



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN Y
TEMPERATURA DE ATOMIZACIÓN DE UN
LICUADO DE POMELO PARA LA OBTENCIÓN
DE UN POLVO DE ALTA CALIDAD Y
ESTABILIDAD**

TESIS DOCTORAL

Freddy Javier González Zamora

Dirigida por:

Dra. Nuria Martínez Navarrete
Dra. María del Mar Camacho Vidal

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA
Departamento de Tecnología de Alimentos
Valencia, 23 de enero del 2019



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Dña. Nuria Martínez Navarrete, Doctora en Ciencias Biológicas, Catedrática de la Universidad Politécnica de Valencia, y Dña. María del Mar Camacho Vidal, Doctora en Ciencias Químicas por la Universidad Politécnica de Valencia, Catedrática de la Universidad Politécnica de Valencia,

CERTIFICAN que

Don. Freddy Javier González Zamora, Ingeniero Industrial, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo que con el título “Optimización de la formulación y temperatura de atomización de un licuado de pomelo para la obtención de un polvo de alta calidad y estabilidad”, presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 16 de Noviembre de 2018.

Fdo. Nuria Martínez Navarrete

Directora de Tesis

Fdo. María del Mar Camacho Vidal

Directora de Tesis

“No dejes apagar el entusiasmo, virtud tan valiosa como necesaria; trabaja, aspira, tiende siempre hacia la altura”. **Rubén Darío**

A mi familia

A Miguel Ángel Utrillas

Agradecimientos

A mi madre Martha Zamora, por soportar todos estos años mi ausencia y apoyarme en todas mis ambiciones; a mi padre Félix González que me alentó en la distancia a que continuara sin mirar atrás, son los pilares de mis valores y carácter, este sueño es de ustedes también.

A mi hermano José David, por el cariño y confianza que ha depositado en mí; mi hermana Margarita por regalarnos a nuestra alegría de casa, nuestro corazón Yaretzi.

A Miguel Ángel Utrillas por demostrarme todos estos años que los límites los marcamos nosotros mismos, por confiar en mí y consentirme como un hijo, demostrando que los lazos no siempre son de sangre, también se llevan en el corazón.

A mis directoras de tesis, Nuria Martínez Navarrete y María del Mar Camacho, por apoyarme en esta etapa de mi vida, sin sus ideas y conocimientos, nada de esto fuera posible, gracias por su tiempo y dedicación.

A los compañeros del equipo de investigación por compartir este tiempo conmigo, a los miembros del grupo de investigación por su ayuda en la culminación de esta etapa.

A Francisca Rodrigues y al grupo REQUIMTE de la facultad de Farmacia en la Universidad de Oporto por su tiempo y dedicación durante mi investigación.

A todos los amigos que he creado durante mi tiempo en España, los Forner-Östegard, Nadal-Cerezuela, Montanes, Arribas-Ríos, Pérez-Rimalova, Casas, Utrillas, Egas, Plaza, Aragón, Chamul, Rivera, Aragón etc., y todos aquellos que me apoyan desde lejos, López, Centeno, Cordero, Cruz, Arburola, etc., a todos ellos gracias.

A todos los jóvenes Nicaragüenses que fueron víctimas a partir de Abril del 2018, quienes me inspiraron en este último esfuerzo por concluir un sueño, por creer en la libertad de pensamiento, sus vidas y su futuro es ser recordados como los iniciadores de una nueva revolución.

Gracias a todos los que formaron parte de esta inolvidable experiencia. Gracias por todo.

RESUMEN

La tendencia alimentaria actual indica que el consumo diario de frutas y verduras es parte fundamental de una dieta saludable. El formato de fruta deshidratada en polvo aumenta la vida útil del producto, además de ofrecer otras ventajas relacionadas con el menor espacio necesario para su transporte y almacenamiento. En la medida en que el proceso utilizado para la obtención del polvo mantenga estable la calidad de la fruta, incluido su valor funcional, ésta podría ser otra forma de ofrecer al consumidor. En este trabajo se ha estudiado el impacto de la incorporación de distintos biopolímeros en algunas propiedades de un polvo de pomelo obtenido por atomización, con el fin de seleccionar el mejor de ellos, así como su estabilidad y viabilidad como nutracéutico.

Para ello, se ha trabajado con diferentes mezclas de goma arábiga (GA), carboximetilcelulosa (CMC), maltodextrina (MD), un asilado de proteína de suero de leche (WPI) y almidón modificado con anhídrido octenil succínico (OSA). A todos los productos atomizados obtenidos se les ha estudiado, además del rendimiento del proceso, la humedad, porosidad y color del polvo obtenido. Además, en algunos casos, se ha analizado también la actividad antioxidante, el contenido de vitamina C y en fenoles totales. Los resultados obtenidos de esta parte del estudio no recomiendan el uso de CMC, ni sola ni combinada con GA pues, si bien mejora las propiedades del producto obtenido, disminuye el rendimiento del proceso. Por otra parte, la utilización de OSA en la formulación del pomelo en polvo, aunque parece interesante porque permite obtener polvos más porosos, más secos y con mayor contenido en vitamina C, disminuye el rendimiento y el contenido en compuestos fenólicos con respecto a las formulaciones preparadas con los otros biopolímeros. Los resultados de esta parte del estudio permiten proponer, como condiciones para la obtención del mejor producto, preparar el licuado de pomelo añadiendo, sin dilución previa, 9.4 g GA + 1.25 g MD + 1.4 g WPI/100 g licuado y atomizar a 148 °C. Con el producto en polvo obtenido se programó un estudio de almacenamiento para comprobar su estabilidad. Se estudió la evolución con el tiempo de la vitamina C, fenoles y licopeno, actividad antioxidante, color y propiedades mecánicas del polvo, expuesto o no a la luz y a diferentes humedades relativas. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la gran inestabilidad de los carotenoides y recomiendan, para asegurar la fluidez del polvo y la estabilidad del color, de la vitamina C y de la

