

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Biotecnología

VALORIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE MANZANA COMO FUENTE DE COMPUESTOS BIOACTIVOS MEDIANTE TECNOLOGÍAS SOSTENIBLES

Autor: IGNACIO ADELL CORRALES

ANEXO IX

Título del Trabajo:

Valorización de subproductos de manzana como fuente de compuestos bioactivos mediante tecnologías sostenibles.

Centro:

Este trabajo ha sido realizado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Tutor:

María Sánchez Ronco

Begoña de Ancos Sigüero

Concepción Sánchez-Moreno González

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	5
2. ABSTRACT.....	5
3. INTRODUCCIÓN.....
3.1. Características de la manzana y procesado.....	6
3.2. Composición nutricional y compuestos fenólicos en la manzana.....	8
3.2.1. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos.....	10
3.3. Secado de muestras vegetales	12
3.4. Tratamiento por altas presiones hidrostáticas.....	14
3.5. Procesos de extracción de compuestos bioactivos de los subproductos de manzana.....	15
3.5.1. Extracción convencional.....	15
3.5.2. Extracción asistida por ultrasonidos.....	16
4. OBJETIVOS.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Material vegetal y caracterización inicial	18
5.2. Preparación de las muestras.....	19
5.2.1. Estabilización de las muestras mediante secado.....	20
5.3. Procesado por alta presión hidrostática.....	21
5.4. Extracción convencional sólido-líquido con agitación magnética.....	21
5.5. Extracción asistida por ultrasonidos.....	22
5.6. Determinación de fenoles totales (Folin Ciocalteu)	23

5.7. Determinación de capacidad antioxidante.....	24
5.7.1. Capacidad secuestrante del radical 2,2'-difetil-1-picrilhidracil (DPPH').....	25
5.7.2. Capacidad reductora del ion férrico (FRAP).....	27
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
6.1. Caracterización del material vegetal inicial: manzanas.....	29
6.2. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de manzana entera, zumo y bagazo.....	30
6.3. Efecto de la estabilización de bagazo de manzana mediante distintos tipos de secado sobre los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.....	32
6.4. Efecto de la extracción asistida por ultrasonidos con un disolvente verde sobre los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de bagazo de manzana. Comparación con una extracción convencional.....	33
6.5. Efecto de la combinación de alta presión hidrostática y extracción asistida por ultrasonidos sobre los compuestos fenólicos y antioxidante de bagazo de manzana.....	35
7. CONCLUSIÓN.....	40
8. BIBLIOGRAFÍA.....	4

1. RESUMEN

La manzana es una de las frutas más consumidas del mundo y destaca por su alto valor nutricional siendo una de las principales fuentes de compuestos bioactivos y antioxidantes de la dieta humana. La mayor parte de la producción de manzanas a nivel mundial es empleada en hacer zumo de manzana, lo que implica la generación de aproximadamente 20 millones de toneladas de bagazo al año en todo el mundo. El objetivo de este estudio fue la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos a partir de bagazos obtenidos de manzanas de las variedades 'Golden Delicious', 'Pink Lady' y 'Granny Smith' y utilizando métodos de extracción no convencionales como la alta presión hidrostática combinada con extracción asistida por ultrasonidos y disolventes verdes como el etanol. Los extractos obtenidos fueron caracterizados mediante el análisis de fenoles totales realizado por el método del Folin Ciocalteu y mediante la determinación de la capacidad antioxidante por los métodos de medida de la capacidad secuestrante del radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidracil (DPPH[•]) y de la capacidad reductora del ion férrico (FRAP).

2. ABSTRACT

The apple is one of the most consumed fruits in the world and stands out for its high nutritional value, being one of the main sources of bioactive compounds and antioxidants in the human diet. Most of the world's apple production is used to make apple juice, which implies the generation of approximately 20 million tons of bagasse per year worldwide. The objective of this study was to obtain extracts rich in phenolic compounds from bagasse obtained from apples of the 'Golden Delicious', 'Pink Lady' and 'Granny Smith' varieties and using non-conventional extraction technologies such as high hydrostatic pressure combined with ultrasound-assisted extraction and green solvents such as ethanol. The extracts obtained were characterized by the analysis of total phenolic compounds by the Folin Ciocalteu method and by determining the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH[•]) scavenging capacity and ferric reducing antioxidant power (FRAP).

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Características de la manzana y procesado

La manzana (*Malus domestica* Borkh) es una de las frutas más consumidas del mundo después de naranja, plátano y uva, que destacan por su alto valor nutricional siendo la manzana una de las principales fuentes de compuestos bioactivos y antioxidantes de la dieta humana. La producción mundial de manzanas en 2015 superó los 80 millones de toneladas, mientras que en 2021 alcanzó los 93 millones de toneladas según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2022), lo que supone un aumento del 16,25% en tan solo 6 años y se espera que la producción mundial continúe con un aumento constante en los próximos años (1). En cuanto a la situación en España, la producción de manzana en el año 2021 se estimó en 615.000 toneladas (FAO, 2023) y las variedades más consumidas fueron 'Golden Delicious', 'Gala', 'Red Delicious', 'Granny Smith' y 'Fuji' (**Figura 1**).

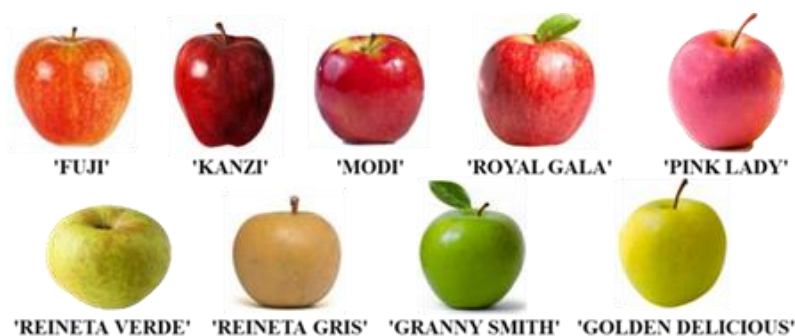


Figura 1. Variedades de manzana más consumidas en España

El desperdicio de alimentos y los subproductos o residuos generados por las industrias agroalimentarias son un grave problema mundial, especialmente en muchos países desarrollados. Los altos estándares de calidad de los supermercados, las estrictas regulaciones de los gobiernos y las ajustadas condiciones que imponen los consumidores al comprar estos alimentos en términos de tamaño, forma y color, desembocan en una producción de más de 50 millones de toneladas de descartes de frutas y verduras solo en Europa (2). El aprovechamiento de estos descartes y de los residuos/subproductos obtenidos del procesado de frutas y hortalizas es uno de los objetivos prioritarios de las empresas agroalimentarias en la actualidad para adaptarse a

una economía circular y cumplir con algunos de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) para el 2030, como el ODS 12 cuyo objetivo es “promover la producción y el consumo responsable de alimentos” (ONU, 2015) (3).

Otros Objetivos de Desarrollo Sostenible de la agenda 2030 para el desarrollo sostenible promovidos por la Organización de las Naciones Unidas (ONU) relacionados con el presente trabajo en el que estudiamos la reutilización de los subproductos vegetales como fuente de nutrientes y compuestos bioactivos con el fin de obtener ingredientes y alimentos funcionales, podrían ser: ODS 2, cuyo objetivo es acabar con el hambre, lograr la seguridad alimentaria y promover la agricultura sostenible, silvicultura y pesca para proporcionar alimentos nutritivos para todos, al tiempo que se apoya el desarrollo rural y se protege el medio ambiente; ODS 3, que tiene como objetivo promover vidas saludables y promover el bienestar para todos en todas las edades. Además, el uso de subproductos de la industria agroalimentaria ayudaría a estas empresas en el proceso de transición de la economía lineal a la circular para un siglo XXI sostenible (4).



Figura 2. Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (ONU, 2015)

En el caso de las manzanas, entre el 25-30% de la producción mundial de manzana se procesa en forma de zumo, vino, sidra, mermeladas o producto deshidratado. El producto de manzana más demandado a nivel mundial es el zumo que equivale al 65% del total de los productos procesados de manzana.

La producción de zumo supone que el 75% del peso de una manzana fresca es extraído en forma de zumo y el 25% restante es un residuo sólido denominado bagazo, constituido principalmente por piel y pulpa, junto con semillas y tallos.

Teniendo en cuenta la producción mundial de zumo de manzana, se estima que se generan aproximadamente 20 millones de toneladas de bagazo al año en todo el mundo (5) (6).

Generalmente, los bagazos son aprovechados como fertilizantes o para alimentación animal. Teniendo en cuenta que estos residuos presentan un alto contenido en compuestos bioactivos como los compuestos fenólicos y la fibra entre otros, se está estudiando su uso como aditivos alimentarios naturales, muy demandados por el consumidor actual, o para la obtención de ingredientes funcionales para obtener distintos tipos alimentos como productos de panadería o zumos (5).

3.2. Composición nutricional y compuestos fenólicos en la manzana

La manzana destaca por su bajo contenido calórico (52 calorías por 100 g), alto contenido en agua (86%) y en hidratos de carbono (13,8 g/100 g) fundamentalmente azúcares, fibra soluble como las pectinas y fibra insoluble (2,4 g/100 g). A pesar de su alto contenido en azúcares, el índice glicémico de la manzana es muy bajo, por lo que ayuda a controlar los niveles de glucosa en sangre. También presentan un buen contenido de potasio (146 mg/100 g), vitamina C (4,6 mg/100 g) y ácidos orgánicos (ácido málico, principalmente) (USDA, 2020) (7).

Existen numerosos estudios que muestran que el consumo de manzana tiene importantes beneficios para la salud, como la reducción del riesgo de enfermedades degenerativas como las enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2 y ciertos tipos de cáncer. Se cree que los compuestos claves responsables de los efectos cardioprotectores y de otros efectos beneficiosos para la salud asociados al consumo de las manzanas son los compuestos fenólicos y la fibra presentes en su composición (8) (9).

La composición y concentración de compuestos fenólicos en las manzanas depende de distintos factores como la variedad, el grado de madurez, condiciones de cultivo, climatología, conservación postcosecha, condiciones de procesado y conservación, entre otros (10) (11) (12).

Se conocen más de 4000 compuestos fenólicos diferentes presentes en los vegetales. Los compuestos fenólicos en la manzana se dividen en dos categorías principales: flavonoides y no flavonoides (13).

Los flavonoides son los compuestos fenólicos más abundantes en la manzana, contribuyen tanto al color de la fruta como a la salud humana. Existen evidencias científicas que muestran que los flavonoides tienen propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antimutagénicas y anticancerígenas. Los estudios epidemiológicos han demostrado que las personas que consumen una dieta rica en frutas, verduras y bebidas con alto contenido de flavonoides tienen una menor incidencia de enfermedad coronaria (14).

Los flavonoides más importantes identificados en las manzanas son: monómeros de flavan-3-oles (epicatequina y catequina) y oligómeros (procianidina B2 como mayoritario), flavonoles (glicósidos de quercetina, principalmente quercetina 3-galactósido y quercetina3-ramnósido), una pequeña cantidad de dihidrochalconas (florizina y un derivado glucosilado, floretin 2'-xiloglucósido) y antocianinas en las variedades rojas (cianidina 3-galactósido) (15).

