: Quantification and relation to texture loss, *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, 222(5–6), 543–553.
- 44 G. M. Bornhorst, L. Q. Chang, S. M. Rutherford, P. J. Moughan and R. P. Singh, Gastric emptying rate and chyme characteristics for cooked brown and white rice meals in vivo, *J. Sci. Food Agric.*, 2013, 93(12), 2900–2908.
- 45 G. M. Bornhorst, M. J. Roman, K. C. Dreschler and R. P. Singh, Physical Property Changes in Raw and Roasted Almonds during Gastric Digestion In vivo and In vitro, *Food Biophys.*, 2014, 9, 39–48.
- 46 D. Chandra, A. E. Choi, Y. P. Kim and J. I. G. Kim, Paper physicochemical, microbial and sensory quality of fresh-cut red beetroots in relation to sanitization method and storage duration, *Ital. J. Food Sci.*, 2015, 27, 208–220.
- 47 Y. A. Mennah-Govela and G. M. Bornhorst, Acid and moisture uptake in steamed and boiled sweet potatoes and associated structural changes during in vitro gastric digestion, *Food Res. Int.*, 2016, 88(Part B), 247–255.
- 48 T. S. Kujala, J. M. Loponen, K. D. Klika and K. Pihlaja, Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48(11), 5338–5342.
- 49 R. P. F. Guiné, F. Henriques and M. J. Barroca, Influence of drying treatments on the physical and chemical properties of cucumber, *J. Food Meas. Charact.*, 2014, 8(3), 195–206.
- 50 A. Vega-Gálvez, K. Di Scala, K. Rodríguez, R. Lemus-Mondaca, M. Miranda, J. López, *et al.* Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian), *Food Chem.*, 2009, 117(4), 647–653.
- 51 D. Ferreira, S. Guyot, N. Marnet, I. Delgadillo, C. M. Renard and M. A. Coimbra, Composition of Phenolic Compounds in a Portuguese Pear (*Pyrus communis* L. Var. S. Bartolomeu) and Changes after Sun-Drying, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50(16), 4537–4544.
- 52 D. K. Asami, Y. J. Hong, D. M. Barrett and A. E. Mitchell, Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze fried and air dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 1237–1241.
- 53 M. R. González-Centeno, M. Jourdes, A. Femenia, S. Simal, C. Rosselló and P.-L. Teissedre, Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 11850–11858.
- 54 T. Sawicki and W. Wiczowski, The effects of boiling and fermentation on betalain profiles and antioxidant capacities of red beetroot products, *Food Chem.*, 2018, 259, 292–303.
- 55 V. Raikos, A. McDonagh, V. Ranawana and G. Duthie, Processed beetroot (*Beta vulgaris* L.) as a natural antioxidant in mayonnaise: Effects on physical stability, texture and sensory attributes, *Food Sci. Hum. Wellness*, 2016, 5(4), 191–198.
- 56 A. Loncaric, K. Dugalic, I. Mihaljevic, L. Jakobek and V. Pilizota, Effects of Sugar Addition on Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Frozen and Freeze-Dried Apple Puree, *J. Agric. Food Chem.*, 2014, 62, 1674–1682.
- 57 J. Bouayed, L. Hoffmann and T. Bohn, Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake, *Food Chem.*, 2011, 128(1), 14–21.
- 58 S. Kamiloglu, A. A. Pasli, B. Ozcelik, J. Van Camp and E. Capanoglu, Influence of different processing and storage conditions on in vitro bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades, *Food Chem.*, 2015, 186, 74–82.
- 59 J. Chen, H. Sun, Y. Wang, S. Wang, X. Tao and A. Sun, Stability of Apple Polyphenols as a Function of Temperature and pH, *Int. J. Food Prop.*, 2014, 17(8), 1742–1749.
- 60 P. C. Wootton-Beard and L. Ryan, A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants, *J. Funct. Foods*, 2011, 3(4), 329–334.
- 61 M. Fazzari, L. Fukumoto, G. Mazza, M.A. Livrea, L. Tesoriere and L.D. Marco, In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.), *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56(10), 3561–3568.
- 62 A. Pérez-Vicente, A. Gil-Izquierdo and C. García-Viguera, In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate

- Juice Phenolic Compounds, Anthocyanins, and Vitamin C, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**(8), 2308–2312.
- 63 M. J. Rodríguez-Roque, B. de Ancos, C. Sánchez-Moreno, M. P. Cano, P. Elez-Martínez and O. Martín-Belloso, Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages, *J. Funct. Foods*, 2015, **14**, 33–43.
- 64 A. Cilla, S. Perales, M. J. Lagarda, R. Barberá, G. Clemente and R. Farré, Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages, *J. Food Compos. Anal.*, 2011, **24**(1), 87–94.
- 65 J. Pérez-Jiménez and F. Saura-Calixto, Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays, *Food Res. Int.*, 2006, **39**(7), 791–800.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos en el presente estudio, a continuación, se detallan las conclusiones más relevantes que pueden extraerse a partir del trabajo realizado:

- Se ha validado el uso de residuos de naranja como fuente de compuestos antioxidantes, mejorando además el proceso de extracción mediante la aplicación de ultrasonidos de potencia.
- Se ha comprobado que la aplicación de diferentes tipos de procesado (congelación, liofilización y secado convectivo) ha contribuido en la mejora de la bioaccesibilidad de los compuestos con propiedades antioxidantes presentes en la manzana y remolacha.

Evaluación del efecto de los ultrasonidos de potencia en el proceso de extracción

- Los resultados experimentales sugirieron que los residuos de naranja constituyen una fuente importante de compuestos antioxidantes que pueden ser extraídos con agua como disolvente de extracción a una temperatura baja-moderada (5-25 °C) con altos rendimientos (40-80 %) al realizar la extracción asistida con ultrasonidos de potencia (520 y 790 W/L).
- El uso de ultrasonidos de potencia ha permitido, utilizando agua como disolvente de extracción, obtener porcentajes de extracción (40-80%) similares a los propuestos en la bibliografía para la extracción mediante disolventes orgánicos.
- La temperatura de operación (5, 15 y 25 °C) condicionó de manera significativa el rendimiento de extracción. Cuando el proceso se llevó a cabo con agitación mecánica y tras 10 min de extracción, el rendimiento en polifenoles totales (TPC), en flavonoides totales (TFC) y la actividad antioxidante (AA, método ABTS) se incrementó un 83, 75 y 95%, respectivamente, al elevarse la temperatura de 5 a 25°C.
- La aplicación de ultrasonidos de potencia mejoró el proceso de extracción de compuestos antioxidantes tanto en la velocidad de extracción como en los rendimientos máximos alcanzados. Los rendimientos de extracción de polifenoles totales, flavonoides totales y de la actividad antioxidante (método ABTS) después de 10 min a 25 °C y una densidad acústica de 790 W/L fueron 28, 44 y 157 %, respectivamente.

respectivamente, más elevados que los rendimientos obtenidos en las mismas condiciones, pero con agitación mecánica.

- Mediante el modelo de Weibull se simuló adecuadamente (error relativo medio, ERM<4.6%) las cinéticas de extracción con agitación mecánica y con asistencia acústica de compuestos fenólicos y flavonoides, y de la actividad antioxidante (método ABTS) en un intervalo de temperaturas de 5 a 25 °C. Se pudo concluir que la energía de activación del proceso disminuyó con la aplicación de ultrasonidos (32 y 63% en contenido total en polifenoles para las densidades acústicas 520 y 790 W/L, respectivamente; 68% en contenido total en flavonoides para ambas densidades acústicas; 31 y 38% en la actividad antioxidante para las densidades acústicas 520 y 790 W/L, respectivamente).
- Al analizar la composición fenólica de los extractos, se observó que su extracción tuvo lugar con diferentes rendimientos. La neohesperidina, hesperidina, y los ácidos cumárico y sinápico presentaron los rendimientos más elevados especialmente en el caso de la extracción acústica (rendimientos máximos de 67%, 58%, 92% y 50% respectivamente después de 10 min de extracción a 25°C y 790 W/L). Los rendimientos de la extracción de naringina y ácido ferúlico fueron menores probablemente debido a su carácter lipofílico (rendimientos máximos de 11% y 16% respectivamente después de 10 minutos de extracción a 25°C y 790 W/L)

Evaluación de la aplicación de distintos métodos de procesado sobre la liberación de compuestos con propiedades antioxidantes en diferentes matrices alimentarias

Efecto del procesado sobre la liberación de compuestos antioxidantes de la manzana Granny Smith (alimento de porosidad intermedia)

- Se evaluaron los efectos de la aplicación de diferentes métodos de procesado (congelación, liofilización y secado convectivo) sobre las características químicas, la microestructura y la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de manzana de la variedad *Granny Smith*.
- Se observó una significativa destrucción celular (evaluada mediante microscopía SEM y óptica) y cambios en la composición de la pared celular como consecuencia del proceso de digestión in vitro realizado durante 180 min. Estas modificaciones

estructurales dieron lugar a cambios de comportamiento durante el proceso de digestión gástrica in vitro.