capacidad antioxidante durante al menos 6 meses, almacenar el producto a una humedad relativa $\leq 23.1\%$ si la temperatura es de 20 °C.

Finalmente, para estudiar la viabilidad del producto en polvo obtenido como nutraceutico, se realizo un estudio de biodisponibilidad de los compuestos bioactivos a traves de un modelo intestinal 3D con la combinacion de lineas celulares Caco-2 y HT29-MTX. Los compuestos bioactivos asimilados teoricamente por el sistema digestivo fueron identificados por cromatografia liquida, electro-espray, ionizacion de espectrometria de masas (LC-ESI-MS). La delfinidina-3-glucosido y la hesperitina-7-O-glucosido presentaron una permeacion superior al 50%, seguida de la hesperidina que se aproximó al 30%. Este trabajo permitió establecer que la formulacion del polvo de pomelo propuesta tiene un gran potencial como nutraceutico.

ABSTRACT

The current food trend indicates that the daily consumption of fruits and vegetables is a fundamental part of a healthy diet. The dried fruit powder format increases the product's shelf-life, in addition to offering other advantages related to the lower volume and easier handle required for its transport and storage. To the extent that the process used to obtain the powder retains the quality of the fruits, including its functional value, this could be another way of offer fruit to the consumer. In this study, the impact of the incorporation of different biopolymers on some properties of a powdered grapefruit obtained by spray-drying, in order to select the best of them, as well as the powder stability and viability as a nutraceutical, has been considered.

To this end, different mixtures of gum Arabic (GA), carboxymethylcellulose (CMC), maltodextrin (MD), whey protein isolate (WPI) and octenyl succinic anhydride modified-starch (OSA) have been tested. To all the obtained spray dried products, besides the process yield, the water content, porosity and color were analyzed. In addition, in some cases, antioxidant activity, vitamin C and total phenols content have also been analyzed. The results obtained from this part of the study do not recommend the use of CMC, either alone or combined with GA, because, although it improves the properties of the obtained product, the process yield decreases. On the other hand, the use of OSA in the grapefruit powder formulation, although it seems interesting because it allows to obtain more porous and dried powders, with a higher vitamin C content, it decreases the yield and the content of phenolic compounds with respect to the formulations prepared with the other biopolymers. The results of this part of the study allow us to propose, in order to obtain the best product, to prepare the liquidized grapefruit by adding, without previous dilution, 9.4 g GA + 1.25 g MD + 1.4 g WPI/100 g liquidized and spray-drying at 148 °C. With the obtained powdered product, a storage study was scheduled to check its stability. The evolution over time of vitamin C, total phenols, lycopene, antioxidant activity, color and mechanical properties of the powder, exposed or not to light and at different relative humidities, were studied. The obtained results showed the great instability of the lycopene and recommend, to ensure the powder flowability and the color, vitamin C and antioxidant capacity stability for at least six months, to store the product at a relative humidity ≤ 23.1 % if the temperature is 20 °C.

Finally, to study the viability of the powdered product as a nutraceutical, the bioavailability of the bioactive compounds was analyzed through a 3D intestinal model with the combination of cell lines Caco-2 and HT29-MTX. The bioactive compounds assimilated theoretically by the digestive system were identified by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). Delphinidin-3-glucoside and hesperetin-7-*O*-glucoside showed a permeation greater than 50%, followed by hesperidin that approached to 30%. This study allowed to establish that the proposed grapefruit powder formulation has a great potential as a nutraceutical.

RESUM

La tendència alimentària actual indica que el consum diari de fruites i verdures és part fonamental d'una dieta saludable. El format de fruita deshidratada en pols augmenta la vida útil del producte, a més d'oferir altres avantatges relacionades amb el menor espai necessari per al seu transport i emmagatzemament. En la mesura que el procés utilitzat per a l'obtenció de la pols mantinga estable la qualitat de la fruita, inclòs el seu valor funcional, esta podria ser una altra forma d'oferir fruita al consumidor. En este treball s'ha estudiat l'impacte de la incorporació de distints biopolímers en algunes propietats d'una pols de pomelo obtingut per atomització, a fi de seleccionar el millor d'ells, així com l'estabilitat i la viabilitat del producte com nutraceutic.