- Quercetina (principalmente derivados glicosidados): se encuentra en la piel y la pulpa, es el flavonoide más común en la manzana y es conocido debido a su capacidad antiinflamatoria y antioxidante.
- Kaempferol (principalmente derivados glicosidados): se encuentra sobre todo en la piel de la manzana. Tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.
- Catequinas: se encuentran tanto en la pulpa como en la piel de la manzana. Tienen la capacidad de reducir el riesgo de enfermedades crónicas y mejorar la salud cardiovascular.
- Epicatequina: se encuentra en la piel y en la pulpa de la manzana y es muy similar a las catequinas en cuanto a su estructura química y sus beneficios para la salud.

Dentro del grupo de compuestos fenólicos no flavonoides en la manzana, destaca la presencia de ácidos hidroxicinámicos, principalmente ácido clorogénico. Este ácido

fenólico se caracteriza por su capacidad antioxidante y antiinflamatoria y se encuentra tanto en la pulpa como en la piel de la manzana.

Las manzanas también tienen ácido fólico, ácido orgánico esencial para la síntesis de ADN y para el desarrollo del cuerpo humano que se encuentra en la pulpa y la piel de la manzana.

Diferentes estudios experimentales han demostrado que el bagazo de manzana es una buena fuente de compuestos bioactivos y antioxidantes naturales como quercetina, catequina, ácido clorogénico catequina/epicatequina y de las chalconas floretina y florizina. Por lo tanto, el bagazo de manzana se puede utilizar como fuente barata de antioxidantes naturales como los compuestos polifenólicos (16).

3.2.1. Bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos fenólicos

La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos es la fracción de los mismos que se libera de la matriz alimentaria durante la digestión y está disponible para su absorción intestinal. La biodisponibilidad está relacionada con la bioaccesibilidad, ya que es la fracción del compuesto que pasa al torrente sanguíneo y es capaz de alcanzar un determinado tejido para realizar su función biológica. Por tanto, para que los compuestos fenólicos puedan ejercer sus efectos biológicos, es necesario que sean liberados durante la digestión oral-gastrointestinal de la matriz alimentaria y que sean absorbidos en el intestino delgado y transferidos al torrente sanguíneo. Por tanto, todos los factores que mejoren la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos, podrían incrementar sus efectos biológicos y por tanto sus efectos positivos en la salud. La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos puede depender de la estructura química de los mismos, de la matriz alimentaria en la que se encuentran y de las interacciones con otros componentes de la dieta (grasa, proteínas). Un factor importante es el contenido inicial de un determinado compuesto fenólico en la matriz alimentaria. Mayor cantidad de compuestos fenólicos en los alimentos se correlaciona con un mayor número de compuestos liberados y absorbidos en el intestino. Los compuestos fenólicos son sintetizados por las plantas como un mecanismo de defensa contra condiciones de estrés biótico o abiótico. Así, imitando condiciones de estrés como falta de agua,

temperatura, tratamientos con luz, etc., los tratamientos precosecha u otros aplicados durante la postcosecha como campos eléctricos pulsados de baja intensidad seguidos de conservación en refrigeración, pueden estimular la acumulación de compuestos fenólicos en frutas y hortalizas frescas.

Otro factor que puede afectar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos es la estructura química del compuesto. Una vez liberados de la matriz alimentaria, los compuestos fenólicos pueden sufrir diferentes cambios estructurales por la influencia de diversos factores físico-químicos (pH, actividades enzimáticas, temperatura) y mecánicos (trituración, mezcla) y, así, modificar su bioaccesibilidad. Además, dependiendo de su estructura química, los compuestos fenólicos pueden ser parcialmente absorbidos en el intestino delgado (se ha estimado que de un 5-10% de los compuestos ingeridos) y los no absorbidos pueden alcanzar el colon sin apenas modificaciones. La estructura química del compuesto fenólico puede afectar su solubilidad y su capacidad para unirse a proteínas en el tracto gastrointestinal. Los compuestos fenólicos que son más solubles en agua suelen ser más bioaccesibles, mientras que los compuestos fenólicos que son más liposolubles pueden tener una biodisponibilidad reducida. Además, la unión de los compuestos fenólicos a proteínas en el tracto gastrointestinal o la presencia de grasa puede disminuir su bioaccesibilidad.

La presencia de otros nutrientes y compuestos en el alimento también puede afectar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos. Por ejemplo, se ha demostrado que la presencia de vitamina C en el alimento puede aumentar la biodisponibilidad de algunos compuestos fenólicos. Además, la presencia de fibra dietética en el alimento puede afectar la liberación de los compuestos fenólicos en el tracto gastrointestinal y su bioaccesibilidad. Algunos compuestos fenólicos se encuentran fuertemente unidos a los carbohidratos de las paredes de las células vegetales lo que puede dificultar su extracción durante el proceso de digestión. Otros, en cambio, se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y su interacción con los carbohidratos se da cuando la matriz es alterada (17).

El procesado de los alimentos puede utilizarse como una estrategia para aumentar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos ya que puede inducir cambios en la matriz alimentaria que favorezcan la liberación de estos durante la digestión gastrointestinal.

Las tecnologías de procesado no térmicas como las altas presiones hidrostáticas tienen la ventaja de que no afectan o afectan de forma mínima al contenido de compuestos fenólicos y a la vez provocan cambios en la matriz alimentaria como la rotura de las estructuras celulares permitiendo la liberación de los compuestos fenólicos al espacio extracelular lo que podría aumentar la bioaccesibilidad de los mismos. Otras técnicas de procesado de alimentos como la trituración o molienda, el secado o la liofilización también pueden afectar a la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos (18) (19).

3.3. Tratamiento por altas presiones hidrostáticas

El procesado por altas presiones hidrostáticas (high hydrostatic pressure-HHP) es una técnica que se emplea para aumentar la vida útil y la seguridad de los alimentos sin modificar su calidad sensorial, nutricional y la composición en compuestos bioactivos. Esta tecnología no sólo es útil para la industria alimentaria ya que también se emplea en la industria farmacéutica y en la investigación biotecnológica. Esta técnica consiste en aplicar presiones de hasta 600 MPa al alimento o al producto a tratar colocado previamente envasado en una vasija llena de agua (**Figura 3**). La presión generalmente se transmite a través de agua a temperatura ambiente o moderada y por tiempos cortos (3-5 minutos). La presión se transmite de forma instantánea a todos los puntos del alimento por igual, independientemente de la forma y tamaño, eliminando los gradientes de los tratamientos térmicos.

El procesado por alta presión hidrostática fue propuesto por primera vez a fines de la década de 1980 para la eliminación de microorganismos, y ha supuesto grandes avances en la conservación de alimentos debido a su capacidad para inactivar microorganismos e inhibir la actividad de enzimas relacionadas con la oxidación de los alimentos, sin disminuir el valor nutricional y sin modificar el color o el sabor como ocurre con los tratamientos térmicos. Los productos tratados con HHP presentan una mejor retención de nutrientes, sabor y color. Esto es debido a que la presión no modifica los enlaces covalentes presentes en las moléculas pequeñas de los nutrientes y compuestos responsables del color o aroma, pero sí modifica los enlaces de hidrógeno o las interacciones de van der Waals, que existen en las proteínas (estructura terciaria y

cuaternaria) dando lugar a una desnaturalización de las estructuras proteicas de los microorganismos y aumentando la permeabilidad de sus membranas celulares.



Figura 3. Efecto del procesado por HPP sobre enlaces covalentes y puentes de hidrógeno

El procesado por HPP no solo es útil en la conservación de alimentos eliminando microorganismos y reduciendo la actividad enzimática, ya que en la actualidad también se está utilizando como un procedimiento para mejorar la extracción de compuestos bioactivos presentes en los alimentos, lo que sería una vía para funcionalizar dichos alimentos y aumentar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos presentes en su composición. En ciertos alimentos que han sido sometidos a esta técnica, es decir, alimentos presurizados, se ha observado un mayor contenido de compuestos bioactivos, como son los compuestos fenólicos, en comparación con los productos no tratados. Los incrementos se asocian con la liberación de estos compuestos de los compartimentos celulares, lo que resulta en una mayor capacidad de extracción debido al estrés mecánico que ocurre durante la presurización, lo que modifica la morfología celular, la pared celular y los orgánulos (20).



Figura 4. Equipo de HPP del ICTAN (Model FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power LTD., Essex, UK)

3.4. Secado de muestras vegetales

El secado es una operación unitaria esencial en la industria alimentaria y es el método más antiguo para extender la vida útil de los productos alimenticios al inhibir el crecimiento microbiano y las enzimas. Los productos secos tienen una mejor estabilidad microbiológica, duran más tiempo en almacenamiento y pesan menos cuando se transportan. Los métodos de secado convencionales, incluido el secado al vacío, el secado por convección con aire caliente, el secado por microondas y la liofilización, se utilizan ampliamente para mejorar la vida útil del producto. Sin embargo, para terminar el proceso de secado de manera más efectiva, las tecnologías de secado integradas son cada vez más populares (21). Al seleccionar un método de secado, la cantidad de energía utilizada y la calidad de los productos secos son factores esenciales a considerar. Un método de secado eficiente que produce productos de alta calidad es rentable ya que reduce el tiempo de secado y minimiza el daño al producto. El secado es una operación unitaria muy demandante de energía lo que representa aproximadamente el 20% de la energía total consumida en el sector agroalimentario. Más del 85% de los secadores de alimentos comerciales son convectivos, que utilizan aire caliente como medio de transferencia de calor, lo que resulta en cambios significativos en la calidad del producto seco obtenido. Aunque la conservación de la calidad de los alimentos es esencial, la eficiencia energética también es un aspecto crítico del proceso de secado. Por lo tanto, ambos factores son de suma importancia en el diseño, la investigación y el desarrollo de nuevas tecnologías de secado (22).

El secado con aire caliente es la técnica más popular porque es fácil de usar. Sin embargo, los largos períodos de secado y las altas temperaturas causan efectos negativos sobre las propiedades microestructurales y la degradación de los compuestos bioactivos (23) (24). Además de métodos convencionales, se están empleando métodos de secado alternativos que proporcionen un secado más rápido y una mejor conservación de los componentes bioactivos. El proceso de liofilización, que se considera el mejor método de secado, es favorable en términos de lograr productos secos con excelente calidad sensorial y nutricional, así como una alta capacidad de rehidratación (25). Debido a la evaporación del agua a temperaturas inferiores a la

presión atmosférica, las frutas se secan mediante el proceso de secado al vacío sin someterse a altas temperaturas. Además, debido a que la deshidratación ocurre en un ambiente libre de oxígeno, reduce los procesos de oxidación. Estos beneficios aumentan la calidad física de los productos vegetales secos, como el color, el sabor y el aroma (26).