- El procesado mediante la congelación por inmersión en nitrógeno líquido no indujo cambios significativos en el contenido en sólidos solubles ni acidez titulable. Sin embargo, el contenido en sólidos solubles de las muestras liofilizadas y secadas convectivamente disminuyó un 6 y 40%, respectivamente, y su acidez aumentó un 9.5 y 37.5%, respectivamente.
- El rendimiento de la extracción del residuo insoluble en alcohol (AIR) disminuyó un 4, 13 y 25% en las muestras congeladas, liofilizadas y secadas mediante secado convectivo, respectivamente, siendo el procesado mediante secado convectivo el que dio lugar a la disminución del contenido en carbohidratos más notoria (45%).
- El contenido total en carbohidratos de la pared celular de la muestra fresca no sufrió cambios significativos después de ser sometida a un proceso de digestión in vitro. Sin embargo, las muestras procesadas mediante congelación, liofilización y secado convectivo sufrieron una disminución significativa ($p < 0.05$) del contenido total en carbohidratos (13, 17 y 38%, respectivamente) después de la digestión in vitro.
- Respecto al estudio estructural de las muestras mediante microscopia, se pudo observar que la aplicación de los tres tipos de procesado estudiados (congelación, liofilización y secado convectivo) provocó cambios estructurales respecto a la muestra fresca. El secado convectivo provocó un colapso celular notorio, mientras que en las muestras liofilizadas dicho colapso celular se observó en menor medida. La muestra congelada presentó una estructura más porosa consecuencia de las oquedades ocasionadas por los cristales de hielo. Todas las muestras, tanto fresca como procesadas, presentaron daños estructurales después del proceso de digestión in vitro, siendo las muestras procesadas las que presentaron daños estructurales más notorios.
- Las muestras procesadas mediante congelación y liofilización presentaron disminuciones importantes en el contenido de compuestos fenólicos totales (45 y 35% respectivamente) y en su actividad antioxidante (57 y 45%, respectivamente) respecto a la materia fresca, mientras que las muestras secadas mediante secado convectivo presentaron aumentos importantes en ambos parámetros (16 y 24%,

respectivamente). Sin embargo, la bioaccesibilidad de dichos compuestos fue mayor en las muestras procesadas (58, 55 y 47% en las muestras congeladas, liofilizadas y secadas por secado convectivo, respectivamente) que en la muestra fresca (32%).

- Mediante el modelo de Weibull se simuló satisfactoriamente ($ERM < 5.3\%$) las cinéticas de bioaccesibilidad y de cambio en los contenidos en humedad, sólidos solubles y acidez en las muestras fresca y procesadas durante el proceso de digestión *in vitro*.
- El parámetro α del modelo de Weibull disminuyó en las muestras procesadas respecto a la muestra fresca, por tanto, el procesamiento aumentó la velocidad de liberación de los compuestos antioxidantes. En todas las muestras y en todas las condiciones de operación, el parámetro β del modelo de Weibull fue inferior a 1 lo que indica que la velocidad de liberación de los compuestos antioxidantes disminuyó con el tiempo.

*Efecto de la velocidad de congelación sobre la liberación de compuestos antioxidantes de la remolacha *Beta vulgaris* (alimento con estructura compacta)*

- Se comprobó el efecto de las condiciones de congelación ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ por inmersión en nitrógeno líquido, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), sobre la composición química, la microestructura y la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes de remolacha *Beta vulgaris* mediante la utilización de un método estático de digestión *in vitro*.
- Las muestras de remolacha tratadas mediante congelación lenta ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-1.33\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) y moderada ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-2.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) mostraron un aumento del contenido en humedad (3.9 y 2.7%, respectivamente) respecto a la muestra fresca durante la digestión *in vitro*, mientras que las muestras congeladas a velocidad elevada ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-432\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$) no presentaron diferencias significativas en el contenido en humedad respecto a la muestra fresca.
- Durante la digestión *in vitro*, las muestras de remolacha congeladas a -20 y $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ presentaron una disminución de acidez (30 y 39%, respectivamente) respecto a la muestra fresca, mientras que las muestras tratadas con N_2 líquido mostraron un incremento en el contenido en acidez (24 %) respecto a la muestra fresca.

- La congelación disminuyó el contenido total en polifenoles (38 y 58%, respectivamente) y la actividad antioxidante (55 y 41%, respectivamente) de las muestras; sin embargo, la bioaccesibilidad de los compuestos antioxidantes fue mayor en las muestras procesadas (60%) que en la muestra fresca (47%).
- El incremento en el contenido en compuestos antioxidantes en el jugo gástrico fue superior a la disminución observada en la matriz alimentaria. Por ejemplo, el aumento del contenido en polifenoles totales de la muestra congelada a 80 °C después de 180 min de digestión in vitro fue del 111%, y, sin embargo, la muestra sólida solo sufrió una pérdida del 49% del contenido total en polifenoles durante el mismo proceso. Dicho comportamiento, posiblemente, fue debido a la degradación de moléculas sin actividad antioxidante original, que han dado lugar a moléculas con actividad antioxidante.
- La congelación mediante inmersión en nitrógeno líquido fue el proceso de congelación que provocó una mayor (~40%) bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de la remolacha.
- El modelo de Weibull fue capaz de describir el proceso de transferencia de materia que se produjo durante la digestión in vitro, tanto del proceso de liberación de los compuestos antioxidantes desde la matriz (ERM<6.9) como del proceso de absorción de dichos compuestos en el jugo gástrico (ERM<8.8).
- El proceso de congelación de la remolacha incrementó la velocidad de liberación/absorción de los compuestos antioxidantes durante el proceso de digestión in vitro respecto a la muestra fresca. Este hecho fue observable también a través del parámetro α del modelo de Weibull.

*Efecto de la liofilización y secado convectivo sobre la liberación de compuestos antioxidantes de la remolacha *Beta vulgaris* (alimento con estructura compacta)*

- Se comprobó el efecto de la liofilización y secado convectivo sobre la composición química, la microestructura y la bioaccesibilidad de compuestos antioxidantes de remolacha *Beta vulgaris* mediante la utilización de un método estático de digestión in vitro.

- El análisis microestructural realizado indicó la existencia de daño celular significativo y cambios estructurales consecuencia de los procesos de secado y digestión gástrica *in vitro*. El uso del análisis de imagen permitió obtener resultados cuantitativos del efecto del procesado y la digestión *in vitro* sobre la microestructura de la matriz alimentaria. Las muestras secadas presentaron un aumento del número de células por unidad de área respecto a la muestra fresca (22 y 32% en las muestras secadas mediante liofilización y secado convectivo, respectivamente), mientras que todas las muestras después del proceso de digestión *in vitro* presentaron una disminución del número de células por unidad de área (41, 49 y 41% en la muestra fresca, liofilizada y secada mediante secado convectivo, respectivamente). Dichos resultados indican que el proceso de secado provocó un colapso en la estructura de las muestras, mientras que, el proceso de digestión *in vitro* provocó lisis celular.
- El secado provocó disminuciones en el contenido total de polifenoles (74 y 41% en las muestras secadas por liofilización y secado convectivo, respectivamente) y la actividad antioxidante (33 y 49% en las muestras secadas por liofilización y secado convectivo, respectivamente) antes de la digestión gástrica *in vitro*.
- La remolacha sometida a secado, presentó un aumento más rápido del contenido en humedad (80 y 153% en las muestras liofilizadas y secadas mediante secado convectivo, respectivamente) y la acidez titulable (84 y 114% en las muestras liofilizadas y secadas mediante secado convectivo respectivamente) durante la digestión gástrica *in vitro*, en comparación con la remolacha fresca (74 y 82% de contenido en humedad y acidez titulable, respectivamente).
- Las muestras secadas mediante liofilización y secado convectivo mostraron mayor liberación de compuestos bioactivos (contenido en polifenoles totales y actividad antioxidante) (54 y 76% en contenido en polifenoles totales y actividad antioxidante, respectivamente, para las muestras liofilizadas; 64 y 82% en contenido en polifenoles totales y actividad antioxidante, respectivamente, para las muestras secadas mediante secado convectivo) en comparación con la muestra fresca (47 y 53% en contenido en polifenoles totales y actividad antioxidante).
- Durante la digestión *in vitro* se produjo la degradación de moléculas presentes en la matriz alimentaria sin actividad antioxidante original, a moléculas más pequeñas con actividad antioxidante. Por ello, el contenido en polifenoles totales y la actividad

antioxidante fueron superiores en el jugo gástrico a los valores esperables. Por ejemplo, el aumento del contenido en polifenoles totales en el jugo gástrico después de 180 min de digestión de la muestra liofilizada fue del 140%, y, sin embargo, la muestra sólida solo sufrió una pérdida del 54% del contenido total en polifenoles durante el proceso.