Per açò, s'ha treballat amb diferents mescles de goma aràbiga (GA), carboximetilcel·lulosa (CMC), maltodextrina (MD), un aïllat de proteïna de sèrum de llet (WPI) i almidó modificat amb anhidrid octenil succínic (OSA). Amb tots els productes atomitzats obtinguts s'ha estudiat, a més del rendiment del procés, la humitat, porositat i color de la pols obtinguda. A més a més, en alguns casos, s'ha analitzat també l'activitat antioxidant, el contingut en vitamina C i en fenols totals. Els resultats obtinguts d'aquesta part de l'estudi no recomanen l'ús de CMC, ni sola ni combinada amb GA doncs, si bé millora les propietats del producte obtingut, disminueix el rendiment del procés. D'altra banda, la utilització d'OSA en la formulació del pomelo en pols, encara que sembla interessant perquè permet obtenir pols més porosos, més secs i amb un major contingut en vitamina C, disminueix el rendiment i el contingut en compostos fenòlics pel que fa a les formulacions preparades amb els altres biopolímers. Els resultats d'aquesta part de l'estudi permeten proposar, com a condicions per a la obtenció del millor producte, preparar el líquid de pomelo afegint, sense dilució prèvia, 9.4 g GA + 1.25 g MD + 1.4 g WPI/100 g líquid i atomitzar a 148 °C. Amb el producte en pols obtingut es programà un estudi d'emmagatzematge per a comprovar la seua estabilitat. S'estudià la evolució, amb el temps, de la vitamina C, fenols, licopen, activitat antioxidant, color i propietats mecàniques de la pols, exposat o no a la llum i a diferents humitats relatives. Els resultats obtinguts posen de manifest la gran inestabilitat del licopen i recomanen, per a assegurar la flotabilitat de la pols i l'estabilitat del color, de la vitamina C i de la capacitat antioxidant durant almenys 6 mesos, emmagatzemar el producte a una humitat relativa $\leq 23.1\%$ si la temperatura és de 20 °C.

Finalment, per a estudiar la viabilitat del producte en pols com nutraceútic, s'analitzà la biodisponibilitat dels compostos bioactius a través d'un model intestinal 3D amb la combinació de línies cel·lulars Caco-2 i HT29-MTX. Els compostos bioactius assimilats teòricament pel sistema digestiu van ser identificats per cromatografia líquida electro-sprai, ionització d'espectro-materia de masses. El delphinidin-3-glucoside i el hesperetin-7-O-glucoside mostren una permeabilitat superior al 50%, seguit de la hesperidina que s'aproximà al 30%. Aquest treball va permetre establir que la formulació de la pols de pomelo proposada té un gran potencial com a nutraceútic.

ÍNDICE

Introducción y objetivos.....	1
CAPÍTULO I. Estudio del impacto de la temperatura de atomización, goma arábica y carboximetilcelulosa en algunas propiedades físicas del pomelo atomizado.....	13
Impact of temperature, gum arabic and carboxymethyl cellulose on some physical properties of spray-dried grapefruit.....	15
CAPÍTULO II. Modificación de la formulación optimizada: ensayo con nuevos biopolímeros y su nivel de dilución.....	35
II.I. Uso combinado de goma arábica, carboximetilcelulosa, maltodextrina y aislado de proteína de suero de leche.....	38
II.II. Interés de incorporar almidón modificado con anhídrido octenil succínico.....	50
II.III. Estudio del efecto del nivel de dilución de los biopolímeros.....	61
CAPÍTULO III. Estabilidad de las propiedades físicas, los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del polvo de pomelo obtenido por atomización.....	77
Stability of physical properties, bioactive compounds and antioxidant capacity of spray dried grapefruit powder.....	79
CAPÍTULO IV. Desarrollo de un nutraceutico de pomelo obtenido mediante atomización. Caracterización física, composición química y permeabilidad intestinal 3D.....	105

Insights into the development of grapefruit nutraceutical powder by spray drying. Physical characterization, chemical composition and 3d intestinal permeability.....	107
Discusión general de los resultados.....	133
Conclusiones generales.....	141

INTRODUCCIÓN

Es de conocimiento general que una dieta rica en frutas y verduras es esencial para una buena salud, por su contenido en compuestos bioactivos que parecen contribuir a la prevención de algunas enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda una ingesta diaria aproximada, como norma general, de unos 200-250g/día para niños y 300-400g/día para adolescentes y adultos. Esta ingesta garantiza el suficiente consumo de micronutrientes, fibra dietética y compuestos antioxidantes que se requieren diariamente para evitar una malnutrición y satisfacer las necesidades nutricionales diarias. Además, se ha estimado que un consumo diario de esta cantidad aproximada de frutas y verduras podría salvar hasta 1.7 millones de vidas al año, ya que su ingesta está relacionada con la reducción del riesgo de padecer enfermedades crónicas tales como las cardiovasculares y cancerígenas (OMS, 2018).

Dentro del abanico de posibles frutas destacan los cítricos, que se encuentran entre las especies más cultivadas a nivel mundial debido a sus beneficios nutricionales y sus efectos beneficiosos para la salud (FAO, 2015). Los cítricos no sólo se cultivan por su alto contenido en vitamina C y/o nutrientes tales como carbohidratos, fibra, calcio, potasio, fósforo o vitamina B6, sino también por su alto contenido de múltiples metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, limonoides, carotenoides, ácidos fenólicos y aceites esenciales, que poseen una gran variedad de efectos fisiológicos antioxidantes, antiinflamatorios, antitumorales, disminución de la obesidad, etc. (Zhang et al., 2015). Existe una gran cantidad de documentación en la bibliografía que pone de manifiesto que muchos de estos compuestos están asociados con una importante reducción en el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, cáncer de colon, de pecho, pulmón, párkinson y esclerosis (Heiss et al., 2001).