3.5. Técnicas para la extracción de compuestos bioactivos de la manzana

3.5.1. Extracción convencional

La extracción sólido-líquido es una técnica básica utilizada en la recuperación o extracción de uno o varios componentes de una fase sólida desestructurada, también conocida como alimento, y transferencia a una fase líquida, o disolvente. Este proceso se realiza en una sola etapa, en la que se mezclan el disolvente y el alimento durante cierto tiempo produciéndose así un transporte de materia entre ambos. El soluto es el componente que es soluble en el disolvente utilizado y se transfiere de la fase sólida a la fase líquida. La transferencia siempre es del sólido al líquido. Después de que se haya establecido el equilibrio entre ambas fases, la parte sólida no soluble queda separada, mientras que la disolución resultante, que contiene el disolvente y los solutos extraídos, se conoce como extracto.

Existen varios disolventes que son utilizados en la extracción convencional, pero los más comunes son los disolventes orgánicos polar-apolares, como la acetona, el éter etílico, el hexano, el cloroformo, el metanol, el etanol y el isopropanol. Estos disolventes tienen una polaridad intermedia, lo que les permite disolver tanto compuestos polares como no polares.

La elección del disolvente depende de varios factores, como la naturaleza química del compuesto que se desea extraer, su solubilidad en el disolvente, la facilidad de separación del disolvente y el costo del disolvente. Además, el disolvente debe ser seguro para su uso en la industria y no debe ser tóxico para los seres humanos y para el medio ambiente (27).

En general, los disolventes más utilizados son aquellos que tienen una alta capacidad de solubilización, una baja viscosidad, un punto de ebullición moderado, una buena estabilidad térmica y química, y que sean económicamente viables. Cada disolvente tiene sus propias ventajas y desventajas, y su elección dependerá de las propiedades específicas del compuesto a extraer y de las condiciones del proceso de extracción. El disolvente más utilizado para la extracción de compuestos fenólicos es el metanol, siendo este perjudicial para el medio ambiente por lo que se intenta sustituir por disolventes considerados verdes como el etanol combinado con tecnología sostenibles como la extracción por ultrasonidos.

3.5.2. Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)

Los ultrasonidos son ondas sonoras de una frecuencia superior a la que percibe el oído humano (16 kHz). Por lo general en los alimentos, se emplean ondas de frecuencia de alta intensidad entre 20 kHz a 100 MHz. El ultrasonido se basa en el efecto de la cavitación, que es la implosión de microburbujas de aire generadas por las mismas ondas sonoras a su paso por el medio de tratamiento. Las microburbujas generadas durante los procesos de compresión y expansión de las ondas van creciendo hasta que colapsan y explotan liberando energía y produciendo diferentes cambios físicos (ruptura), químicos y bioquímicos en el entorno de las células de los diferentes productos procesados. El mecanismo de extracción por ultrasonidos involucra dos tipos de fenómenos físicos, la difusión a través de la pared celular y el arrastre del contenido del interior de los orgánulos celulares al espacio intercelular después de romper las paredes de estos orgánulos (28).

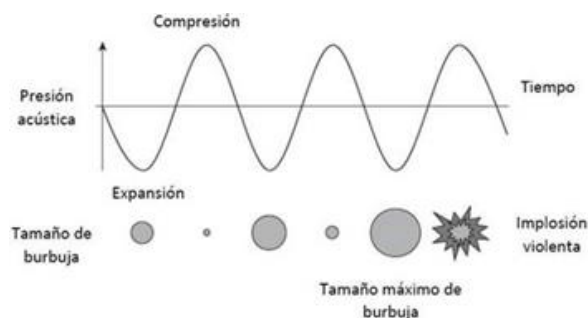


Figura 5. Los ultrasonidos: aplicación en alimentos.

La extracción asistida por ultrasonidos (EAU) se usa para extraer compuestos bioactivos de productos vegetales. Solo los líquidos y los líquidos que contienen materiales sólidos pueden sufrir el efecto de la cavitación. La extracción asistida por ultrasonidos combinada con disolventes verdes aplicada a muestras sólidas de productos vegetales como los liofilizados es muy efectiva para la extracción de compuestos bioactivos porque la energía del ultrasonido facilita la extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos de la matriz vegetal (29). La EAU consigue mejores rendimientos y tiempos de extracción más cortos comparados con la extracción tradicional. La tasa de extracción y el rendimiento pueden mejorarse mediante la combinación óptima de variables como la intensidad y el tiempo de procesado. La EAU ahorra costes y tiempo, a la vez que da lugar a extractos de alta calidad, que se utilizan para alimentos, suplementos y productos farmacéuticos. Factores como el tamaño o grado de molienda de las muestras a extraer o el tipo de disolvente, son factores que afectan al rendimiento de la extracción. Así, disolventes diferentes para la extracción de compuestos fenólicos podrían dar composiciones distintas de compuestos en los extractos, ya que la solubilidad de cada compuesto fenólico en un disolvente dado es diferente. Esto implica que compuestos fenólicos con características más hidrofóbicas se podrían extraer en menor cantidad que aquellos con características hidrofílicas dependiendo de las condiciones del proceso. En consecuencia, la bioactividad de un extracto también se podría afectar (30).

En conclusión, la EAU presenta importantes ventajas respecto a los procesos de extracción convencionales como reducir los tiempos de procesado, el gasto energético,

el uso de disolventes y, además, generan una mínima cantidad de residuos. Todo esto hace que esta tecnología sea considerada una tecnología verde (31).

4. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es la obtención de extractos ricos en compuestos fenólicos a partir de bagazo de manzana mediante el uso de disolventes verdes y tecnologías sostenibles (ultrasonidos y alta presión hidrostática). Para alcanzar el objetivo general se han planteado los siguientes objetivos específicos:

Objetivo específico 1: Estudiar el efecto de la estabilización de bagazo de manzana mediante distintos tipos de secado sobre los compuestos fenólicos y actividad antioxidante.

Objetivo específico 2: Estudiar el efecto de la extracción asistida por ultrasonidos con un disolvente verde como el etanol sobre los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de bagazo de manzana. Comparación con una extracción convencional.

Objetivo específico 3: Estudiar el efecto de la combinación de alta presión hidrostática y extracción asistida por ultrasonidos sobre los compuestos fenólicos y actividad antioxidante de bagazo de manzana.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Material vegetal y caracterización inicial

El material vegetal de estudio fueron manzanas (*Malus domestica* Borkh) de las variedades 'Golden Delicious', 'Granny Smith' y 'Pink Lady' de origen nacional compradas en el supermercado local en marzo de 2023.

Para la caracterización física de las manzanas se determinó el peso, el calibre y el color de la piel con un colorímetro (Konika minolta 2500D). Cada uno de estos valores son la media obtenida de la medida realizada en 10 manzanas.

Para la caracterización fisicoquímica de las manzanas se analizaron los sólidos solubles (°Brix), la acidez titulable y pH.

La determinación de **sólidos solubles** se realizó sobre un homogenizado obtenido con 10 gramos de peso fresco de manzana y 20 mL de agua destilada utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T18, con un dispersor de 12,7/19 mm de diámetro. El homogenizado se filtró con una tela de rejilla de gasa y se determinaron los sólidos solubles expresados como extracto refractométrico en grados Brix (°Brix) a 20 °C utilizando un refractómetro ATAGO dbx-30 (Japón). Los componentes solubles más abundantes en las frutas son los azúcares y los ácidos orgánicos, fundamentalmente ácido málico en las manzanas.

La determinación de la **acidez titulable** y el **pH** se realizó sobre un homogenizado obtenido a partir de 10 gramos de peso fresco con 20 mL de agua destilada utilizando un homogeneizador Ultra-Turrax T18 con un dispersor de 12,7/19 mm de diámetro. Este homogenizado se calentó hasta el punto de ebullición para eliminar el CO₂ ocluido en la muestra que podría dar lugar a ácido carbónico, el cual podría interferir en la medida. Después de enfriarse hasta 25 °C, al homogenizado anterior se añadieron otros 20 mL de agua destilada. Una vez filtrado el homogenizado, se determinó el pH mediante pH metro Crison (micropH 2000) y se valoró el con sosa 0,1N hasta el punto de viraje de la fenolftaleína utilizada como indicador (aproximadamente pH 8,1), anotando el volumen de NaOH gastados. Cada muestra se determinó por duplicado. La determinación de la acidez titulable se realizó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ acidez} = B * N * K * 100/W$$

Figura 6. *Formula de determinación de acidez.*

Donde B es el volumn de NaOH consumidos (mL), N es la normalidad de la NaOH (0.1), W el peso de la muestra (g) y K es la constante de acidez del ácido málico mayoritario en la manzana (0.06704 g/equ).

5.2. Preparación de las muestras

Las manzanas enteras se lavaron, se cortaron en cuartos con piel y se procesaron en una licuadora doméstica (Philips, 500 W), obteniendo así zumo y un residuo sólido denominado bagazo. Los trozos de manzana, antes de introducirse en la licuadora, se

mantuvieron en un recipiente con 1 litro de agua y 1 gramo de ácido ascórbico para evitar el pardeamiento enzimático de la manzana.

Los bagazos se envasaron en bolsas de plástico multicapa de muy baja permeabilidad a los gases (Cryovac, mod. BB3255X). Los zumos se guardaron en frascos de plástico con tapa de 30 mL. Una parte de las muestras de bagazo y de zumo fueron almacenadas a 4 °C para ser analizadas como producto fresco y el resto se guardaron en arcón congelador a -80 °C.

5.2.1. Estabilización de las muestras mediante secado

Para la obtención de producto seco se realizó el secado del bagazo y de la manzana entera, con piel, cortada en trozos.

Las muestras de bagazo se secaron por tres métodos diferentes: liofilización B, liofilización controlada E y mediante estufa.

El secado del bagazo mediante estufa se realizó en una estufa marca Binder a 60 °C durante 48 horas.

Las muestras de bagazo estabilizadas por liofilización B fueron previamente congeladas a -80 °C y liofilizadas en un liofilizador Christ Beta 2-8 LDplus en dos fases, la primera denominada secado principal duro 4 días y las condiciones fueron 0,021 mbar y -55 °C, la segunda denominada secado final duro 3 horas y las condiciones fueron 0,0054 mbar y -65°C.

Las muestras de bagazo estabilizadas por liofilización controlada E fueron congeladas y liofilizadas en un liofilizador Christ Épsilon 2-4 LSCplus en dos fases: la primera denominada secado principal duro 3 días y las condiciones fueron 0,025 mbar y -60 °C, la segunda denominada secado final duro 6 horas y las condiciones fueron 0,0010 mbar y -60°C.

Para estabilizar el producto inicial de manzana entera, se cortaron rodajas de manzana con piel de aproximadamente 0.3 cm, se congelaron a -80 °C y se liofilizaron por liofilización B mediante un liofilizador Chirst Beta 2-8LDplus.

Después del secado por estufa y liofilización, las muestras fueron pulverizadas con un molinillo de café doméstico y guardadas en envase de plástico con tapa de 30 mL de prolipropileno con tapa de rosca a -20 °C hasta su análisis.