- La aplicación del modelo de Weibull permitió simular satisfactoriamente el proceso de transferencia de masa que tiene lugar durante la digestión *in vitro*, tanto de la liberación de los compuestos antioxidantes desde la matriz (ERM<7.1) como la absorción de estos compuestos por el jugo gástrico (ERM<8.5). Los parámetros del modelo de Weibull se utilizaron para comparar la tasa de liberación/absorción de compuestos antioxidantes y fenólicos de la remolacha.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abouge-Angone, S., Nguema-Ona, E., Ghosh, P., Lerouge, P., Ishii, T., Ray, B., & Driouich, A. (2008). Cell wall carbohydrates from fruit pulp of *Argania spinosa*: structural analysis of pectin and xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 343(1), 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.018>
- Abramovic, H. (2015). Antioxidant properties of hydroxycinnamic acid derivatives: A focus on biochemistry, physicochemical parameters, reactive species, and biomolecular interactions. In *Coffee in health and disease prevention* (Victor Preedy, p. 1080).
- Aguilera, J. M. (2005). Why food microstructure? *Journal of Food Engineering*, 67, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.05.050>
- Aguiló-Aguayo, I., Walton, J., Viñas, I., & Tiwari, B. K. (2017). Ultrasound assisted extraction of polysaccharides from mushroom by-products. *LWT - Food Science and Technology*, 77, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.043>
- Aherne, S. A., Daly, T., Jiwan, M. A., O'Sullivan, L., & O'Brien, N. M. (2010). Bioavailability of β -carotene isomers from raw and cooked carrots using an in vitro digestion model coupled with a human intestinal Caco-2 cell model. *Food Research International*, 43(5), 1449–1454. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.04.026>
- Ahmed, M., Sorifa, A. M., & Eun, J. B. (2010). Effect of pretreatments and drying temperatures on sweet potato flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 726–732. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02191.x>
- Alamed, J., Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2009). Relationships between Free Radical Scavenging and Antioxidant Activity in Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2969–2976. <https://doi.org/10.1021/jf803436c>
- Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., ... Santos, C. N. (2014). In vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12081>
- Alonso, J., Canet, W., & Rodríguez, M. T. (1994). Mechanical assessment of texture of sweet cherries: Effects of freezing. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66, 1–7. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740660102>
- Andersen, Ø. M., & Jordheim, M. (2010). Chemistry of flavonoid-based colors in plants. In *Comprehensive Natural Products II* (pp. 547–614). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00086-1>
- AOAC. Solids in Sirups (1990). AOAC International.
- AOAC. Moisture in Dried Fruits (1997). AOAC International.
- AOAC. Acidity (Titratable) of Fruit Products (1998). AOAC International.
- Apak, R., Guclu, K., Ozyurek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem*, 52, 7970–7981. <https://doi.org/10.1021/jf048741x>
- Arapitsas, P. (2012). Hydrolyzable tannin analysis in food. *Food Chemistry*, 135(3), 1708–1717.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.096>

- Arnous, A., & Meyer, A. S. (2009). Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3611–3619. <https://doi.org/10.1021/jf900780r>
- Asimi, O. A., Sahu, N. P., & Pal, A. K. (2013). Antioxidant capacity of crude water and ethylacetate extracts of some Indian species and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(26), 1907–1915.
- 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>
- Babinszky, L., Van Der Meer, J. M., Boer, H., & Den Hartog, L. A. (1990). An in-vitro method for prediction of the digestible crude protein content in pig feeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50(2), 173–178. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740500205>
- Balisteiro, D. M., Rombaldi, C. V., & Genovese, M. I. (2013). Protein, isoflavones, trypsin inhibitory and in vitro antioxidant capacities: Comparison among conventionally and organically grown soybeans. *Food Research International*, 51(1), 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2012.11.015>
- Ballance, S., Sahlstrøm, S., Lea, P., Nagy, N. E., Andersen, P. V., Dessev, T., ... Faulks, R. (2013). Evaluation of gastric processing and duodenal digestion of starch in six cereal meals on the associated glycaemic response using an adult fasted dynamic gastric model. *European Journal of Nutrition*, 52(2), 799–812. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0386-5>
- Barrett, K. E. (2006). *Gastrointestinal Physiology*. Lange Medical Books/McGraw-Hill.
- Bartoszek, M., & Polak, J. (2012). An electron paramagnetic resonance study of antioxidant properties of alcoholic beverages. *Food Chemistry*, 132(4), 2089–2093. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.12.060>
- Baş, D., & Boyacı, İ. H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 836–845. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.11.024>
- Beltrán, M. R. (2016). Alimentos funcionales. *Farmacia Profesional*, 30(3), 3–5.
- Benloch-Tinoco, M., Kaulmann, A., Corte-Real, J., Rodrigo, D., Martínez-Navarrete, N., & Bohn, T. (2015). Chlorophylls and carotenoids of kiwifruit puree are affected similarly or less by microwave than by conventional heat processing and storage. *Food Chemistry*, 187, 254–262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.052>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. a., & García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols

- in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865–874. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.025>
- Bhaskaracharya, R. K., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2009). Selected applications of ultrasonics in food processing. *Food Engineering Reviews*, 1(1), 31–49. <https://doi.org/10.1007/s12393-009-9003-7>
- Bimakr, M., Ganjloo, A., & Noroozi, A. (2019). Effect of acoustic cavitation phenomenon on bioactive compounds release from *Eryngium caucasicum* leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3), 1839–1851. <https://doi.org/10.1007/s11694-019-00103-w>
- Blanquet-Diot, S., Denis, S., Chalancon, S., Chaira, F., Cardot, J.-M., & Alric, M. (2012). Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of Probiotic Yeast During Gastrointestinal Transit in Humans. *Pharmaceutical Research*, 29(6), 1444–1453. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0620-5>
- Blanquet-Diot, S., Soufi, M., Rambeau, M., Rock, E., & Alric, M. (2009). Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal System. *Journal of Nutrition*, 139(5), 876–883. <https://doi.org/10.3945/jn.108.103655>
- 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>
- Blumenkrantz, N., & Asboe-Hansen, G. (1973). New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, 54(2), 484–489.
- Bordignon-Luiz, M. T., Gauche, C., Gris, E. F., & Falcão, L. D. (2007). Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 40(4), 594–599. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2006.02.022>
- Bornhorst, G. M., Roman, M. J., Dreschler, K. C., & Singh, R. P. (2014). Physical property changes in raw and roasted almonds during gastric digestion in vivo and in vitro. *Food Biophysics*, 9, 39–48. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9315-2>
- Bornhorst, G. M., & Singh, R. P. (2013). Kinetics of in vitro bread bolus digestion with varying oral and gastric digestion parameters. *Food Biophysics*, 8(1), 50–59. <https://doi.org/10.1007/s11483-013-9283-6>
- Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128, 14–21. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- Bourne, M. (2002). *Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement* (2nd ed.). New York: Academic Press.
- Brett, C. T., & Waldron, K. (1996). *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. Chapman & Hall.
- Briones-Labarca, V., Muñoz, C., & Maureira, H. (2011). Effect of high hydrostatic pressure on antioxidant capacity, mineral and starch bioaccessibility of a non conventional food: *Prosopis chilensis* seed. *Food Research International*, 44(4), 875–883. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.013>
- Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., & Maureira, H.

- (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128(2), 520–529. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.074>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Brouwers, J., Anneveld, B., Goudappel, G.-J., Duchateau, G., Annaert, P., Augustijns, P., & Zeijdner, E. (2011). Food-dependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets: In vitro evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(2), 313–319. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.10.009>
- Brown, E. D., Blakely, S. R., Babu, U., Grundel, E., & Mitchell, G. V. (1997). Vegetable concentrates interact with canthaxanthin to affect carotenoid bioavailability and superoxide dismutase activity but not immune response in rats. *Nutrition Research*, 17, 989–998. [https://doi.org/10.1016/s0271-5317\(97\)00063-8](https://doi.org/10.1016/s0271-5317(97)00063-8)
- Brown, M. (1977). Texture of frozen fruits and vegetables. *Journal of Texture Studies*, 7(4), 391–404. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4603.1977.tb01147.x>
- Buckeridge, M. S. (2010). Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology*, 154(3), 1017–1023. <https://doi.org/10.1104/pp.110.158642>
- 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. (2003). *Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de materia*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Cárcel, J., 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>
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415–1422. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>
- Carnachan, S. M., Bootten, T. J., Mishra, S., Monro, J. a., & Sims, I. M. (2012). Effects of simulated digestion in vitro on cell wall polysaccharides from kiwifruit (*Actinidia* spp.). *Food Chemistry*, 133(1), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.12.084>
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, M. de L., Páez-Hernández, M. E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859–871. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2008.09.001>
- Castela-Papin, N., Cai, S., Vatier, J., Keller, F., Souleau, C. H., & Farinotti, R. (1999). Drug interactions with diosmectite: a study using the artificial stomach-duodenum model. *International Journal of*

Pharmaceutics, 182(1), 111–119.