Las diferentes especies del género citrus se cultivan en más de 140 países de clima tropical, subtropical y mediterráneo, alcanzando alrededor de 8,7 millones de hectáreas con una producción total estimada en 2012 de 130 millones de toneladas. El 60% de esta producción corresponde a las naranjas, seguido de un 20% por las mandarinas, entre un 11-12% por el grupo de los limones y limas y el 5-6% por los pomelos. China, Brasil, EEUU, India, México y España son los países que destacan sobre el resto, produciendo las dos terceras partes de la producción total (Lv et al., 2015).

No sólo los cítricos comúnmente conocidos, como la naranja y la mandarina, son de importancia económica. El pomelo (*C. paradisi*) ha experimentado un incremento en su producción del 1,6% desde el año 2010 al 2011, aumentando considerablemente su importancia económica entre los cítricos. Los mayores productores mundiales son los Estados Unidos,

Israel, Cuba y países situados a lo largo de la línea del Ecuador, con una producción de unos 5,5 millones de toneladas al año.

El origen del pomelo no se conoce con exactitud. Existen hipótesis que atribuyen su origen a Asia, mientras otras lo datan como un cruce natural producido entre el naranjo dulce y el pummelo en la isla Barbados (América Central) hace 300 años, extendiéndose por todo el Caribe y llevado a Florida (EEUU) por el conde francés Odette Philippe. En EEUU el investigador Richard Hensz obtuvo las dos variedades comerciales más importantes, Star Ruby y Rio Red (AILIMPO, 2017). Las variedades del pomelo se clasifican en función de la tonalidad del flavedo. Existen pues variedades blancas o comunes, como el pomelo blanco (Marsh seedleels o White Marsh) con alto contenido en zumo, y variedades pigmentadas con el flavedo de color rosa o rojizo entre las que cabe destacar la Star Ruby y Rio Red (Infoagro, 2017). Star Ruby es la variedad por excelencia dentro de las pigmentadas, de sabor más dulce y menos amargo. Es un hesperidio globoso de color rojizo en su flavedo también con un alto contenido en zumo, superior al de otras variedades. Aparte de su elevado contenido en zumo, la variedad Star Ruby posee un alto contenido en componentes bioactivos y una alta capacidad antioxidante, siendo una importante fuente de compuestos fitoquímicos, mayor que las especies blancas (Gorinstein et al., 2005; Vanamala et al., 2006). Nutricionalmente aporta vitamina A, que ayuda a mantener el buen estado de la visión, y hasta 40 mg de vitamina C por 100g, que ayuda a la formación de colágeno, huesos, dientes y glóbulos rojos, cumpliendo la ingesta mínima recomendada por la OMS. Estas dos vitaminas son además necesarias para ayudar a un buen funcionamiento del sistema inmunitario (EFSA, 2011).

Debido a los innumerables beneficios que proporcionan tanto las frutas como los vegetales y al incremento de la conciencia mundial sobre la salud humana, no es de extrañar que la industria alimentaria desarrolle nuevos productos que puedan satisfacer las necesidades e inquietudes del consumidor. Uno de los procesos que más se emplean en la industria alimentaria es la deshidratación, con el objetivo de reducir la cantidad de agua del producto, y por lo tanto su actividad del agua, lo que le confiere mayor estabilidad aumentando su corta vida útil. Además, al disminuir considerablemente la relación volumen/peso, el producto deshidratado final es de más fácil de manejo, con mayor facilidad para el transporte y almacenamiento, lo que le confiere un valor añadido fundamental en la cadena de distribución. Los productos deshidratados permiten ofrecer diferentes formatos de presentación para su consumo en forma de snack o en polvo, entre otros.

En la industria alimentaria existen diferentes métodos de deshidratación. Uno de ellos es el método de secado por medio de energía solar, comúnmente empleado para secar frutas y verduras, que ofrece un escaso control en el proceso de secado y un elevado riesgo de degradación del producto debido a reacciones bioquímicas que limitan significativamente su uso en el sector (Jiang et al., 2013). Asimismo, otro proceso que está ganando popularidad es la deshidratación asistida por microondas, debido a una reducción en los tiempos de proceso y a la obtención de alimentos deshidratados de alta calidad nutricional (Ozkan, 2007). Este sistema, que emplea energía electromagnética en un rango de frecuencia determinado, muestra el inconveniente de que requiere un control preciso del sistema de aplicación para evitar un sobrecalentamiento del producto que pudiera afectar a su calidad (Ghanem et al., 2012). Por su parte, la deshidratación por ultrasonidos es también una tecnología emergente que presenta la capacidad de inactivar microorganismos y enzimas sin la necesidad de aplicar alta temperatura ni presión al proceso, resultando muy apropiado pues para alimentos con constituyentes termolábiles como los vegetales (Cárcel et al., 2012). Dentro de los procesos de deshidratación cabe especial mención a la liofilización, un método de secado que elimina el agua del producto mediante un proceso de sublimación. Este cambio de estado del agua de sólido a gas, sin pasar por el estado líquido, asegura una alta calidad del producto seco, con muy buenas propiedades para su rehidratación, manteniendo al máximo sus propiedades organolépticas y con mínimas pérdidas en el valor nutricional en comparación con el producto en fresco. No obstante este proceso presenta el gran inconveniente de ser un proceso de larga duración, con exceso de empleo de energía, que se traduce en un elevado gasto económico (Ratti, 2001).