5.3. Procesado por altas presiones hidrostáticas

Las muestras de bagazo de manzanas 'Golden Delicious', 'Granny Smith' y 'Pink Lady' fueron preparadas según se describe en el apartado de preparación de muestras (apartado 5.1). Los bagazos fueron envasados en bolsas flexibles de baja permeabilidad (BB4L, Cryovac, Barcelona, España), selladas con un vacío ligero (3,2 mbar) e introducidas en la vasija de 1950 mL de capacidad del equipo de procesado por altas presiones hidrostáticas del ICTAN, marca Iso-Lab System, Model FPG7100:9/2C (Stansted Fluid Power LTD., Essex, UK), utilizando agua como medio de transmisión de la presión. La velocidad de compresión y descompresión fue de 3MPa/s. El tratamiento de alta presión utilizado fue de 200 MPa/25 °C/5 min. Las bolsas de las muestras control y procesadas por alta presión se almacenaron a -80 °C hasta el momento de ser liofilizados por el método de liofilización controlada E según se describe en el apartado de preparación de muestras (5.1). Las muestras liofilizadas fueron pulverizadas con un molinillo de café y guardadas en envase de prolipropileno con tapa de rosca de 30 mL a -20 °C hasta su análisis.

5.4. Extracción convencional sólido-líquido con agitación magnética

La primera fase fue estudiar la capacidad de extracción de compuestos fenólicos de varias mezclas de etanol/agua como disolvente de extracción verde para sustituir la extracción tradicional realizada con metanol/agua (80:20).

Para ello se extrajeron muestras de 1 g de producto seco o liofilizado (o 10 g de producto fresco) con 15 mL de tres tipos de disolventes: metanol/agua (80:20), etanol/agua (80:20) y etanol/agua (50:50). La mezcla se homogeneizó durante 3 min en el Ultra-Turrax T18, utilizando un dispersor de 7,5/10mm de diámetro para muestras liofilizadas y uno de 12,7/19 mm de diámetro para muestras frescas. La mezcla se agitó

a temperatura ambiente durante 30 min en placa agitadora (800 rpm) protegido de la luz y se centrifugó durante 15 min a 10000 rpm 4 °C, separando el sobrenadante y guardándolo en nevera en un matraz de fondo redondo de 100 mL. A continuación, se añadieron otros 15 mL de disolvente de extracción metanol/agua (80:20) o etanol/agua (80:20) o etanol/agua (50:50) al residuo sólido en el tubo de centrifuga y se agito 2 min con vortex. Se filtró con embudo Büchner con kitasato a vacío con papel de filtro y el filtrado se juntó con el sobrenadante obtenido anteriormente. La suma de los dos sobrenadantes se rotó en rotavapor a 40 °C hasta un volumen final de aproximadamente 5 mL que se aforó a 10 mL con metanol en un matraz aforado. Este extracto se denominó “**extracto convencional**” y se guardó a -20 °C hasta el momento de ser analizado.

5.5. Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción se realizó con 5 g de producto fresco o 0,5 g de producto seco o liofilizado con 30 mL de etanol/agua (50:50). La mezcla se homogenizo durante 3 min en el Ultra-Turrax T18, utilizando un dispersor de 7,5/10 mm de diámetro para muestras liofilizadas y uno de 12,7/19 mm de diámetro para muestras frescas. El proceso de extracción se realizó colocando las muestras con el disolvente en un baño de hielo y utilizando una punta sólida (sonotrodo) de 19 mm conectada a un equipo generador de ultrasonidos (Fisherbrand Model 505 Sonic Dismembrator - 500 watts - 20kHz Fisher Scientific™). El generador se sometió a circulación de aire comprimido (5 psi) para evitar el sobrecalentamiento. Se ensayaron distintas condiciones de tratamientos (60 y 70% Amplitud) y tiempos de tratamiento (10 y 20 min). Una vez finalizado el tratamiento, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 10000 rpm a 4 °C. Después se filtraron con embudo Büchner y kitasato a vacío con papel de filtro y el filtrado se separó y rotó en rotavapor a 40 °C hasta un volumen final de aproximadamente de 5 mL que se aforó a 10 mL con metanol en matraz aforado. Este extracto se denominó “**extracto ultrasonido**” y se guardó a -20 °C hasta el momento de ser analizado. La extracción se hizo por duplicado con cada muestra.

5.6. Determinación de fenoles totales (Folin Ciocalteu)

El análisis de los fenoles totales de los extractos obtenidos (convencional y ultrasonidos) se llevó a cabo con la reacción colorimétrica de *Folin-Ciocalteu*. Este método, si bien es original de 1912, fue adaptado por el profesor Vernon Singleton en la Universidad de Davis. El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de iones poliméricos de los ácidos fosfomolibdico y fosfotungstánico (fosfomolibdato y fosfotungstato), usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos.

La determinación de fenoles totales es una reacción colorimétrica que se realiza en una microplaca de 96 micropocillos donde se miden los extractos de las muestras (o sus diluciones) junto con las diluciones seriadas de la solución standard.

Los extractos obtenidos por extracción convencional o por ultrasonidos, fueron diluidos para realizar la determinación de fenoles totales según se indica a continuación: Diluciones: 1 (fd=1), 1:1, v/v (fd=2) 1:2 v/v. (fd=3).

La reacción con las correspondientes diluciones se realizó en tubos de 3 mL o tubos de ensayo siguiendo el siguiente orden en la adicción de reactivos:

- 200 μ L de las correspondientes diluciones de los extractos convencionales o ultrasonidos.
- 1600 μ L de agua destilada.
- 400 μ L del reactivo Folin Ciocalteu. Agitación 15 en vortex y 5 min en la oscuridad.
- 800 μ L de solución de carbonato sódico saturado. Agita agitaron 15 s en vortex y 1 hora en la oscuridad.

Después de esta hora, se colocan 280 μ L de cada reacción en los pocillos de la placa multipocillo por cuadruplicado y se leen en el espectrómetro a 760 nm.

La cuantificación de fenoles totales se realiza con una curva patrón de ácido gálico. Para ello se preparó una disolución de ácido gálico de 1 μ g/ μ L como solución patrón, a la que llamamos M1, disolviendo 50 mg de ácido gálico en 50 mL de agua destilada.

Después, se preparó una dilución de M1, a la que denominamos M2, tomando 25 mL de M1 y aforándolos a 50 mL con agua destilada, obteniendo así una solución M2 de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Tomando diferentes volúmenes de M2 y de agua destilada se obtuvieron las diez concentraciones (patrones) que forman la curva patrón de ácido gálico (**Tabla 1**).

Tabla 1. Diluciones de ácido gálico ($\mu\text{g}/\text{mL}$) para construir la curva patrón

Patrón	Agua (μL)	M2 (μL)	Conc. Acd. Gálico ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Std 1	1000	0	0
Std 2	950	50	25
Std 3	900	100	50
Std 4	850	150	75
Std 5	800	200	100
Std 6	750	250	125
Std 7	700	300	150
Std 8	600	400	200
Std 9	500	500	250

Para la preparación de la **curva patrón**, en tubos de ensayo con capacidad para 3 mL, se añadieron 200 μL de las muestras std 1-9 (**Tabla 1**), cada solución std en un tubo diferente. A continuación, se añadió a cada tubo 1600 μL de agua destilada y 400 μL del reactivo Folin Ciocalteu (Sigma Ref F9252, 2N), se agitaron los tubos en vortex durante 15 s y se dejaron 5 min en la oscuridad, tras esto se adicionaron 800 μL de carbonato sódico saturado a cada tubo, de nuevo se agitaron los tubos en el vortex durante 15 s y se dejaron en reposo 1 hora en la oscuridad. Tras 1 hora, se tomaron 280 μL de solución de cada tubo de ensayo y se colocaron por cuadruplicado en los pocillos de la placa de lectura y la placa se leyó a 760 nm en el espectrofotómetro marca Biotek PowerWave XS.

5.7. Determinación de capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos convencionales y ultrasonidos obtenidos se realizó por métodos espectrofotométricos utilizando un lector para microplacas de 96 pocillos según los métodos DPPH^{*} y FRAP. El método DPPH^{*} determina la capacidad

de las muestras de atrapar radicales libres y el FRAP evalúa su capacidad reductora. Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos fue necesario realizar diluciones del extracto original con metanol, es decir tomando como ejemplo la dilución 1:15, esta fue realizada con 0,1 mL de muestra y 1,5 mL de metanol. Dependiendo de la técnica de extracción empleada y del método para medir la capacidad antioxidante se emplearon distintas diluciones. En todos los análisis se utilizaron blancos de agua, metanol y etanol. Los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de peso seco de muestra (mg GAE/g ps) como valor medio de cuatro repeticiones.

5.7.1. Capacidad secuestrante del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•])

El radical DPPH[•] es un radical orgánico estable que muestra un color violeta y que en contacto con una sustancia antioxidante se reduce, provocando una reducción de la absorbancia y la aparición de un color amarillo pálido debido al grupo residual picrilo.

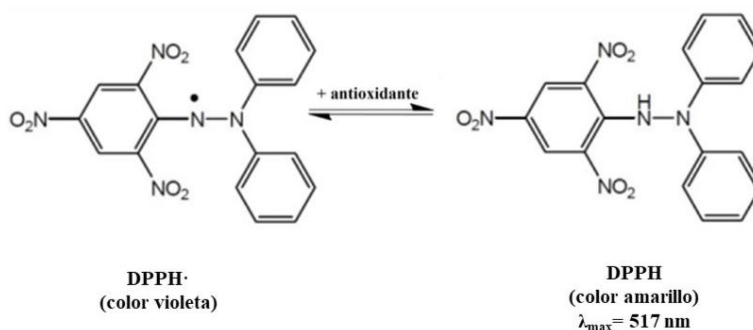


Figura 7. Secuestro del radical DPPH[•] por un compuesto antioxidante

Este método se llevó a cabo utilizando el reactivo 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]) con el que se preparó una solución madre de DPPH[•] 1000 mM (0.001 Molar) en 100 mL. Para ello se pesaron 0,0394 g de DPPH[•] y se disolvieron en 100 mL de metanol. Se conservó a -18 °C y protegida de la luz. De esta solución madre se tomaron 7.7 mL y se enrasaron a 100 mL con metanol, se agitó durante 15 minutos en agitador magnético al resguardo de la luz y se determinó la absorbancia en espectrómetro a 515 nm que debería quedar entre 0.700 y 0.800 de absorción. A esta solución se le denomina solución de trabajo.

Para la determinación de la capacidad antioxidante por DPPH^{*} fue necesario diluir los extractos convencionales y ultrasonido a las siguientes diluciones: 1 (fd=1), 1:1, v/v (fd=2) 1:2 v/v. (fa=3).

La capacidad antioxidante de las muestras (diluciones) se determinó por colorimetría en microplacas de 96 pocillos utilizaron 4 pocillos por cada muestra. En cada uno de los 4 pocillos por muestra se colocaron 10 μ L de las diluciones de los extractos convencionales y ultrasonidos y 280 μ L de la solución de DPPH^{*} de trabajo (Absorbancia a 515 nm = 0,700). Se incubó durante 60 minutos en oscuridad y se midió la absorbancia a 515 nm en espectrofotómetro Biotek PowerWave XS.