- Cavalcanti, R. N., Santos, D. T., & Meireles, M. A. A. (2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*, 44(2), 499–509. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.12.007>
- Cerantola, N., & Ortiz, M. T. (2018). *La economía circular en el sector agroalimentario*.
- Charles, D. (2013). *Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources*. Springer (Vol. 91).
- Chassagne-Berces, S., Fonseca, F., Citeau, M., & Marin, M. (2010). Freezing protocol effect on quality properties of fruit tissue according to the fruit, the variety and the stage of maturity. *LWT - Food Science and Technology*, 43(9), 1441–1449. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.04.004>
- Chassagne-Berces, S., Poirier, C., Devaux, M. F., Fonseca, F., Lahaye, M., Pigorini, G., ... Guillon, F. (2009). Changes in texture, cellular structure and cell wall composition in apple tissue as a result of freezing. *Food Research International*, 42(7), 788–797. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.001>
- Chen, D., Xi, H., Guo, X., Qin, Z., Pang, X., Hu, X., ... Wu, J. (2013). Comparative study of quality of cloudy pomegranate juice treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 85–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.003>
- Chen, J., Gaikwad, V., Holmes, M., Murray, B., Povey, M., Wang, Y., & Zhang, Y. (2011). Development of a simple model device for in vitro gastric digestion investigation. *Food & Function*, 2(3–4), 174–182. <https://doi.org/10.1039/c0fo00159g>
- Cheung, Y. C., Siu, K.-C., & Wu, J.-Y. (2013). 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>
- Cheyrier, V. (2005). Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(1), 223S–229S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.223S>
- Cilla, A., Alegría, A., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Plaza, L., ... Barberá, R. (2012). Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7282–7290. <https://doi.org/10.1021/jf301165r>
- Cilla, A., Bosch, L., Barberá, R., & Alegría, A. (2018). Effect of processing on the bioaccessibility of bioactive compounds – A review focusing on carotenoids, minerals, ascorbic acid, tocopherols and polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.01.009>
- Cissé, M., Bohuon, P., Sambe, F., Kane, C., Sakho, M., & Dornier, M. (2012). Aqueous extraction of anthocyanins from Hibiscus sabdariffa: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2011.10.012>
- Clemente, G., Bon, J., Sanjuan, N., & Mulet, A. (2011). Drying modelling of defrosted pork meat under forced convection conditions. *Meat Science*, 88, 374–378.

<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.012>

- Codex Alimentarius. Guidelines on nutrition labelling (1985). Italy: Codex Alimentarius. International Food Standards, FAO.
- Codex Alimentarius. Report of the 30 th session of the codex committee on nutrition and foods for special dietary uses (2008). South Africa: Codex Alimentarius. International Food Standards, FAO.
- Colle, I., Van Buggenhout, S., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). High pressure homogenization followed by thermal processing of tomato pulp: Influence on microstructure and lycopene in vitro bioaccessibility. *Food Research International*, 43(8), 2193–2200. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2010.07.029>
- Coronado, M., Vega, S., Gutiérrez, R., Vázquez, M., & Radilla, C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr*, 42(2).
- Corradini, M. G., & McClements, D. J. (2019). Microscopy | Food Applications. In P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, & M. B. T.-E. of A. S. (Third E. Miró (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)* (pp. 47–56). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14314-8>
- Courraud, J., Berger, J., Cristol, J. P., & Avallone, S. (2013). Stability and bioaccessibility of different forms of carotenoids and vitamin A during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 136(2), 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.076>
- Cui, Z. W., Li, C. Y., Song, C. F., & Song, Y. (2008). Combined microwave-vacuum and freeze drying of carrot and apple chips. *Drying Technology*, 26(12), 1517–1523. <https://doi.org/10.1080/07373930802463960>
- De Bonis, M. V., & Ruocco, G. (2008). A generalized conjugate model for forced convection drying based on an evaporative kinetics. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 232–240. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2008.05.008>
- Delgado, a. E., & Rubiolo, a. C. (2005). Microstructural changes in strawberry after freezing and thawing processes. *LWT - Food Science and Technology*, 38(2), 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.015>
- Derriche, R., & Berrahmoune, K. S. (2007). Valorisation of olive oil cake by extraction of hemicelluloses. *Journal of Food Engineering*, 78(4), 1149–1154. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2005.12.026>
- Devaux, M. F., Bouchet, B., Legland, D., Guillon, F., & Lahaye, M. (2008). Macro-vision and grey level granulometry for quantification of tomato pericarp structure. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 199–209. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.017>
- Devaux, M. F., Qannari, E. M., & Gallant, D. J. (1992). Multiple-correspondence analysis optical microscopy for determination of starch granules. *Journal of Chemometrics*, 6(3), 163–175. <https://doi.org/10.1002/cem.1180060307>
- Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., & Rui Hai Liu. (2002). Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. <https://doi.org/10.1021/JF0115589>
- Dhuique-Mayer, C., Servent, A., Descalzo, A., Mouquet-Rivier, C., Amiot, M.-J., & Achir, N. (2016). Culinary practices mimicking a polysaccharide-rich recipe enhance the bioaccessibility of fat-

- soluble micronutrients. *Food Chemistry*, 210, 182–188. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.037>
- Di Scala, K., & Crapliste, G. (2008). Drying kinetics and quality changes during drying of red pepper. *Lwt-Food Science and Technology*, 41, 789–795. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.007>
- Dickinson, P. A., Abu Rmaileh, R., Ashworth, L., Barker, R. A., Burke, W. M., Patterson, C. M., ... Yasin, M. (2012). An investigation into the utility of a multi-compartmental, dynamic, system of the upper gastrointestinal tract to support formulation development and establish bioequivalence of poorly soluble drugs. *The AAPS Journal*, 14(2), 196–205. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9333-x>
- Dranca, F., & Oroian, M. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena*) peel. *Ultrasonics Sonochemistry*, 31, 637–646. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.11.008>
- Drechsler, K., & Bornhorst, G. (2018). Modeling the softening of carbohydrate-based foods during simulated gastric digestion. *Journal of Food Engineering*, 222, 38–48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.007>
- Duan, X., Ding, L., Ren, G., Liu, L., & Kong, Q. (2013). The drying strategy of atmospheric freeze drying apple cubes based on glass transition. *Food and Bioprocess Processing*, 91(4), 534–538. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.06.005>
- Eastwood, M. A., & Morris, E. R. (1992). Physical properties of dietary fiber that influence physiological function: a model for polymers along the gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 55(2), 436–442. <https://doi.org/10.1093/ajcn/55.2.436>
- Eim, V. S., Garcia-Perez, J. V, Rossello, C., Femenia, A., & Simal, S. (2012). Influence of the Addition of Dietary Fiber on the Drying Curves and Microstructure of a Dry Fermented Sausage (Sobrassada). *Drying Technology*, 30(2), 146–153. <https://doi.org/10.1080/07373937.2011.628428>
- 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*) on the Basis of Quality Criteria. *Drying Technology*, 31, 951–962. <https://doi.org/10.1080/07373937.2012.707162>
- Ekiert, R. J., Szopa, A., Ekiert, H., Krzek, J., & Dzik, E. (2013). Analysis of lignans in Schisandra chinensis fruits, leaves, biomasses from in vitro cultures and food supplements. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1576–1581. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.06.008>
- Elleuch, M., Bedigian, D., Roiseux, O., Besbes, S., Blecker, C., & Attia, H. (2011). Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 124(2), 411–421. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.06.077>
- Ellis, P. R., Kendall, C. W. C., Ren, Y., Parker, C., Pacy, J. F., Waldron, K. W., & Jenkins, D. J. a. (2004). Role of cell walls in the bioaccessibility of lipids in almond seeds. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(3), 604–613. <https://doi.org/80/3/604> [pii]
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., Hudson, G. J., & Cummings, J. H. (1996). Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *The British Journal of Nutrition*, 75(5), 749–755.
- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A., & Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108–120. <https://doi.org/10.1007/s12393->

011-9036-6

- Escudero, E., & González, P. (2006). La fibra dietética. *Nutrición Hospitalaria*, 21(2), 61–72.
- Failla, M. L., Chitchumroonchokchai, C., Siritunga, D., De Moura, F. F., Fregene, M., Manary, M. J., & Sayre, R. T. (2012). Retention during processing and bioaccessibility of β -carotene in high β -carotene transgenic cassava root. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(15), 3861–3866. <https://doi.org/10.1021/jf204958w>
- Failla, M. L., Huo, T.-Y., & Thakkar, S. K. (2008). In Vitro screening of relative bioaccessibility of carotenoids from foods. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 17(S1), 200–203. <https://doi.org/10.6133/APJCN.2008.17.S1.48>
- Failla, M. L., Thakkar, S. K., & Kim, J. Y. (2009). In vitro bioaccessibility of β -carotene in orange fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas*, Lam.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10922–10927. <https://doi.org/10.1021/jf900415g>
- FAO, F. and A. O. of the U. N. (2012). *Huella del despilfarro de alimentos Contabilidad ambiental de las pérdidas y desperdicio de alimentos*.
- Fellows, P., & Trepát, F. J. S. (1993). *Tecnología del procesado de los alimentos: pirincipios y prácticas*. Acirbia, Editorial, S.A.
- Femenia, A., Garcí'a-Pascual, P., Simal, S., & Rosselló, C. (2003). Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, 51, 397–405. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00209-6](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00209-6)
- Femenia, A., Sastre-Serrano, G., Simal, S., Garau, M. C., Eim, V. S., & Rosselló, C. (2009). Effects of air-drying temperature on the cell walls of kiwifruit processed at different stages of ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 106–112. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2008.05.022>
- Fernandes, Â., Barros, L., Barreira, J. C. M., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. P., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Effects of different processing technologies on chemical and antioxidant parameters of *Macrolepiota procera* wild mushroom. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 493–499. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.06.027>
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
- Figuerola-Espinoza, M. C., Zafimahova, A., Alvarado, P. G. M., Dubreucq, E., & Poncet-Legrand, C. (2015). Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 178, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.056>
- Figuerola, F., Hurtado, M. L., Estévez, A. M., Chiffelle, I., & Asenjo, F. (2005). Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibre sources for food enrichment. *Food Chemistry*, 91(3), 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.036>
- Fito, P., Andrés, A. M., Albors, A. M., & Barat, J. M. (2001). *Introducción Al Secado De Alimentos Por Aire Caliente. Introducción Al Secado De Alimentos Por Aire Caliente*.
- Flerchinger, G. N., Lehrs, G. A., & McCool, D. K. (2004). Freezing and thawing | Processes. In *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 104–110). <https://doi.org/10.1016/b0-12-348530->