Otro método de secado muy empleado en la industria alimentaria es la atomización, procedimiento de referencia que no sólo tiene aplicación en la industria alimentaria sino también en industrias farmacéuticas y agroquímicas. Este método de secado consiste en la pulverización de un fluido en una corriente de aire muy caliente, provocando la evaporación del agua en un tiempo muy corto, con un efecto negativo mínimo en las propiedades del alimento. Su resultado es un producto en polvo.

La fruta en polvo podría ser una alternativa interesante, de alta estabilidad y facilidad de manejo, con la que promover el consumo de este alimento entre la población. Este producto podría ofrecerse para su uso como un ingrediente alimentario, con el que condimentar diferentes platos, o para su consumo a modo de zumo previa rehidratación. Incluso podría preformarse como un comprimido con la finalidad de un nutracéutico. En cualquier caso, el producto debe cumplir con las expectativas de calidad que exige el consumidor actual.

En este sentido, conviene poner de manifiesto que, si bien la estabilidad microbiológica de los productos en polvo, en principio, está garantizada, éstos pueden presentar problemas de estabilidad química y/o física. Su estabilidad química puede verse comprometida por el desarrollo de fenómenos de oxidación, asociados a su alta porosidad interpartícula, y la física por el desarrollo de fenómenos de pegajosidad y apelmazamiento. Las condiciones en las que convencionalmente se llevan a cabo los procesos de atomización suponen una evaporación rápida del agua del producto, que es sometido durante tiempos cortos a temperaturas elevadas. En estas condiciones, es muy frecuente la obtención de una matriz amorfa, al no darse tiempo a que ocurran los fenómenos de cristalización de los solutos que serían los termodinámicamente esperables. Esta matriz puede encontrarse en un estado vítreo, altamente estable, o en estado gomoso, con una viscosidad mucho menor y, por tanto, más inestable. El cambio de un estado físico al otro ocurre cuando se sobrepasa la temperatura de transición vítrea (T_g), la cual depende de los solutos presentes y aumenta a medida que disminuye el contenido en agua del producto (Roos, 1995). La mayoría de los solutos solubles presentes en frutas son azúcares de bajo peso molecular y ácidos orgánicos, los cuales presentan una baja T_g . Esto hace que los productos de fruta en polvo se encuentren en estado gomoso, no sólo durante su procesado, sino incluso en condiciones ambientales usuales de temperatura y humedad relativa. Esto, que afecta tanto al rendimiento del proceso, pues supone la adherencia de las partículas del polvo que se obtiene a las distintas partes del equipo, como a la calidad del producto, puede minimizarse mediante la adición de biopolímeros que actúan como facilitadores o *carriers* del proceso y previenen del colapso estructural del producto (Telis y Martínez-Navarrete, 2009). No obstante, su incorporación puede afectar a las propiedades del polvo obtenido, por lo que es necesario seleccionar muy bien cuál o cuáles añadir y en qué cantidad.

Teniendo en cuenta lo anterior, se ha planteado el objetivo de esta Tesis Doctoral, centrado, principalmente, en el estudio del impacto de la incorporación de distintos biopolímeros en algunas propiedades de un polvo de pomelo obtenido por atomización, con el fin de seleccionar el mejor de ellos, y estudiar su estabilidad y viabilidad como nutracéutico. Para conseguir este objetivo, se han planteado diferentes objetivos específicos que, para la redacción de este documento, se han estructurado en los capítulos que se describen a continuación.

CAPÍTULO I: Estudio del impacto de la temperatura de atomización, goma arábiga (GA) y carboximetilcelulosa (CMC) en algunas propiedades físicas del pomelo atomizado.

En esta primera parte del trabajo se quiso ensayar la metodología de superficie de respuesta como herramienta para optimizar el proceso de atomización teniendo en cuenta, como variables, por una parte, la temperatura de entrada del aire en el atomizador y, por otra, la concentración de goma arábiga y de carboximetilcelulosa en el rendimiento del proceso y en la humedad, porosidad y color del polvo obtenido.

Los carbohidratos de alto peso molecular, como GA, han sido muy utilizados como carriers de los procesos de atomización para evitar los fenómenos de pegajosidad que ocurren en el polvo obtenido. No obstante, es cierto que, para conseguir este objetivo, se requieren grandes cantidades de los mismos. Esto aumenta los costes asociados a la obtención del producto y puede alterar el sabor, color y otras propiedades del mismo. Además, a veces forman películas de alta higroscopicidad, lo que mejora su capacidad de rehidratación pero disminuye su estabilidad. Por eso se ha estudiado mucho su uso combinado con otros compuestos que actúen en el mismo sentido pero con mecanismos de acción diferentes. En este sentido, la revisión bibliográfica efectuada en relación al uso de este tipo de agentes, puso de manifiesto un potencial papel interesante de la CMC asociado a una cierta capacidad de la misma para facilitar la cristalización de la sacarosa. Dado que el problema de pegajosidad de la fruta en polvo se asocia a su estado gomoso, que se alcanza, entre otras cosas, por impedimentos durante el proceso para la cristalización de los azúcares propios de las frutas, se quiso estudiar el posible beneficio de su uso añadida al licuado de pomelo.