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante, se preparó una curva de distintas concentraciones de Trolox (micro molar - μ M) frente a sus valores de absorbancia a 515 nm. El Trolox [(+)-6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)] es un análogo de la vitamina E soluble en agua. Primero se preparó una solución 1 mM pesando 25.029 mg de Trolox en 100 ml H₂O/Etanol (75:25). A continuación, en varios Eppendorf de 1,5 mL se colocaron distintos volúmenes de esta solución 1 mM de Trolox completando hasta 1 mL con agua/etanol (H₂O/EtOH, 75:25) dando lugar a diferentes concentraciones micro molares (μ M) de Trolox según se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Preparación de distintas concentraciones micro molares (μ M) de Trolox.

Trolox (μM)	Trolox 1mM (μl)	H2O/Etanol (75:25) (μl)
0	0	1000
50	50	950
100	100	900
250	250	750
400	400	600
500	500	500
750	750	250
1000	1000	0

Preparación de la curva patrón en microplaca: En una microplaca de 96 pocillos y utilizando 4 pocillos por cada punto de la recta patrón, se añadieron 10 μL de la muestra Trolox (0-1000 μM) correspondiente (**Tabla 2**), y 280 μL de la solución de DPPH \cdot de trabajo. Se incubó la placa durante 60 minutos en oscuridad transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 515 nm en espectrofotómetro marca Biotek PowerWave XS. La curva de Trolox se considera válida cuando el $R^2=0,99$.

Los resultados de capacidad antioxidante DPPH \cdot se expresaron como μmol de equivalentes de Trolox por gramo de peso seco de muestra ($\mu\text{mol TEAC/g ps}$) como valor medio de cuatro repeticiones (TEAC = Trolox equivalent antioxidant capacity).

5.7.2 Capacidad reductora del ion férrico (FRAP)

Con el método Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) se obtiene la capacidad de reducción férrica de una muestra. En contacto con un reductor y a un pH bajo, el complejo de tripiridiltriazina (TPTZ) con hierro III (Fe^{3+}) se reduce a la forma ferrosa (Fe^{2+}), generando un intenso color azul con una absorción máxima a 593 nm (**Figura 8**).

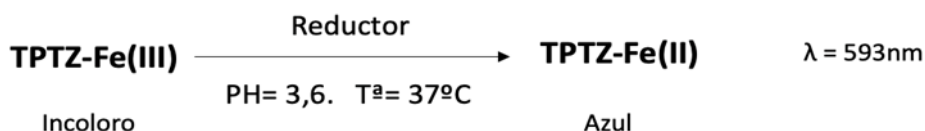


Figura 8. Representación de la reacción que se lleva a cabo en el método FRAP.

Para generar el reactivo FRAP fueron necesarios varios reactivos: una solución 20 mM de cloruro férrico hexahidrato en agua, una solución 10 mM de TPTZ en HCl 40 mM y un tampón acetato (0,3 M, pH 3,6). Estos reactivos se mezclaron en una proporción 10:1:1, v/v/v.

- El tampón acetato (0,3 M a pH 3,6) se preparó disolviendo 3,1 g de sodio acetato trihidrato ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) en 16 mL de ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) y enrasando a 1 L con agua destilada.
- Para obtener una solución 10 mM de TPTZ se disolvieron 0,0781 g de TPTZ en HCl 40 mM y se enrasaron a 25 mL con la misma solución ácida. La solución de ácido

clorhídrico (HCl) 40 mM se preparó con 3,3123 mL de HCl al 37% y enrasando a 1 L con agua destilada. La solución final de TPTZ se conservó en nevera y en ausencia de luz.

- La solución 20 mM de cloruro férrico hexahidrato ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) se obtuvo pesando 0,13515 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y enrasando a 25 mL. La solución final se conservó en nevera y en ausencia de luz.

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante se prepararon distintas concentraciones micro molares (μM) de Trolox para preparar la curva patrón siguiendo el mismo procedimiento descrito en el método DPPH* (**Tabla 2**).

Para la determinación de la capacidad antioxidante por FRAP fue necesario diluir los extractos a las siguientes diluciones: 1 (fd=1), 1:1, v/v (fd=2), 1:2 v/v (fd=3).

La determinación de la capacidad antioxidante por el método FRAP se realizó también en microplaca de 96 pocillo. En los correspondientes pocillos se añadieron 10 μL de los extractos diluidos de las muestras (extracción convencional o ultrasonidos) y de las distintas concentraciones de Trolox para construir la curva patrón (de menor a mayor concentración) por cuadruplicado. Posteriormente, se añadieron 280 μL del reactivo FRAP a los correspondientes pocillos de las placas (muestra y patrón). La placa se incubó a 37 °C durante 20 minutos en oscuridad y se midió su absorbancia a 593 nm en un espectrofotómetro de UV-vis de placas marca Biotek PowerWave XS.

Preparación de la recta patrón de Trolox: Se preparó una disolución de Trolox 1 mM para lo que se pesaron 25,029 mg de Trolox y se disolvieron en 100 mL H_2O /Etanol (75:25). Se añadieron en eppendorffs diferentes volúmenes de esta disolución Trolox 1 mM y se diluyeron con H_2O /Etanol (**Tabla 2**) obteniendo varios puntos de la recta patrón.

Reacciones para curva patrón: En una microplaca de 96 pocillos y utilizando 4 pocillos por cada punto de la recta patrón, se añadieron a cada pocillo 10 μL de la muestra trolox (0-1000 μM) (**Tabla 2**), y 290 μL del reactivo FRAP. Se incubó la placa a 37 °C durante 20 minutos en oscuridad transcurrido este tiempo se midió la absorbancia a 593 nm en un espectrofotómetro de UV-vis de placas marca Biotek PowerWave XS. La curva de Trolox se considera válida cuando el $R^2 < 0,99$.

Los resultados de capacidad antioxidante FRAP se expresaron como μmol de equivalentes de Trolox por gramo de peso seco de muestra ($\mu\text{mol TEAC/g ps}$) como valor medio de cuatro repeticiones (TEAC = Trolox equivalent antioxidant capacity).

5 RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Caracterización del material vegetal inicial: manzanas

En la **Tabla 3** se muestra las diferentes características físicas de las 3 variedades de manzanas utilizadas en el estudio. Se puede observar que las manzanas más grandes han sido las 'Granny Smith' con un peso de ≈ 246 gramos, una altura de ≈ 7 cm y una anchura de ≈ 8 cm. Por otro lado, las manzanas 'Golden Delicious' y 'Pink Lady' presentaron características muy similares tanto de peso como de anchura y altura con un peso de 187 gramos, y una altura y anchura cercana a 7 cm en ambos casos.

Tabla 3. Características físicas de las manzanas utilizadas en el estudio

		Media	Desviación típica	Intervalo de Confianza al 95%
GOLDEN DELICIOUS	Altura (cm)	7,23	0,5389	7,57-6,88
	Anchura (cm)	6,95	0,3008	7,14-6,75
	Peso (g)	187,83	15,2	197,48-178,17
GRANNY SMITH	Altura (cm)	7,157	0,553	7,5-6,8
	Anchura (cm)	8,043	0,162	8,14-7,94
	Peso (g)	246,31	23,74	261,4231,22
PINK LADY	Altura (cm)	7,128	0,364	7,35-6,89
	Anchura (cm)	7,157	0,181	7,27-7,04
	Peso (g)	187,02	6,085	190,88-183,15

Tabla 4. Características fisicoquímicas (pH, acidez y grados Brix) de las manzanas utilizadas en el estudio

	GOLDEN DELICIOUS	GRANNY SMITH	PINK LADY
Acidez (%)	0,24	0,36	0,18
pH	3,833	3,36	3,93
° Brix (%)	15,20	17	20

La **Tabla 4** muestra las características físico-químicas de las manzanas utilizadas en este estudio. Se observa que la manzana con mayor acidez y menor pH es la 'Granny Smith' con 0,36 % de grado de acidez y un pH de 3,36. Le sigue en acidez la 'Golden Delicious' con un 0,24% y por último la 'Pink Lady' con un grado de acidez de 0,18% y un pH de 3,93. En cuanto a los grados Brix la que mayor porcentaje tiene es la 'Pink Lady' con un 20% seguida de la 'Granny Smith' con un 17% y finalmente la 'Golden Delicious' con 15,2%. La mayor acidez y menor pH de 'Granny Smith' se aprecien sensorialmente al ser consumidas, al ser esta la manzana más ácida de las tres estudiadas, a la vez que la más dulce es la 'Pink Lady' que es la que presenta la acidez más baja y el mayor contenido en °Brix.

6.2. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de manzana entera, zumo y bagazo

Inicialmente, realizamos un estudio con el fin de determinar las diferencias en concentración de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante que existen entre una manzana entera, el zumo obtenido de la misma y lo que queda como residuo sólido o bagazo. Este estudio se realizó con manzana 'Golden Delicious'. En la **Figura 9** se observa que la muestra con mayor concentración de compuestos fenólicos totales fue la manzana entera con piel conteniendo 0,52 mg GAE/ g pf, seguida por el bagazo con 0,48 mg GAE/ g pf y por último el zumo con 0,27 mg GAE/g pf. La concentración de compuestos fenólicos totales en el zumo fue aproximadamente la mitad que en la manzana entera. Como ya ha sido descrito en otros estudios (**15**) durante la obtención del zumo manzana, la mayor parte de los compuestos fenólicos (92%) que se encuentran en la pulpa y la piel de la manzana se quedan en el bagazo.