4/00365-9

- Flint, O. (1994). *Food microscopy: a manual of practical methods, using optical microscopy*. BIOS Scientific Publishers in association with the Royal Microscopical Society.
- Fogliano, V., Corollaro, M. L., Vitaglione, P., Napolitano, A., Ferracane, R., Travaglia, F., ... Gibson, G. (2011). In vitro bioaccessibility and gut biotransformation of polyphenols present in the water-insoluble cocoa fraction. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(S1), S44–S55. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000360>
- Fraeye, I., De Roeck, A., Duvetter, T., Verlent, I., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2007). Influence of pectin properties and processing conditions on thermal pectin degradation. *Food Chemistry*, 105(2), 555–563. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2007.04.009>
- Gadjalova, A. V., & Mihaylova, D. S. (2019). Ultrasound-assisted extraction of medicinal plants and evaluation of their biological activity. *Food Research*, 3(5), 530–536. [https://doi.org/10.26656/fr.2017.3\(5\).128](https://doi.org/10.26656/fr.2017.3(5).128)
- Galiardi, G. R., Sullivan, D., & Smith, N. F. (1984). Computer-aided video inspection. In *Food technology*. Institute of Food Technologists.
- Garau, M. C., Simal, S., Rosselló, C., & Femenia, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products. *Food Chemistry*, 104, 1014–1024. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.009>
- García-Casal, M. N., Layrisse, M., Pablo Peña-Rosas, J., Ramírez, J., Leets, I., & Matus, P. (2003). Iron absorption from elemental iron-fortified corn flakes in humans. role of vitamins A and C1–3. *Nutrition Research*, 23(4), 451–463. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(02\)00557-2](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(02)00557-2)
- García-Pérez, J. V. (2007). *Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Garrett, D. A., Failla, M. L., & Sarama, R. J. (1999). Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4301–4309.
- Gärtner, C., Stahl, W., & Sies, H. (1997). Lycopene is more bioavailable from tomato paste than from fresh tomatoes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66(1), 116–122. <https://doi.org/10.1093/ajcn/66.1.116>
- Gerstenmeyer, E., Reimer, S., Berghofer, E., Schwartz, H., & Sontag, G. (2013). Effect of thermal heating on some lignans in flax seeds, sesame seeds and rye. *Food Chemistry*, 138(2–3), 1847–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.117>
- Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P., & Tomás-Barberán, F. a. (2002). An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214(2), 155–159. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0428-3>
- Golding, M., & Wooster, T. J. (2010). The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(1), 90–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.006>
- González-Centeno, M. R. (2013). *Caracterización de los subproductos de la industria vitivinícola como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos. Uso de los ultrasonidos de potencia para la*

extracció de la fracció fenólica. 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/http://dx.doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.027>
- González-Centeno, M. R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., & Teissedre, P.-L. (2012). Proanthocyanidin Composition and Antioxidant Potential of the Stem Winemaking Byproducts from 10 Different Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 11850–11858. <https://doi.org/10.1021/jf303047k>
- 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, 1580–1586. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.024>
- González, E., de Ancos, B., & Cano, P. (2002). Preservation of raspberry fruits by freezing: physical, physico-chemical and sensory aspects. *European Food Research and Technology*, 215(6), 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0600-4>
- Grassby, T., Mandalari, G., Grundy, M. M.-L., Edwards, C. H., Bisignano, C., Trombetta, D., ... Waldron, K. W. (2017). In vitro and in vivo modeling of lipid bioaccessibility and digestion from almond muffins: The importance of the cell-wall barrier mechanism. *Journal of Functional Foods*, 37, 263–271. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.046>
- Griguelmo-Miguel, N., & Martín-Belloso, O. (1999). Comparison of dietary fibre from by-products of processing fruits and greens and from cereals. *LWT - Food Science and Technology*, 32(8), 503–508. <https://doi.org/10.1006/FSTL.1999.0587>
- Grigoras, C.-G., Destandau, E., Lazar, G., & Elfakir, C. (2012). Bioactive compounds extraction from pomace of four apple varieties. *Journal of Engineering Studies and Research*, 18(1), 96–103.
- Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S., & Alric, M. (2012). Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591–600. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.08.001>
- Guillotin, S. E., Van Loey, A., Boulenger, P., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2007). Rapid HPLC method to screen pectins for heterogeneity in methyl-esterification and amidation. *Food Hydrocolloids*, 21(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2006.02.003>
- Guldiken, B., Toydemir, G., Nur Memis, K., Okur, S., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2016). Home-processed red beetroot (*Beta vulgaris* L.) products: Changes in antioxidant properties and bioaccessibility. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms17060858>
- Gültekin-Özgülven, M., Berktaş, I., & Özçelik, B. (2016). Change in stability of procyanidins, antioxidant capacity and in-vitro bioaccessibility during processing of cocoa powder from cocoa beans. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 559–565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.065>
- Hammami, C., & Rene, F. (1997). Determination of freeze-drying process variables for strawberries. *Journal of Food Engineering*, 32, 133–154. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(97\)00023-x](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(97)00023-x)
- Hamrouni-Sellami, I., Rahali, F. Z., Rebey, I. B., Bourgou, S., Limam, F., & Marzouk, B. (2013). Total

- phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. *Food and Bioprocess Technology*, 6(3), 806–817. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0877-7>
- He, B., Zhang, L. L., Yue, X. Y., Liang, J., Jiang, J., Gao, X. L., & Yue, P. X. (2016). Optimization of Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, 204, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.094>
- He, Y., & Zheng, Y. (2010). Assessment of in vivo bioaccessibility of arsenic in dietary rice by a mass balance approach. *The Science of the Total Environment*, 408(6), 1430–1436. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.12.043>
- He, Z., Tao, Y., Zeng, M., Zhang, S., Tao, G., Qin, F., & Chen, J. (2016). High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect in vitro bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. *Food Chemistry*, 200, 107–116. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.045>
- Hedrén, E., Diaz, V., & Svanberg, U. (2002). Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. *European Journal Of Clinical Nutrition*, 56, 425.
- Helal, A., Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., & Conte, A. (2014). Bioaccessibility of polyphenols and cinnamaldehyde in cinnamon beverages subjected to in vitro gastro-pancreatic digestion. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.005>
- Heleno, S. A., Diz, P., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 197, 1054–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.108>
- Herrera, H., Meksem, K., Ragin, B., Akond, M., Kassem, M. A., Lightfoot, D. A., ... Akbay, C. (2015). Effect of row spacing on seed isoflavone contents in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *American Journal of Plant Sciences*, 05(26), 4003–4010. <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.526418>
- Hilz, H., Bakx, E. J., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2005). Cell wall polysaccharides in black currants and bilberries—characterisation in berries, juice, and press cake. *Carbohydrate Polymers*, 59(4), 477–488. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2004.11.002>
- Hiranvarachat, B., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2011). Effects of acid pretreatments on some physicochemical properties of carrot undergoing hot air drying. *Food and Bioprocess Technology*, 89, 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.010>
- Hithamani, G., & Srinivasan, K. (2014). Effect of domestic processing on the polyphenol content and bioaccessibility in finger millet (*Eleusine coracana*) and pearl millet (*Pennisetum glaucum*). *Food Chemistry*, 164, 55–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.107>
- 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>
- Hu, J., Wu, F., Wu, S., Cao, Z., Lin, X., & Wong, M. H. (2013). Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an in vitro gastrointestinal model. *Chemosphere*, 91(4), 455–461. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.11.066>

- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Isken, F., Klaus, S., Osterhoff, M., Pfeiffer, A. F. H., & Weickert, M. O. (2010). Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(4), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.12.012>
- Iwashina, T. (2000). The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287–299. <https://doi.org/10.1007/PL00013940>
- Jiménez-Escrig, A., & Sánchez-Muniz, F. J. (2000). Dietary fibre from edible seaweeds: Chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutrition Research*, 20(4), 585–598. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(00\)00149-4](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(00)00149-4)
- Kamiloglu, S., Demirci, M., Selen, S., Toydemir, G., Boyacioglu, D., & Capanoglu, E. (2014). Home processing of tomatoes (*Solanum lycopersicum*): effects on in vitro bioaccessibility of total lycopene, phenolics, flavonoids, and antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(11), 2225–2233. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6546>
- Kamiloglu, S., Pasli, A. A., Ozcelik, B., Van Camp, J., & Capanoglu, E. (2015). Influence of different processing and storage conditions on in vitro bioaccessibility of polyphenols in black carrot jams and marmalades. *Food Chemistry*, 186, 74–82. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.046>
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(6), 453–464. <https://doi.org/10.1080/10408690490886683>
- Karakaya, S., & Yilmaz, N. (2007). Lycopene content and antioxidant activity of fresh and processed tomatoes and in vitro bioavailability of lycopene. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(12), 2342–2347. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2998>
- Kaulmann, A., André, C. M., Schneider, Y.-J., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2016). Carotenoid and polyphenol bioaccessibility and cellular uptake from plum and cabbage varieties. *Food Chemistry*, 197, 325–332. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.049>
- 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>
- Kerdpi boon, S., Devahastin, S., & Kerr, W. L. (2007). Comparative fractal characterization of physical changes of different food products during drying. *Journal of Food Engineering*, 83, 570–580. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.03.039>
- 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(2), 851–858. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.08.046>
- Kheadr, E., Zihler, A., Dabour, N., Lacroix, C., Le Blay, G., & Fliss, I. (2010). Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic *in vitro* model. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1), 54–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04644.x>
- Kiokias, S., Varzakas, T., & Oreopoulou, V. (2008). In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(1), 78–93.