Este trabajo ha sido publicado en la revista *International Journal of Food Engineering* 14(5-6) (DOI: <https://doi.org/10.1515/ijfe-2017-0387>) y lleva por título “*Impact of temperature, gum Arabic and carboxymethyl cellulose on some physical properties of spray-dried grapefruit*”.

CAPÍTULO II: Modificación de la formulación optimizada: ensayo con nuevos biopolímeros y su nivel de dilución.

Con la finalidad de poder disminuir la cantidad de GA a añadir al licuado de pomelo para su atomización (según los resultados del Capítulo anterior), se quiso comprobar la viabilidad del uso combinado de GA y CMC con otros biopolímeros de uso frecuente en alimentos, como la maltodextrina (MD) y un aislado de proteína de suero de leche (WPI), en un estudio similar al descrito en el Capítulo I, haciendo uso, de nuevo, de la metodología de superficie de respuesta. Esta parte del estudio es la que se recoge en el Capítulo II.I. No obstante, continuando con el objetivo de reducir el uso de GA para disminuir los costes del proceso de atomización y/o para simplificar la formulación, y motivados por la continua revisión bibliográfica llevada a cabo

durante toda la etapa experimental, se planteó el intercambio de GA, MD y WPI entre ellos así como la incorporación de almidón modificado con anhídrido octenil succínico (OSA) para sustituir a la GA y/o a la MD de la formulación optimizada en el Capítulo II.I y así estudiar la posible disminución y/o eliminación de alguno de ellos (Capítulo II.II). La industria ha obtenido el OSA con el fin de mejorar las propiedades químicas, fisicoquímicas y funcionales del almidón nativo y se ha utilizado como emulsificante y estabilizante en productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos y en diferentes sistemas aceite-agua. Es por ello que se pensó que podría ser una buena alternativa. Por otra parte, se consideró oportuno tratar de reducir el nivel de dilución de la muestra que entra al atomizador (Capítulo II.III). Para los Capítulos II.I y II.II, la preparación de la formulación a atomizar se llevó a cabo mezclando el licuado de pomelo con una disolución acuosa de los biopolímeros, en cantidad 1:1. La dilución es una práctica habitual que se realiza para facilitar la atomización pero que, además de hacer menos sencilla la preparación de la muestra, puede también ir en contra de la calidad de la misma, por su manipulación. Además, parece un cierto contrasentido añadir agua para luego quitarla. Así, a partir de la formulación optimizada en el Capítulo II.I, se programaron diferentes experiencias reduciendo la cantidad de agua añadida y estudiando cómo esto afecta a la calidad del producto atomizado.

CAPÍTULO III: Estudio de almacenamiento

Con los resultados del Capítulo II se programó un estudio de almacenamiento del pomelo atomizado para comprobar su estabilidad. Teniendo en cuenta que el uso de OSA no mejoró todas las propiedades del producto y, en concreto, empeoró el rendimiento (Capítulo II.II), se trabajó con la formulación seleccionada en el Capítulo II.II pero ajustando el nivel de dilución de los biopolímeros a lo recomendado según los resultados del Capítulo II.III. En este sentido, se atomizó, a 148 °C, un licuado de pomelo al que se añadieron directamente 9.4 g GA+1.25 g MD+1.4 g WPI/100 g licuado. Se estudió la evolución con el tiempo de la vitamina C, fenoles totales y licopeno, actividad antioxidante, color y propiedades mecánicas del polvo, expuesto o no a la luz y a diferentes humedades relativas.

La publicación asociada a esta parte del trabajo se encuentra en prensa (Ref.: FBIO_2018_641), en la revista *Food Bioscience* y lleva por título “*Stability of the physical properties, bioactive compounds and antioxidant capacity of spray-dried grapefruit powder*”.

CAPÍTULO IV: Información sobre el desarrollo de polvo nutracéutico de pomelo mediante secado por atomización. Caracterización física, composición química y permeabilidad intestinal 3D.

Dado el alto contenido en compuestos bioactivos del pomelo, se pensó que la formulación de un producto nutracéutico en forma de polvo podría ser de gran interés para los consumidores. No obstante, para ello es necesario identificar los principales compuestos bioactivos presentes y comprender su interacción con el sistema digestivo. Fue tratando de avanzar en esta línea que se planteó el estudio que se desarrolla en este Capítulo. Para ello se seleccionó un extracto del polvo de pomelo, que se caracterizó en cuanto a su contenido en fenoles y flavonoides totales, así como en su actividad antioxidante. En primer lugar, se identificaron algunos de los compuestos bioactivos mayoritarios de este extracto. Se comprobó el nivel de toxicidad del extracto y, trabajando por debajo de éste, se estudió la bioaccesibilidad de los compuestos identificados a través de un modelo intestinal 3D, utilizando dos líneas celulares complementarias a nivel intestinal: Caco-2 y HT29-MTX.

La publicación asociada a esta última parte de la Tesis lleva por título “*Insights into the development of grapefruit nutraceutical powder by spray drying. Physical characterization, chemical composition and 3D intestinal permeability*” y acaba de ser enviada a la revista *Journal of Functional Foods* para su consideración.