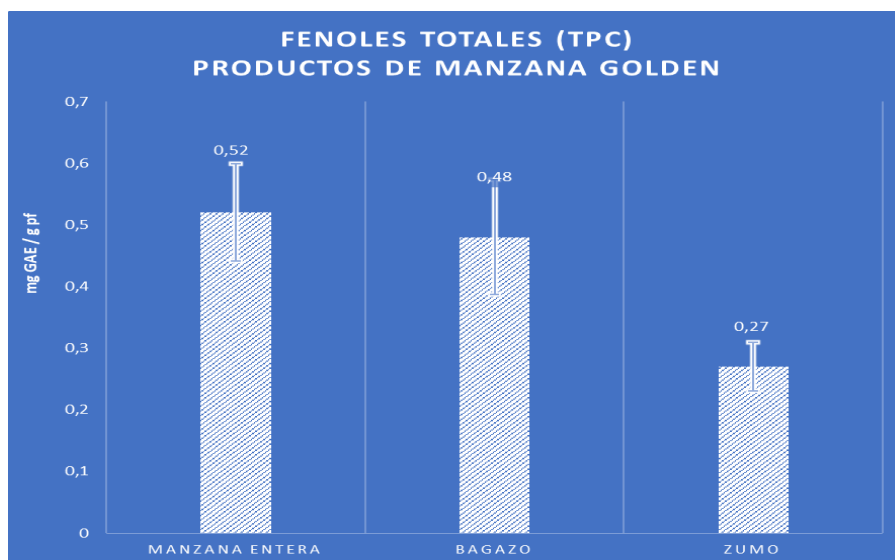
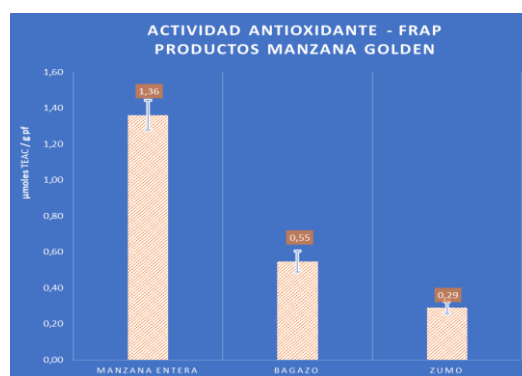
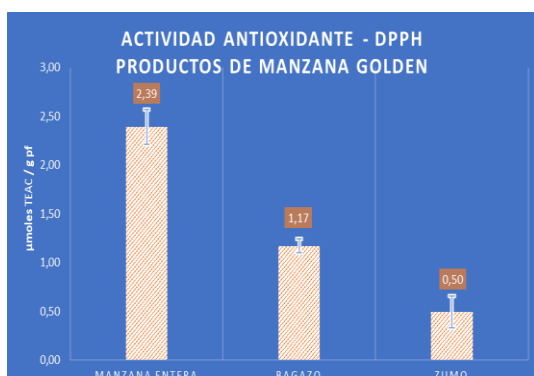


Figura 9. Compuestos fenólicos totales en los distintos productos implicados en la obtención de un zumo de manzana 'Golden Delicious' (manzana entera, bagazo y zumo).

La capacidad antioxidante determinada en manzana 'Golden Delicious' entera y en su correspondiente zumo y bagazo, se muestra en las **Figuras 10** (DPPH[•]) y **11** (FRAP). Los resultados siguen una tendencia similar a lo observado en la medida de compuestos fenólicos totales. Así, la manzana entera presentó la mayor capacidad antioxidante de los tres productos estudiados con un valor de 2,39 μ moles TEAC/g pf obtenido por el método FRAP y de 1,36 μ moles TEAC/g pf por el método DPPH[•]. Por otro lado, el zumo fue el producto que presentó la capacidad antioxidante más baja con un valor de 0,5 μ moles TEAC/g pf por el método FRAP y de 0,29 μ moles TEAC/g pf obtenido por el método DPPH[•].



Figuras 10 y 11. Capacidad antioxidante en los distintos productos implicados en la obtención de un zumo de manzana Golden Delicious (manzana entera, bagazo y zumo) determinada por el método DPPH[•] (Figura 10) y FRAP (Figura 11)

6.3. Efecto de la estabilización de bagazo de manzana mediante distintos tipos de secado sobre los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

En el presente trabajo se estudió el efecto de distintos tipos de secado (estufa y dos tipos de liofilización) sobre los compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de bagazo obtenido de manzana 'Golden Delicious' con el fin de determinar el procedimiento de secado más adecuado para estabilizar los bagazos y permitir su conservación a largo plazo.

En la **Figura 12** se observa que la concentración de compuestos fenólicos totales aumentó en todos los métodos de secado ensayados en comparación con el bagazo fresco (todos los datos referidos a peso seco). Se observó un aumento del 42% en el bagazo secado con estufa y un 34% tanto en el secado por liofilización B como por liofilización E con respecto a la muestra de bagazo inicial fresco. Esto puede ser debido a que los métodos de secado pueden favorecer la extracción de compuestos bioactivos (22) y a que las muestras secas presentan una mayor homogeneidad que la muestra de bagazo fresca en el momento de realizar la toma de muestra para hacer la extracción. Por otro lado, se ha descrito que tiempos prolongados y las altas temperaturas de un secado por estufa pueden causar efectos negativos sobre las propiedades microestructurales y la degradación de los compuestos bioactivos (23) (24).

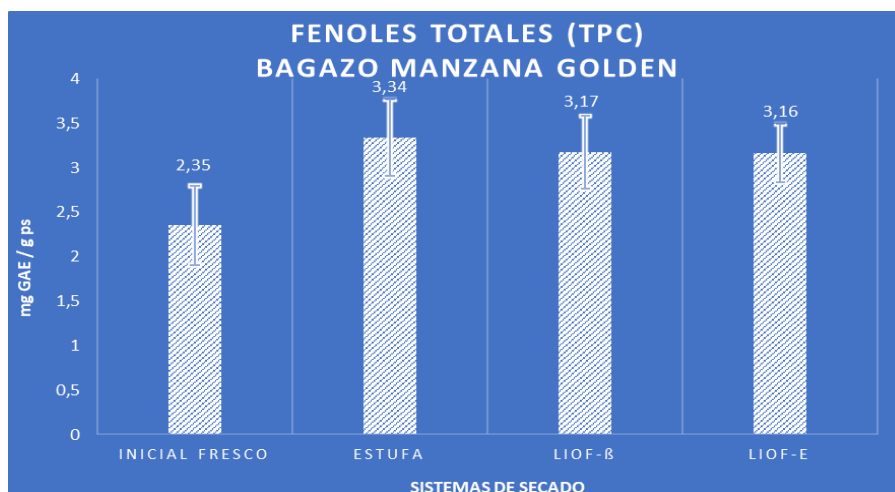
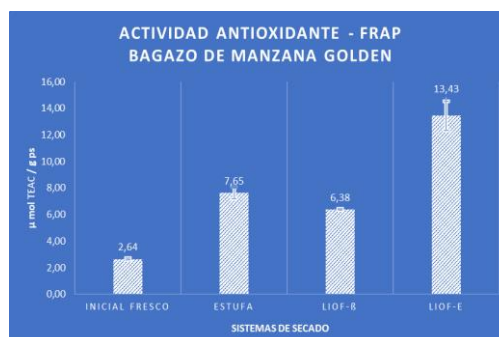
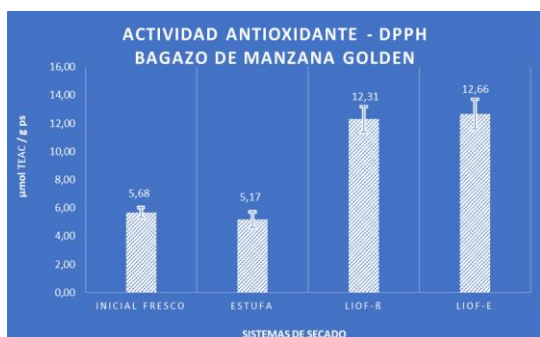


Figura 12. Efecto de distintos tipos de secado sobre los compuestos fenólicos totales de bagazo obtenido a partir de manzana 'Golden Delicious'.

Las **Figuras 13 y 14** muestran el efecto de distintos tipos de secado sobre la capacidad antioxidante del bagazo de manzana 'Golden Delicious' determinada por el método DPPH• (**Figura 13**) y FRAP (**Figura 14**). Al igual que lo observado con los compuestos fenólicos totales, los dos tipos de liofilización ensayadas (B y E) mostraron un incremento significativo de la capacidad antioxidante (DPPH• y FRAP) respecto al bagazo fresco. Así, la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH• se incrementó 2 veces con ambas liofilizaciones B y E respecto al bagazo fresco, mientras que la muestra secada en estufa sufrió una disminución no significativa del 9% (**Figura 13**).



Figuras 13 y 14. Efecto de distintos tipos de secado sobre la capacidad antioxidante de bagazo obtenido de manzana 'Golden Delicious' determinada por el método DPPH• (**Figura 13**) y FRAP (**Figura 14**).

También la capacidad antioxidante determinada por el método FRAP se incrementó significativamente 3, 2,5 y 5 veces con el secado en estufa y por liofilización B y E, respectivamente, en comparación con el bagazo fresco (**Figura 14**). Por tanto, el método de secado que dio lugar a los mejores resultados en términos de concentración de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante fue el secado por liofilización, tanto B como E.

6.4. Efecto de la extracción asistida por ultrasonidos con disolventes verdes sobre los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de bagazo de manzana. Comparación con una extracción convencional

La **Figura 15** muestra el efecto de la extracción convencional por agitación magnética del bagazo de manzana 'Golden Delicious' secado por liofilización B con distintos tipos de disolventes: metanol/agua (80:20, v/v) y dos mezclas de etanol/agua (80:20 y 50:50, v/v). Se ha seleccionado como disolvente el etanol por ser considerado un disolvente verde. El disolvente que consiguió la mayor concentración de compuestos fenólicos totales fue MeOH/agua (80:20) (4,47 mg GAE/g ps) en comparación con EtOH/agua (80:20) (2,91 mg GAE/g ps) y EtOH/agua (50:50) (3,17 mg GAE/g ps). Si bien MeOH/agua (80:20) es conocido como un buen disolvente para la extracción de compuestos fenólicos (27), el metanol se ha identificado como un disolvente perjudicial para el medio ambiente y por esta razón se han estudiado en este trabajo la efectividad de otros disolventes considerados verdes como son las distintas combinaciones de etanol con agua ensayadas. De las dos mezclas de etanol/agua ensayadas, se observó que EtOH/agua (50:50) consiguió un extracto con una concentración de compuestos fenólicos (3,17 mg GAE/g ps) que fue un 10% mayor que en el extracto de EtOH/agua (80:20) (2,91 mg GAE/g ps), si bien no se observaron diferencias significativas entre ambos extractos (**Figura 15**). Se seleccionó como disolvente para los ensayos de extracción asistida por ultrasonidos EtOH/agua (50:50).

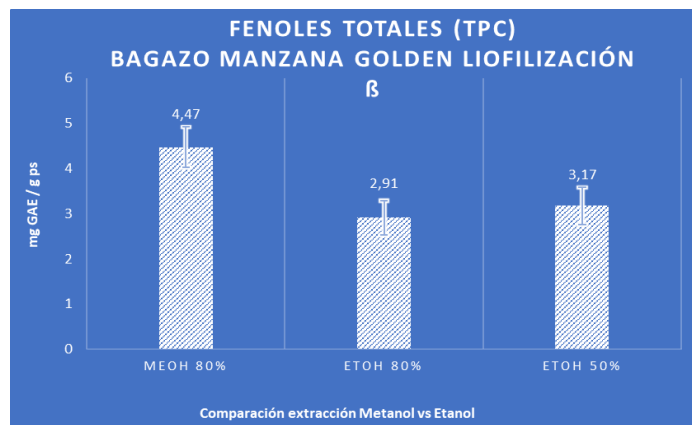


Figura 15. Extracción tradicional sólido-líquido por agitación magnética de compuestos fenólicos totales de bagazo de manzana 'Golden Delicious' con distintos tipos de disolventes

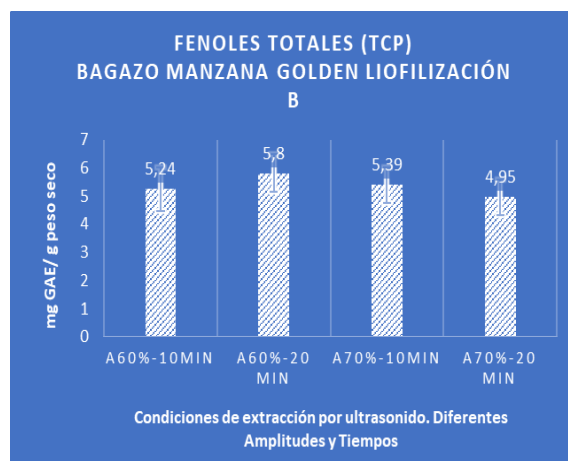


Figura 16. Extracciones asistidas por ultrasonidos de bagazo de manzana 'Golden Delicious' secada por liofilización B y utilizando como disolvente EtOH/agua (50:50): compuestos fenólicos totales

Una vez seleccionado el disolvente verde a utilizar, etanol/agua (50:50, v/v), se ensayaron distintas condiciones del proceso de extracción asistida por ultrasonidos. En función de estudios previos del grupo de investigación, se seleccionaron dos amplitudes (A60% y A70%) y dos tiempos de extracción (10 y 20 min), por lo que los tratamientos ensayados fueron cuatro: 1) 60%A-10min; 2) 60%A-20 min; 3) 70%-10 min; 4) 70%-20 min.