<https://doi.org/10.1080/10408390601079975>

- Klu, Y. A. K., & Chen, J. (2015). Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. *LWT - Food Science and Technology*, 62(2), 983–988. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.018>
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). A model stomach system to investigate disintegration kinetics of solid foods during gastric digestion. *Journal of Food Science*, 73(5), 202–210. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00745.x>
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 73(5), R67–R80. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x>
- Kong, Fanbin, & Singh, R. P. (2010). A Human Gastric Simulator (HGS) to study food digestion in human stomach. *Journal of Food Science*, 75(9), E627–E635. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01856.x>
- Krokida, M. K., Foundoukidis, E., & Maroulis, Z. (2004). Drying constant: literature data compilation for foodstuffs. *Journal of Food Engineering*, 61, 321–330. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(03\)00136-5](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(03)00136-5)
- Krul, C. A. M., Zeilmaker, M. J., Schothorst, R. C., & Havenaar, R. (2004). Intra-gastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic in vitro gastrointestinal model under human physiological conditions. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 42(1), 51–63.
- Lafka, T.-I., Lazou, A. E., Sinanoglou, V. J., & Lazos, E. S. (2013). Phenolic extracts from wild olive leaves and their potential as edible oils antioxidants. *Foods (Basel, Switzerland)*, 2(1), 18–31. <https://doi.org/10.3390/foods2010018>
- Landete, J. M. (2011). Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International*, 44(5), 1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.027>
- Lapornik, B., Prošek, M., & Golc Wondra, A. (2005). Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of Food Engineering*, 71(2), 214–222. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2004.10.036>
- Lee, H., Kim, H., Cadwallader, K. R., Feng, H., & Martin, S. E. (2013). Sonication in combination with heat and low pressure as an alternative pasteurization treatment – Effect on Escherichia coli K12 inactivation and quality of apple cider. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1131–1138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.01.003>
- Lemmens, L., Tibäck, E., Svelander, C., Smout, C., Ahrné, L., Langton, M., ... Hendrickx, M. (2009). Thermal pretreatments of carrot pieces using different heating techniques: Effect on quality related aspects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 522–529. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2009.05.004>
- Liu, Y., & Sopade, P. A. (2011). Modelling starch digestion in sweetpotato with biphasic digestograms. *Journal of Food Engineering*, 104(2), 307–315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.022>
- Lodish, H., Lodish, U. H., Berk, A., Fund, R. E. C. M., Matsudaira, U. P., Kaiser, C. A., ... Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman.

- Loncaric, A., Dugalic, K., Mihaljevic, I., Jakobek, L., & Pilizota, V. (2014). Effects of sugar addition on total polyphenol content and antioxidant activity of frozen and freeze-dried apple puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 1674–1682. <https://doi.org/10.1021/jf405003u>
- López, J., Uribe, E., Vega-Gálvez, A., Miranda, M., Vergara, J., Gonzalez, E., & Scala, K. (2010). Effect of air temperature on drying kinetics, vitamin C, antioxidant activity, total phenolic content, non-enzymatic browning and firmness of blueberries variety O'Neil. *Food and Bioprocess Technology*, *3*, 772–777. <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0306-8>
- M'hiri, N., Ioannou, I., Mihoubi Boudhrioua, N., & Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioprocess Technology*, *96*, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010>
- Machmudah, S., Zakaria, Winardi, S., Sasaki, M., Goto, M., Kusumoto, N., & Hayakawa, K. (2012). Lycopene extraction from tomato peel by-product containing tomato seed using supercritical carbon dioxide. *Journal of Food Engineering*, *108*(2), 290–296. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2011.08.012>
- Mainville, I., Arcand, Y., & Farnworth, E. R. (2005). A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, *99*(3), 287–296. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.08.020>
- Mandalari, G., Tomaino, A., Rich, G. T., Lo Curto, R., Arcoraci, T., Martorana, M., ... Wickham, M. S. J. (2010). Polyphenol and nutrient release from skin of almonds during simulated human digestion. *Food Chemistry*, *122*(4), 1083–1088. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.03.079>
- Marín, F. R., Soler-Rivas, C., Benavente-García, O., Castillo, J., & Pérez-Alvarez, J. A. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, *100*(2), 736–741. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2005.04.040>
- Martens, S., & Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, *66*(20), 2399–2407. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.013>
- Marti, J., & Aguilera, J. M. (1991). Effects of freezing rate on the mechanical characteristics and microstructure of blueberries and wild blackberries. *Revista de Agroquímica y Tecnología De Alimentos*, *31*, 493–504.
- Martin, A. H., & de Jong, G. A. H. (2012). Enhancing the in vitro Fe²⁺ bio-accessibility using ascorbate and cold-set whey protein gel particles. *Dairy Science & Technology*, *92*(2), 133–149. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0055-0>
- Mason, J. T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry*, *15*(2), 237–247. <https://doi.org/10.2174/138527211793979871>
- Matos-Chamorro, A., & Chambilla-Mamani, E. (2010). Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. *Revista de Investigación En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *1*(1), 4–17. <https://doi.org/10.1177/002248718403500202>
- Mayer, E. A. (2011). Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nature Reviews Neuroscience*, *12*, 453.
- McClements, D. J., Decker, E. A., & Park, Y. (2008). Controlling lipid bioavailability through

- physicochemical and structural approaches. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(1), 48–67. <https://doi.org/10.1080/10408390701764245>
- McKee, L. H., & Latner, T. A. (2000). Underutilized sources of dietary fiber: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(4), 285–304. <https://doi.org/10.1023/A:1008144310986>
- McLaughlin, J. E. (1983). *Histological and histochemical methods: Theory and practice*: by J.A. Kiernan Pergamon Press; Oxford, 1981 344 pages. *FEBS Letters*, 151, 311. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(83\)80096-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(83)80096-9)
- Mercuri, A., Passalacqua, A., Wickham, M. S. J., Faulks, R. M., Craig, D. Q. M., & Barker, S. A. (2011). The effect of composition and gastric conditions on the self-emulsification process of ibuprofen-loaded self-emulsifying drug delivery systems: A microscopic and dynamic gastric model study. *Pharmaceutical Research*, 28(7), 1540–1551. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0387-8>
- Meryman, H. T. (1963). Preservation of living cells. *Federation Proceedings*, 22, 81-.
- Miller, D. D., Schriker, B. R., Rasmussen, R. R., & Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248–2256. <https://doi.org/10.1093/ajcn/34.10.2248>
- Minekus, M., Marteau, P., Havenaarl, R., & Huis in't Veld, J. H. J. (1995). A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and Small Intestine. *Atla*, 23, 197–209.
- Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. (2014). *Estrategia “Más alimento, menos desperdicio.”*
- 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>
- Mishra, S., & Monro, J. (2012). Kiwifruit remnants from digestion in vitro have functional attributes of potential importance to health. *Food Chemistry*, 135(4), 2188–2194. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.102>
- Moorthy, I. G., Maran, J. P., Surya, S. M., Naganyashree, S., & Shivamathi, C. S. (2015). Response surface optimization of ultrasound assisted extraction of pectin from pomegranate peel. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 1323–1328. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.10.037>
- Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., ... Prada-Rodríguez, D. (2011). In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 324–345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2010.09.008>
- Morris, V., & Groves, K. (2013). *Food Microstructures: Microscopy, Measurement and Modelling*. Elsevier Science.
- Mrad, N. D., Boudhrioua, N., Kechaou, N., Courtois, F., & Bonazzi, C. (2012). Influence of air drying temperature on kinetics, physicochemical properties, total phenolic content and ascorbic acid of pears. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2011.11.009>