BIBLIOGRAFÍA

AILIMPO (2017). Asociación Interprofesional del limón y Pomelo. Memoria actual de actividades 2017, Visto el 25 de mayo de 2018, Dirección URL: <http://www.ailimpo.com/>

Cárcel J.A., García-Pérez J.V. Bénédicto, J., & Mulet. A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 200-207.

EFSA (2011). European Food safety authority. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to a combination of lycopene, proanthocyanidins, vitamin C, vitamin E, selenium and beta-carotene and contribution to normal collagen formation (ID 1669) and protection of the skin from UV-induced damage (ID 1669) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924 / 2006 1, 9(1924), 1–15.

FAO (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Citrus Fruits Statistics 2015. Visto en 25 mayo 2018. Dirección URL: <http://www.fao.org/3/a-i5558e.pdf>.

Ghanem, N., Mihoubi, D., Kechaou, N., & Boudhrioua, N. (2012). Microwave dehydration of three citrus peel cultivars: effect on water and oil retention capacities, color, shrinkage and total phenols content. *Industrial Crops & Products*, 40, 167–177.

Gorinstein, S., Leontowicz, H. and Leontowicz, M. 2005. Red Star Ruby (Sunrise) and blond qualities of Jaffa grapefruits and their influence on lipid levels and plasma activity in rats fed with cholesterol-containing and cholesterol-free diets. *Life Science*, 77, 2384-2397.

Heiss, E., Herhaus, C., Klimo, K., Bartsch, H., & Gerhauser, C. (2001). Nuclear factor kappa B is a molecular target for sulforaphane-mediated inflammatory mechanisms. *The Journal Biological Chemistry* 276, 320008-32015.

Infoagro (2018). El cultivo del pomelo. Visto el 25 mayo de 2018, <http://www.infoagro.com/citricos/pomelo.htm>.

Jiang, H., Zhang, M., & Adhikari, B. (2013). Fruit and vegetable powders. en Handbook of food powders : processes and properties. Ed, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, United Kingdom, 532-552.

Lv, X., Zhao, S., Ning, Z., Zeng, H., Shu, Y., Tao, O., & Lu, C. (2015). Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health. *Chemistry Central Journal*, 1–14.

OMS (2018). Organización Mundial de la Salud. Fomento del consumo mundial de frutas y verduras. Visto el 25 mayo de 2018 <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/>.

Ozkan, I. A. (2007). Microwave drying characteristics of spinach. *Journal of Food Engineering* 78, 577–583.

Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high value foods. A review. *Journal of Food Engineering*, 49, 311-319.

Roos, Y. H. (1995). Phase Transitions in Food. Academic Press, San Diego, CA, p. 73-107.

Telis, V. R. N. & Martínez-Navarrete, N. (2009). Collapse and color changes in grapefruit juice powder as affected by water activity, glass transition, and addition of carbohydrate polymers. *Food Biophysics*, 4, 83–93.

Vanamala, J., Reddivari, L., Sun, Y.K., Pike, L. M. & Patil Bh. S. (2006). Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 157–166.

Zhang, Y., Gan, R., Li, s., Zhou, Y., Li, A., Xu, D. & Hua-Bin Li (2015) Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases *Molecules*, 20(12), 21138-21156.

CAPÍTULO I

Estudio del impacto de la temperatura de atomización, goma arábica y carboximetilcelulosa en algunas propiedades físicas del pomelo atomizado.

Publicación asociada: Impact of temperature, gum Arabic and carboxymethyl cellulose on some physical properties of spray-dried grapefruit. F. González, M. Igual, M.M. Camacho, N. Martínez-Navarrete. International Journal of Food Engineering 14(5-6), DOI: <https://doi.org/10.1515/ijfe-2017-0387>.

I. Impact of temperature, gum arabic and carboxymethyl cellulose on some physical properties of spray-dried grapefruit

Freddy González. *Universitat Politècnica de València, Food Technology Department, Food Investigation and Innovation Group, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain*

Marta Igual. *Universitat Politècnica de València, Food Technology Department, Food Investigation and Innovation Group, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain*

María del Mar Camacho. *Universitat Politècnica de València, Food Technology Department, Food Investigation and Innovation Group, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain*

Nuria Martínez-Navarrete^{1*}. *Universitat Politècnica de València, Food Technology Department, Food Investigation and Innovation Group, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain*

^{1*} Corresponding author: Tel.: +34 96 3879362; fax: +34 96 387 73 69. E-mail address: nmartin@tal.upv.es (Martínez-Navarrete, N). ORCID ID: 0000-0001-8345-8495.

Abstract

Spray-dried fruit powder may be an interesting alternative for the purposes of promoting fruit consumption among consumers. The use of carrier agents is especially necessary for the production of spray-dried fruit powders. As they may affect some physical properties of the powder, it is important to adjust the amount at which they have to be added to the minimum in order to achieve the necessary effects. The final aim of the study was to identify the most suitable atomization temperature, as well as the optimal concentration of gum Arabic and carboxymethyl cellulose to be used as carriers, in order to obtain grapefruit powder with the maximum dry matter yield and porosity, the minimum water content and, simultaneously, with suitable color characteristics. The results of the study don't recommend the use of carboxymethyl cellulose and suggest that the best color, the one that corresponds to a free-flowing powder, corresponds to a very luminous one, low in chroma and with a hue that is much more yellow than reddish orange.

Keywords: grapefruit powder, porosity, yield, luminosity, Chroma, hue angle.