En la **Figura 16** se muestran los valores de compuestos fenólicos totales obtenidos con las cuatro proceso de extracción asistida por ultrasonidos ensayados. Se observó que se

obtuvieron mejores resultados con A60% que con A70%. Por otro lado, se obtuvieron resultados similares con el tratamiento A60%-10 min (5,4 mg GAE/ g ps) y con A60%-20 min (5,8 mg GAE/ g ps) (**Figura 16**).

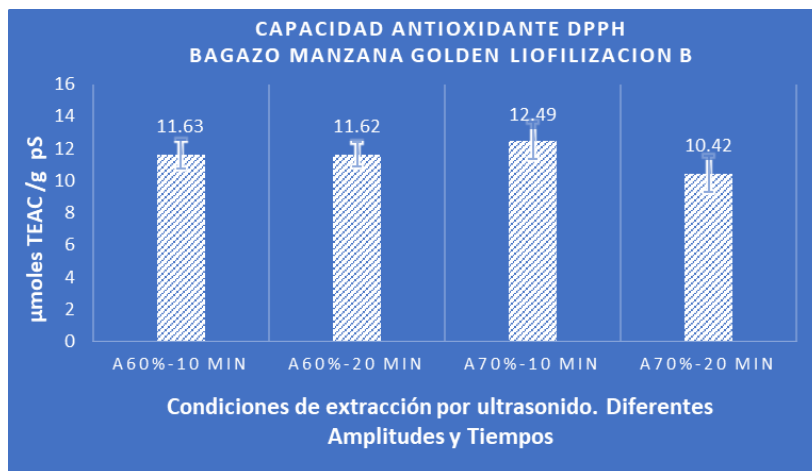


Figura 17. Extracciones asistidas por ultrasonidos de bagazo de manzana 'Golden Delicious' secada por liofilización B y utilizando como disolvente EtOH/agua (50:50): capacidad antioxidante DPPH•

En la **Figura 17** se muestran los valores de capacidad antioxidante de los extractos obtenidos con las distintas condiciones de extracción por ultrasonidos ensayadas. En línea con lo observado con los fenoles totales, los valores obtenidos con la A60% a distintos tiempos de tratamiento, 10 y 20 min, fueron muy similares (~11,62 μmoles TEA/g ps). Si bien el valor de DPPH• del extracto obtenido a 70%-10 min es un 7% mayor que los obtenidos con A60%, la diferencia no fue significativa.

En función de los resultados obtenidos, las condiciones de extracción por ultrasonidos seleccionadas fueron A60%-20 min para los siguientes ensayos con alta presión hidrostática como pre-tratamiento de los bagazos de manzana.

Si comparamos los resultados obtenidos con la extracción asistida por ultrasonidos seleccionada (A60%-20 min) (EAU) con los de una extracción convencional con agitación magnética de bagazo de manzana 'Golden Delicious' utilizando en ambos casos EtOH/agua (50:50), se observó un incremento de la extracción de compuestos fenólicos de un 83% con la EAU (**Figura 18**). También la capacidad antioxidante por el método FRAP fue 3,5 veces mayor en la EAU (28 μmoles TEAC /g ps) que en

extracción convencional (8 $\mu\text{moles TEAC/g ps}$). Sin embargo, la capacidad antioxidante por el método DPPH[•] fue similar (12 $\mu\text{moles TEAC/g ps}$) en los extractos obtenidos con los dos tipos de extracciones.

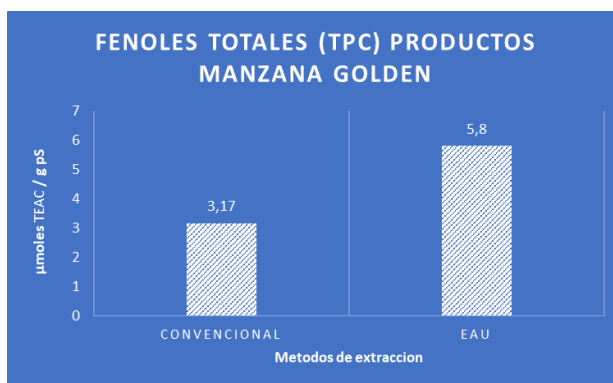


Figura 18. Concentración de compuestos fenólicos totales en extractos obtenidos a partir de bagazo de manzana 'Golden Delicious' por extracción convencional con agitación magnética y con extracción asistida por ultrasonidos (A60%-20 min) utilizando como disolvente EtOH/agua (50:50).

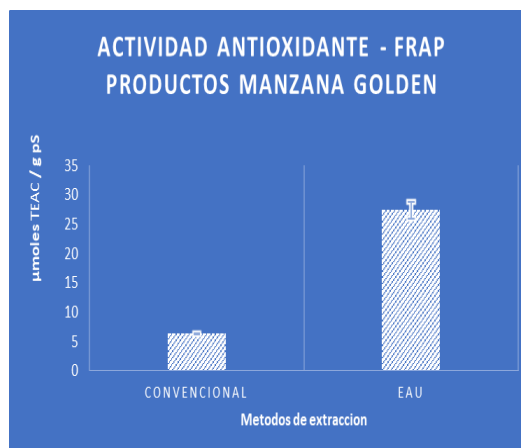
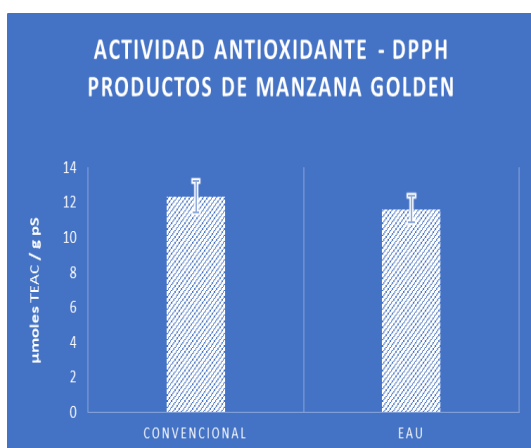


Figura 19 y 20. Capacidad antioxidante por el método DPPH[•] (Figura 19) y FRAP (Figura 20) en extractos obtenidos a partir de bagazo de manzana 'Golden Delicious' por extracción convencional con agitación magnética y con extracción asistida por ultrasonidos (A60%-20 min) utilizando como disolvente EtOH/agua (50:50).

6.5. Efecto de la combinación de alta presión hidrostática y extracción asistida por ultrasonidos sobre los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de bagazo de manzana

Una vez seleccionado el disolvente, EtOH/agua (50:50) y las condiciones de la extracción asistida por ultrasonidos (A60%-20 min) teniendo en cuenta los mejores resultados, se estudió el efecto de un pre-tratamiento por alta presión hidrostática a 200 MPa/25°C/5 min aplicado al bagazo de manzana sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante. Este estudio se realizó con bagazos obtenidos de distintas variedades de manzana: 'Golden Delicious', 'Pink Lady' y 'Granny Smith'.

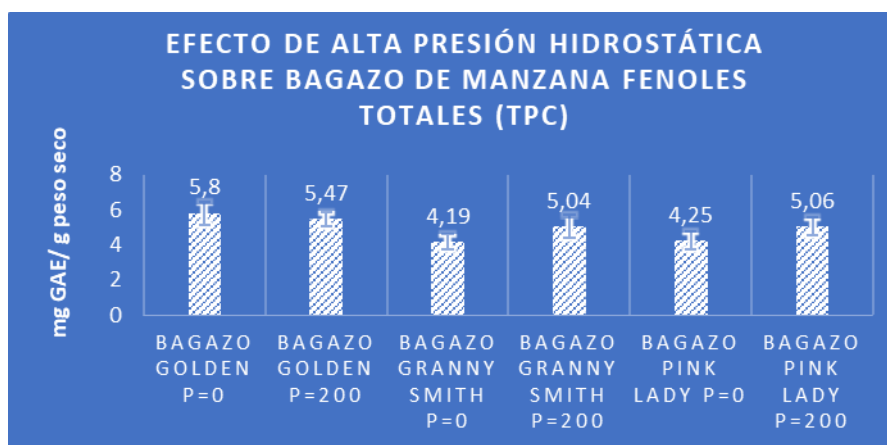
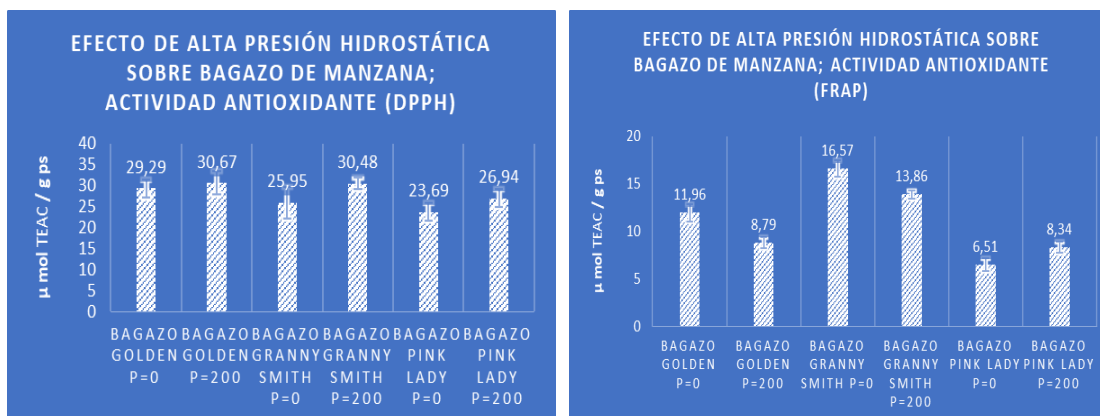


Figura 21. Efecto del pre-tratamiento por altas presiones hidrostáticas (200 MPa/25°C/5 min) sobre bagazos obtenidos de distintas manzanas ('Golden Delicious', 'Granny Smith' y 'Pink Lady'): compuestos fenólicos totales.