- Naczki, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 95–111. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2004.08.059>
- Nagah, A. M., & Seal, C. J. (2005). In vitro procedure to predict apparent antioxidant release from wholegrain foods measured using three different analytical methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(7), 1177–1185. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2106>
- Nakagiri, N., & Kaizuka, H. (1989). Scanning tunnelling microscopy measurements of carbon deposited on to graphite. *Journal of Microscopy*, 156(3), 267–272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1989.tb02927.x>
- Netzel, M., Netzel, G., Zabarás, D., Lundin, L., Day, L., Addepalli, R., ... Seymour, R. (2011). Release and absorption of carotenoids from processed carrots (*Daucus carota*) using in vitro digestion coupled with a Caco-2 cell trans-well culture model. *Food Research International*, 44(4), 868–874. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.058>
- Neuman, M. R., Sapirstein, H. D., Shwedyk, E., & Bushuk, W. (1989). Wheat grain colour analysis by digital image processing I. Methodology. *Journal of Cereal Science*, 10(3), 175–182. [https://doi.org/10.1016/S0733-5210\(89\)80046-3](https://doi.org/10.1016/S0733-5210(89)80046-3)
- Nikiforuk, G. (1985). *Understanding Dental Caries, Vol I: Etiology & Mechanisms*. Switzerland.
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., & Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(1), 178–192. <https://doi.org/10.1271/bbb.70.178>
- Noordin, M. ., Venkatesh, V. ., Sharif, S., Elting, S., & Abdullah, A. (2004). Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning AISI 1045 steel. *Journal of Materials Processing Technology*, 145(1), 46–58. [https://doi.org/10.1016/S0924-0136\(03\)00861-6](https://doi.org/10.1016/S0924-0136(03)00861-6)
- Norton, T., Tiwari, B., & Sun, D.-W. (2013). Computational fluid dynamics in the design and analysis of thermal processes: A Review of Recent Advances. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(3), 251–275. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.518256>
- Nunes, M. A., Rodrigues, F., Vinha, A. F., Alves, R. C., & Oliveira, M. B. P. P. (2018). 4 - Nutrigenomics and polyphenols. In C. M. B. T.-P. P. Galanakis Recovery, and Applications (Ed.) (pp. 103–132). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813572-3.00004-X>
- Oak, M.-H., El Bedoui, J., & Schini-Kerth, V. B. (2005). Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/J.JNUTBIO.2004.09.004>
- Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P. K. H., & Sips, A. J. A. M. (2003). Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44(3), 281–287. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1278-0>
- Ornelas-Paz, J. D. J., Failla, M. L., Yahia, E. M., & Gardea-Bejar, A. (2008). Impact of the stage of ripening and dietary fat on in vitro bioaccessibility of β -carotene in 'Ataulfo' mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1511–1516. <https://doi.org/10.1021/jf072751r>
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M.-P., Macià, A., & Motilva, M.-J. (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(13), 5743–5749. <https://doi.org/10.1021/jf900591q>
- Osorio, C., Hurtado, N., Dawid, C., Hofmann, T., Heredia-Mira, F. J., & Morales, A. L. (2012). Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits. *Food Chemistry*, 132(4), 1915–1921. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2011.12.026>
- Palsikowski, P. A., Besen, L. M., Santos, K. A., da Silva, C., & da Silva, E. A. (2019). Supercritical CO₂ oil extraction from *Bauhinia forficata* link subsp. *pruinosa* leaves: Composition, antioxidant activity and mathematical modeling. *Journal of Supercritical Fluids*, 153. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104588>
- Panda, V., Shinde, P., Deora, J., & Gupta, P. (2017). A comparative study of the antacid effect of some commonly consumed foods for hyperacidity in an artificial stomach model. *Complementary Therapies in Medicine*, 34, 111–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ctim.2017.08.002>
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of Food Science*, 72(2), 21–32. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>
- 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>
- Paustenbach, D. J. (2000). The practice of exposure assessment: a state-of-the-art review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 3(3), 179–291. <https://doi.org/10.1080/10937400050045264>
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., & Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812–2819.
- Pérez-Gregorio, M. R., Regueiro, J., González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., & Simal-Gándara, J. (2011). Changes in antioxidant flavonoids during freeze-drying of red onions and subsequent storage. *Food Control*, 22, 1108–1113. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.006>
- Phan, P. A., & Mimault, J. (1980). Effets de divers traitements de congélation-décongélation sur l'évaluation des paramètres de texture et l'exsudation des fruits. Relation avec la qualité. *International Journal of Refrigeration*, 3, 255–260. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0140-7007\(80\)90030-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0140-7007(80)90030-4)
- Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as Antioxidants. <https://doi.org/10.1021/NP9904509>
- Pobocikova, I., & Sedliackova, Z. (2014). Comparison of four methods for estimating the Weibull distribution parameters. *Applied Mathematical Sciences*, 8, 4137–4149. <https://doi.org/10.12988/ams.2014.45389>
- Porrini, M., Riso, P., & Testolin, G. (1998). Absorption of lycopene from single or daily portions of raw and processed tomato. *The British Journal of Nutrition*, 80(4), 353–361.
- Povey, M. J. W. (Malcolm J. W. ., & Mason, T. J. (1998). *Ultrasound in food processing*. Blackie Academic & Professional.
- Punna, R., & Paruchuri, U. R. (2003). Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(6), 677–685. <https://doi.org/10.1016/S0889->

1575(03)00095-4

- Quintero-Flórez, A., Pereira-Caro, G., Sánchez-Quezada, C., Moreno-Rojas, J. M., Gaforio, J. J., Jimenez, A., & Beltrán, G. (2018). Effect of olive cultivar on bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic fraction of virgin olive oil. *European Journal of Nutrition*, 57(5), 1925–1946. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1475-2>
- 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>
- Rahman. (2012). *Studies in natural products chemistry. Volume 36, Bioactive natural products, (Part P)*. Elsevier.
- Rahman, M. S., Al-Zakwani, I., & Guizani, N. (2005). Pore formation in apple during air-drying as a function of temperature: porosity and pore-size distribution. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 979–989. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2056>
- Rahman, Shamsudin, R., Ismail, A., Shah, N., & Varith, J. (2018). Effects of drying methods on total phenolic contents and antioxidant capacity of the pomelo (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) peels. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 50, 217–225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.01.009>
- Ramírez-Navas, J. (2007). Liofilización de alimentos. *Revista ReCiTeIA*, 6(January 2007), 1–39.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay - electron-transfer reactions with organic compounds in solutions containing nitrite or nitrate. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M. J., & Mateos-Aparicio, I. (2008). Soybean seeds and its by-product okara as sources of dietary fibre. Measurement by AOAC and englyst methods. *Food Chemistry*, 108(3), 1099–1105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.061>
- Reque, P. M., Steffens, R. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. de O., & de Jong, E. V. (2014). Cold storage of blueberry (*Vaccinium spp.*) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 111–116. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2013.11.007>
- Robles-Ozuna, L. ., & Ochoa-Martínez, L. . (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha*, 13(2), 109–122.
- Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.020>
- Rodríguez, Ó., Eim, V. S., Simal, S., Femenia, A., & Rosselló, C. (2013). Validation of a diffusion model using moisture profiles measured by means of TD-NMR in apples (*Malus domestica*). *Food and Bioprocess Technology*, 6(2), 542–552. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0711-7>
- Rodríguez, Ó., Santacatalina, J. V, Simal, S., Garcia-Perez, J. V, Femenia, A., & Rosselló, C. (2014). Influence of power ultrasound application on drying kinetics of apple and its antioxidant and microstructural properties. *Journal of Food Engineering*, 129, 21–29.

- <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.01.001>
- Ryan, L., O'Connell, O., O'Sullivan, L., Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2008). Micellarisation of carotenoids from raw and cooked vegetables. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63(3), 127–133. <https://doi.org/10.1007/s11130-008-0081-0>
- Sarni-Manchado, P., & Cheynier, V. (2006). *Les polyphénols en agroalimentaire. Sciences et Techniques Agroalimentaires.*
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Zamora-Gasga, V. M., & Venema, K. (2019). Prebiotic effect of predigested mango peel on gut microbiota assessed in a dynamic in vitro model of the human colon (TIM-2). *Food Research International*, 118, 89–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.024>
- Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S–2085S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010). Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 263–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schubert, M. L. (2008). Hormonal regulation of gastric acid secretion. *Current Gastroenterology Reports*, 10(6), 523–527. <https://doi.org/10.1007/s11894-008-0097-5>
- Schümann, K., Classen, H. G., Hages, M., Prinz-Langenohl, R., Pietrzik, K., & Biesalski, H. K. (1997). Bioavailability of oral vitamins, minerals, and trace elements in perspective. *Arzneimittel-Forschung*, 47(4), 369–380.
- Schweiggert, R. M., Mezger, D., Schimpf, F., Steingass, C. B., & Carle, R. (2012). Influence of chromoplast morphology on carotenoid bioaccessibility of carrot, mango, papaya, and tomato. *Food Chemistry*, 135(4), 2736–2742. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.07.035>
- Secretaría técnica del laboratorio de Ecoinnovación. (2017). Sector agroalimentario. Estrategias para un mundo agrario y una industria agroalimentaria más circulares. *Colección de Guías de Economía Circular*, 32.
- Segarra, E. (2006). *Fisiología de los aparatos y sistemas.* (Universidad de Cuenca, Ed.). Cuenca.
- Serra, J. P., & Jean. (1982). *Image analysis and mathematical morphology.* Academic Press.
- Shahat, & Marzouk. (2013). *Medicinal plant research in Africa : pharmacology and chemistry.* Elsevier Ltd.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(1), 67–103. <https://doi.org/10.1080/10408399209527581>
- Shahidi, F., & Naczki, M. (2004). Biosynthesis, classification, and nomenclature of phenolics in food and nutraceuticals. *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, 1–16.
- Shetty, K. (2004). Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: A review. *Process Biochemistry*, 39(7), 789–804. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00088-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00088-8)
- 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 and Processing: Process Intensification*, 53, 10–23. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2012.01.003>