La **Figura 21** muestra que el pre-tratamiento a 200 MPa/25 °C/5 min de los bagazos de manzanas 'Granny Smith' y 'Pink Lady' incrementó la extracción de compuestos fenólicos aproximadamente un 20% en comparación con los extractos de los bagazos no presurizados (P=0). Sin embargo, el tratamiento de alta presión hidrostática no modificó la concentración de compuestos fenólicos extraídos del bagazo de manzana 'Golden Delicious'.



Figuras 22 y 23. Efecto del pre-tratamiento por altas presiones hidrostáticas (200 MPa/25°C/5 min) sobre bagazos obtenidos de distintas manzanas ('Golden Delicious', 'Granny Smith' y 'Pink Lady'): capacidad antioxidante DPPH• y FRAP.

La misma tendencia se observó para la capacidad antioxidante medida por el método DPPH• (Figura 22). Así, en los bagazos 'Granny Smith' y 'Pink Lady', el tratamiento de alta presión incrementó el valor de DPPH• un 17,5% y un 14%, respectivamente, en comparación con los respectivos bagazos sin tratar (P=0). Sin embargo, la capacidad antioxidante medida por el método FRAP descendió en los bagazos de 'Golden Delicious' y 'Granny Smith' aproximadamente un 26% y 16%, respectivamente, pero aumentó un 28% en 'Pink Lady'. Estos resultados muestran que el pre-tratamiento por alta presión hidrostática (200 MPa/25°C/5min) favoreció el incremento de la extracción de compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante en algunos de los bagazos estudiados probablemente debido a un aumento de la permeabilidad celular o cambios en la microestructura del tejido vegetal que favorece la liberación de compuestos bioactivos (20), si bien este efecto depende de la matriz vegetal sobre la que actúe la presión, es decir, en el presente trabajo, de la variedad de manzana de la que se obtuvo el bagazo. Por otro lado, el descenso en la concentración de compuestos fenólicos y de la capacidad antioxidante observados en algunos de los bagazos estudiados puede ser debido a la presencia de niveles de actividad enzimática polifenoloxidasa y peroxidasa residual muy altos que dan lugar a la degradación de los compuestos fenólicos u otros compuestos antioxidantes presentes en el bagazo.

7. CONCLUSIONES

1- Durante el proceso de obtención de zumo de manzana, aproximadamente el 92% del contenido de fenoles totales y entre el 40-49% de la capacidad antioxidante de la manzana entera con piel permanecen en el bagazo.

2- Como método de secado se ha seleccionado la liofilización que dio lugar al incremento de 34% en la concentración de compuestos fenólicos y al aumento de 2 veces la capacidad antioxidante del bagazo fresco.

3- Se ha seleccionado como disolvente verde la mezcla de etanol/agua (50:50) si bien se obtuvieron mejores resultados con metanol/agua (80:20), cuyo uso se intenta sustituir por ser considerado un disolvente contaminante.

4- De entre los procesos de extracción asistida por ultrasonidos ensayados se ha seleccionado las condiciones de 60% de amplitud y 20 min de tratamiento por ser los parámetros de proceso que mejores resultados dieron en términos de extracción de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.

5- La extracción asistida por ultrasonidos incrementó la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante un 83% y 3,5 veces, respectivamente, comparada con la extracción convencional por agitación magnética utilizando en ambos casos etanol/agua (50:50).

6- El pre-tratamiento a 200 MPa/25 °C/5 min de los bagazos de manzanas 'Granny Smith' y 'Pink Lady' incrementó un 20% y ~16% la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, respectivamente, comparado con el bagazo sin presurizar. Este incremento no se observó en los bagazos de manzanas 'Golden Delicious'.

Como conclusión general, podemos decir que la manera más eficiente de obtener extractos ricos en compuestos fenólicos y capacidad antioxidante a partir de bagazos de manzana es mediante el empleo de la técnica de extracción asistida por ultrasonidos (UAE). El uso de esta técnica, en combinación con la utilización de disolventes ecológicos como el etanol/agua, resultaría en una menor repercusión ambiental del procedimiento de extracción. Además, la utilización simultánea de los procesos de alta presión y ultrasonidos posibilita un aumento de la extracción de compuestos fenólicos totales y de capacidad antioxidante, si bien depende del

material de partida y de la selección adecuada de las variables del proceso. Por lo tanto, es fundamental resaltar que para cada material de partida objeto de investigación, se deben optimizar las variables del proceso, como el disolvente empleado y las condiciones del tratamiento mediante ultrasonidos y alta presión hidrostática.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Martău, G.A., Teleky, B., Ranga, F., Pop, I., & Vodnar, D.C. (2021). Apple Pomace as a Sustainable Substrate in Sourdough Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 12.
2. Porter, S., Reay, D. S., Bomberg, E., & Higgins, P. D. (2018). Avoidable food losses and associated production-phase greenhouse gas emissions arising from application of cosmetic standards to fresh fruit and vegetables in Europe and the UK. *Journal of Cleaner Production*, 201, 869-878.
3. ONU (Organización de las Naciones Unidas) (2015): Objetivos de desarrollo sostenible (ODS). En: <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/> (junio 2023).
4. Martharu, A.S., de Melo, E.M., Houghton, J. (2016). Opportunity for high value-added chemicals from food supply chain wastes. *Bioresource Technology*. 215, 123–130.
5. Lyu, F., Luiz, S.F., Azeredo, D.R.P., Cruz, A.G., Ajlouni, S., Ranadheera, C.S. (2020). Apple Pomace as a Functional and Healthy Ingredient in Food Products: A Review. *Processes*, 8(3), 319.
6. Ferrentino, G., Giampiccolo, S., Morozova, K., Haman, N., Spilimbergo, S., Scampicchio, M. (2020). Supercritical fluid extraction of oils from apple seeds: Process optimization, chemical characterization, and comparison with a conventional solvent extraction (Vol. 64). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Volume 64, 102428.
7. USDA (U.S. Department of Agriculture) (2020): Nutrients FoodData Central. Apples, raw, with skin. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171688/nutrients>.
8. Croft, K.D., Bondonno, C.P., Ward, N.C., Hodgson, J. M. (2017). The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 69, 243–256.

9. Patocka, J., Bhardwaj, K., Klimova, B., Nepovimova, E., Wu, Q., Landi, M., Kuca, K., Valis, M., Wu, W. (2020). Malus domestica: A review on nutritional features, chemical composition, traditional and medicinal value. *Plants*, 9(11), 1408.
10. González-Talice, J., Yuri, J. A., del Pozo, A. (2013). Relations among pigments, color and phenolic concentrations in the peel of two Gala apple strains according to canopy position and light environment. *Scientia Horticulturae*, 151, 83–89.
11. Musacchi, S., Serra, S. (2018): Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234, 409–430.
12. Rothwell, J.A., Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Medina-Remón, A., M'hiri, N., García-Lobato, P., Manach, C., Knox, C., Eisner, R., Wishart, D.S., Scalbert, A. (2013). Phenol-Explorer 3.0: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. *Database*, 2013(0), bat070.
13. Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531–2548.
14. Awad, M.A., de Jager, A., van Westing, L. M. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae*, 83(3–4), 249–263.
15. Bondonno, N.P., Bondonno, C.P., Ward, N.C., Hodgson, J.M., Croft, K. D. (2017): The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 243–256.
16. Rashid, R., Wani, S.A., Manzoor, S., Masoodi, F.A., Dar, M. J. (2023). Green extraction of bioactive compounds from apple pomace by ultrasound assisted natural deep eutectic solvent extraction: Optimization, comparison and bioactivity. *Food Chemistry*, 398, 133871.
17. Bohn, T. (2014): Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429–452.
18. Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531–2548.

19. Balasubramaniam, V.M., Barbosa-Cánovas, G.V., Lelieveld, H. L. (2016): High Pressure Processing of Food. Principles, Technology and Applications. Food Engineering Series, Springer New York.
20. Navarro-Baez, J.E., Martínez, L.M., Welti-Chanes, J., Buitimea-Cantúa, G.V., Escobedo-Avellaneda, Z. (2022). High Hydrostatic Pressure to Increase the Biosynthesis and Extraction of Phenolic Compounds in Food: A Review. *Molecules*, 27(5), 1502. <https://doi.org/10.3390/molecules27051502>
21. Spolmann, O., Nocetti, D., Zura-bravo, L., Lemus-Mondaca, R. (2020) Efectos del secado de ventanas™ de refractancia asistida por infrarrojos en la cinética de secado, microestructura y color del puré de fruta de Physalis. *Alimentos*, 9, 343.
22. Ladha-Sabur, A., Bakalis, S., Freidora, P.J., Lopez-Quiroga, E. (2019). Mapping energy consumption in food manufacturing. *Chemical Engineering*, 86, 270–280.
23. Cardoso, M.A.P., Haminiuk, C.W.I., Pedro, A.C., Fernandes, I.D.A.F., Yamato, M.A.C., Maciel, G.M., Do Prado, I.N. (2021). Biological effects of Goji berry and the association with new industrial applications: A review. *Food Reviews International* Nov 2021 (early access).
24. Ozay-Arancioğlu, I., Bekiroğlu, H., Karadağ, A., Saroğlu, O., Tekin-Çakmak, Z.H., Karasu, S. (2022). Effect of different drying methods on the bioactive, microstructural, and in-vitro bioaccessibility of bioactive compounds of the pomegranate arils. *Food Science and Technology*, 42, e06221.
25. Wojdyło, A., Figiel, A., Legua, P., Lech, K., Carbonell-Barrachina, Á.A., Hernández, F. (2016). Composición química, capacidad antioxidante y calidad sensorial de frutos secos de azufaifo afectados por cultivar y método de secado. *Química de alimentos*, 207, 170–179.
26. Basunia, M., Abe, T. (2001). Thin-layer solar drying characteristics of rough rice under natural convection. *Journal of Food Engineering*, 47, 295–301.
27. Restrepo-Sánchez, D., Narváez-Cuenca, C., & Restrepo-Sánchez, L. (2009). Extracción de compuestos con actividad antioxidante de frutos de guayaba cultivada en Vélez-Santander, Colombia. *Química Nova*, 32(6), 1517–1522.
28. Mason, T.J., Paniwnyk, L., Lorimer, J.P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3 (3), 253–260.
29. Herrera, M.C., Luque de Castro, M.D. (2004). Ultrasound-assisted extraction for the analysis of phenolic compounds in strawberries. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379 (7–8), 1106–1112.

30. Delgado, J. (2012). Aplicación del Ultrasonido en la Industria de los Alimentos. *Revista Especializada en Ingeniería de Procesos en Alimentos y Biomateriales*, 6, 141–152.
31. Vinatoru, M., Toma, M., Radu, O., Filip, P.I., Lazurca, D., Mason, T.J. (1997). The use of ultrasound for the extraction of bioactive principles from plant materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 4 (2), 135–140.