- Singh, M., Kaur, M., & Silakari, O. (2014). Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 84, 206–239. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2014.07.013>
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Sosa, N., Salvatori, D. M., & Schebor, C. (2012). Physico-chemical and mechanical properties of apple disks subjected to osmotic dehydration and different drying methods. *Food and Bioprocess Technology*, 5(5), 1790–1802. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0468-4>
- Sousa, M. B., Canet, W., Alvarez, M. D., & Fernández, C. (2007). Effect of processing on the texture and sensory attributes of raspberry (cv. *Heritage*) and blackberry (cv. *Thornfree*). *Journal of Food Engineering*, 78, 9–21. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.08.047>
- Sova, M. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(8), 749–767.
- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Guzun, A. S., & Dobre, T. (2011). Empirical models applied for kinetics extraction of β -carotene from *Rosa canina*. *Revista de Chimie*, 62, 344–348.
- Tarhouni, A., Ben Zid, M., Talbi, O., Elbour, M., Sadok, S., & Mihoubi Boudhrioua, N. (2019). New integrated process for production of edible and fishmeal powders from sardines: Drying kinetics and quality attributes. *Process Safety and Environmental Protection*, 122, 352–365. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.12.019>
- Tompkins, T., Mainville, I., & Arcand, Y. (2011). The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. *Beneficial Microbes*, 2(4), 295–303. <https://doi.org/10.3920/BM2011.0022>
- Toro-Funes, N., Odriozola-Serrano, I., Bosch-Fusté, J., Latorre-Moratalla, M. L., Veciana-Nogués, M. T., Izquierdo-Pulido, M., & Vidal-Carou, M. C. (2012). Fast simultaneous determination of free and conjugated isoflavones in soy milk by UHPLC-UV. *Food Chemistry*, 135(4), 2832–2838. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.011>
- Torres-Escribano, S., Denis, S., Blanquet-Diot, S., Calatayud, M., Barrios, L., Vélez, D., ... Montoro, R. (2011). Comparison of a static and a dynamic in vitro model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials *Fucus* sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Science of The Total Environment*, 409(3), 604–611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.021>
- Tosh, S. M., & Yada, S. (2010). Dietary fibres in pulse seeds and fractions: Characterization, functional attributes, and applications. *Food Research International*, 43(2), 450–460. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2009.09.005>
- Tydeman, E. A., Parker, M. L., Faulks, R. M., Cross, K. L., Fillery-Travis, A., Gidley, M. J., ... Waldron, K. W. (2010). Effect of carrot (*Daucus carota*) microstructure on carotene bioaccessibility in the upper gastrointestinal tract. 2. In vivo digestions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9855–9860. <https://doi.org/10.1021/jf1010353>
- Um, M., Han, T. H., & Lee, J. W. (2018). Ultrasound-assisted extraction and antioxidant activity of phenolic and flavonoid compounds and ascorbic acid from rugosa rose (*Rosa rugosa* Thunb.) fruit. *Food Science and Biotechnology*, 27(2), 375–382. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0247-3>
- USDA Food Composition Databases. (n.d.). Retrieved March 6, 2019, from

- <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>
- Van het Hof, K. H., De Boer, B. C., Tijburg, L. B., Lucius, B. R., Zijp, I., West, C. E., ... Weststrate, J. a. (2000). Carotenoid bioavailability in humans from tomatoes processed in different ways determined from the carotenoid response in the triglyceride-rich lipoprotein fraction of plasma after a single consumption and in plasma after four days of consumption. *The Journal of Nutrition*, *130*(5), 1189–1196.
- Vardakou, M., Mercuri, A., Barker, S. A., Craig, D. Q. M., Faulks, R. M., & Wickham, M. S. J. (2011). Achieving antral grinding forces in biorelevant in vitro models: comparing the USP dissolution apparatus II and the dynamic gastric model with human in vivo data. *AAPS PharmSciTech*, *12*(2), 620–626. <https://doi.org/10.1208/s12249-011-9616-z>
- Varghese, T., & Pare, A. (2019). Effect of microwave assisted extraction on yield and protein characteristics of soymilk. *Journal of Food Engineering*, *262*, 92–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.020>
- Vatier, J., Célice-Pingaud, C., & Farinotti, R. (1998). Interests of the “artificial stomach” techniques to study antacid formulations: comparison with in vivo evaluation. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, *12*(6), 573–583.
- Veda, S., Kamath, A., Platel, K., Begum, K., & Srinivasan, K. (2006). Determination of bioaccessibility of beta-carotene in vegetables by in vitro methods. *Molecular Nutrition & Food Research*, *50*(11), 1047–1052. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600076>
- Vergara-Valencia, N., Granados-Pérez, E., Agama-Acevedo, E., Tovar, J., Ruales, J., & Bello-Pérez, L. A. (2007). Fibre concentrate from mango fruit: Characterization, associated antioxidant capacity and application as a bakery product ingredient. *LWT - Food Science and Technology*, *40*(4), 722–729. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2006.02.028>
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *9*(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/J.IFSET.2007.04.014>
- Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, *17*(6), 1066–1074. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2009.10.015>
- Wach, A., Pyrzyńska, K., & Biesaga, M. (2007). Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry*, *100*(2), 699–704. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.028>
- Wang, L., & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, *17*(6), 300–312. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2005.12.004>
- Wang, X., Lin, Q., Ye, A., Han, J., & Singh, H. (2019). Flocculation of oil-in-water emulsions stabilised by milk protein ingredients under gastric conditions: Impact on in vitro intestinal lipid digestion. *Food Hydrocolloids*, *88*, 272–282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.001>
- Watanabe, A., Noguchi, N., Fujisawa, A., Kodama, T., Tamura, K., Cynshi, O., & Niki, E. (2000). Stability and reactivity of aryloxy radicals derived from a novel antioxidant BO-653 and related compounds. Effects of substituent and side chain in solution and membranes. <https://doi.org/10.1021/JA9942080>
- Weber, P., Flühmann, B., & Eggersdorfer, M. (2006). Development of bioactive substances for

- functional foods – scientific and other aspects. In *Local Mediterranean Food Plants and Nutraceuticals* (Vol. 59, pp. 171–181). Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000095213>
- Woda, A., Mishellany-Dutour, A., Batier, L., François, O., Meunier, J.-P., Reynaud, B., ... Peyron, M.-A. (2010). Development and validation of a mastication simulator. *Journal of Biomechanics*, *43*(9), 1667–1673. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2010.03.002>
- Xiao, J., Cao, H., Wang, Y., Zhao, J., & Wei, X. (2009). Glycosylation of dietary flavonoids decreases the affinities for plasma protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(15), 6642–6648. <https://doi.org/10.1021/jf901456u>
- Xu, Y., Zhang, L., Bailina, Y., Ge, Z., Ding, T., Ye, X., & Liu, D. (2014). Effects of ultrasound and/or heating on the extraction of pectin from grapefruit peel. *Journal of Food Engineering*, *126*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.11.004>
- XuJie, H., & Wei, C. (2008). Optimization of extraction process of crude polysaccharides from wild edible BaChu mushroom by response surface methodology. *Carbohydrate Polymers*, *72*(1), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.07.034>
- Yang, C. S., Landau, J. M., Huang, M.-T., & Newmark, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annual Review of Nutrition*, *21*(1), 381–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.381>
- Yao, L. H., Jiang, Y. M., Shi, J., Tomás-Barberón, F. A., Datta, N., Singanusong, R., & Chen, S. S. (2004). Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Foods for Human Nutrition*, *59*(3), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s11130-004-0049-7>
- Ye, J., Feng, L., Xiong, J., & Xiong, Y. (2011). Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*(10), 2131–2136. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02727.x>
- Yvon, M., Beucher, S., Scanff, P., Thirouin, S., & Pelissier, J. P. (1992). In vitro simulation of gastric digestion of milk proteins: comparison between in vitro and in vivo data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*(2), 239–244. <https://doi.org/10.1021/jf00014a014>
- Zapotoczny, P. (2014). Discrimination of wheat grain varieties using image analysis and multidimensional analysis texture of grain mass. *International Journal of Food Properties*, *17*(1), 139–151. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.615085>
- Zhang, B., Deng, Z., Ramdath, D. D., Tang, Y., Chen, P. X., Liu, R., ... Tsao, R. (2015). Phenolic profiles of 20 Canadian lentil cultivars and their contribution to antioxidant activity and inhibitory effects on α -glucosidase and pancreatic lipase. *Food Chemistry*, *172*, 862–872. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.09.144>
- Zura-Bravo, L., Ah-Hen, K., Vega-Gálvez, A., García-Segovia, P., & Lemus-Mondaca, R. (2013). Effect of rehydration temperature on functional properties, antioxidant capacity and structural characteristics of apple (Granny Smith) slices in relation to mass transfer kinetics. *Journal of Food Process Engineering*, *36*, 559–571. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12018>