I.1. Introduction

In recent years, the health benefits of eating fruit and vegetables have been linked to their role in the prevention of different diseases. These protective effects are attributed to the presence of bioactive compounds with antioxidant capacity that affect the reduction of degenerative diseases [1]. However, the main drawback to the consumption of fresh fruit and vegetables is their short lifespan. In the mature state, they present a high water content, making them more susceptible to decomposition by microorganisms, chemical and enzymatic reactions [2]. In fact post-harvest losses of well over 50% may be generated while marketed [3]. In this sense, one challenge faced by the food industry is that of researching and developing processes and/or products that, in addition to being safe, maintain the health benefits of fruit at a maximum, considering the current consumer demand.

Dehydration processes have been widely used in the food industry to obtain products with a greater stability and lower volume, which are easier to handle [4]. Nevertheless, conventional processes should be optimized or new processes should be developed to ensure the best quality of the obtained products. Fruit powder may be an interesting alternative for the purposes of promoting fruit consumption among consumers, either as an ingredient in other foods or after being rehydrated to obtain a juice. Spray-drying is a simultaneous heat and mass transfer operation that implies the change of a food from a liquid state to a dry particulate state.

Despite the obtained powder will benefit from great biochemical and microbiological stability, it could present some problems as regards its physical stability. Spray drying is a rapid dehydration method that frequently leads to the obtaining of an amorphous matrix, glassy or rubbery depending on the glass transition temperature (T_g). Powdered foods in the rubbery state may exhibit stickiness and caking problems [5]. This structural collapse is characterized by a sharp loss in porosity which affects aroma retention or rehydration capacity, among other things [6]. The rubbery state is especially frequent in powdered fruit products, related to their composition. Most fruit soluble solutes are low molecular weight sugars and organic acids all of which have a low T_g [7]. This leads to the T_g of the product being easily exceeded during fruit spray-drying, and also during storage, with the consequent adhesion of rubbery powder particles both to each other and to the equipment, decreasing the product yield and causing operational problems [8]. In general,

the stickiness causes considerable economic loss and limits the application of spray drying on foods as well as on pharmaceutical materials [9].

Some of the problems associated with the rubbery state can be solved by adding biopolymers that act as process carriers and confer stability on the product. High molecular weight carbohydrates, such as starches, maltodextrins and gums, many of them capable of increasing the T_g , are included among these carriers [10, 11]. Although these are the materials most commonly used for this purpose, it is also true that large amounts of carbohydrates are required to avoid fruit powder stickiness, which increases the cost and may alter the original flavor, taste and color of the product [12]. According to these authors, in addition, the films that they form are very easily moisturized which, while necessary to ensure a good rehydration of the powder product, makes it less advisable to use them for the purposes of ensuring their stability. For this reason, the search for other types of drying aids is still ongoing. In this sense, the use of a small amount of proteins, which are amphiphilic in character, has been described [12-16]. An interesting role for carboxymethyl cellulose (CMC), an organic derivative of cellulose, has also been described, involving sugar crystallization. This could reduce the phenomenon of stickiness, considering the fact that crystalline sugar has a lower water sorption potential, despite the fact that solubility decreases [2]. Among the more widely used high molecular weight carbohydrates, the natural plant exudates of Acacia trees, the gum Arabic (GA) is the only gum used in food products that exhibits high solubility and low viscosity in aqueous solution, making the spray drying process easier [17]. GA is especially effective because of its emulsifying properties, due to its low protein content [18]. In this sense, it may be interesting to combine GA with CMC for fruit powder production.

Despite the use of carrier agents being especially necessary for the purposes of producing spray dried fruit powders, they can also affect some physical properties of the powder, such as the water content, porosity or color. For this reason, it is of great interest to select the final use of the powder in order to adjust the quantity of the carriers to be added as much as possible. Whatever the final use may be, a maximum process yield is desirable. Nevertheless, if a tablet is going to be produced, the color or flow properties are less important than if the powder is going to be offered to the consumer to be rehydrated. In the latter case, the yield should be maximized by affecting the desirable physical properties of the powder as little as possible.

In the spray-drying operation a balance between the mass of inlet feed and the mass of powder recovered, taking into account the water eliminated and the powder lost mainly due to the sticking onto the dryer chamber wall is established. In this sense, the process yield or the drying yield can be considered. As for the process yield, to refer the grams of the solids in the total recovered powdered product to the grams of feed solid-content is recommendable [8, 14, 18-22].

As regards the physical properties, the water content of the obtained powder should be as low as possible. Porosity plays an important role in the agglomerate strength of dried foods [23]. As far as its evolution is concerned, a greater porosity or, what is the same, a lower apparent density, corresponds both to a more free-flowing powder with a greater air volume distributed among particles and also to a more soluble one [18, 23]. On the other hand, it is not easy to know in advance the most desirable expected color in the fruit powder. In many cases, it is not possible to obtain a spray-dried fruit with a color similar to that of the fresh fruit because of the aforementioned need to add carriers in order to avoid operational problems. When no carriers, or a small amount of them, are added, a paste like structure is obtained instead of a powder. In this sense, to look for the natural color in the powder may not be adequate. On the other hand, the carriers lead to color changes in the product [13, 24]. The problem is whether the luminosity, hue and chroma color attributes should take higher or lower values than those of fresh fruit when carriers have been added.

In this sense, the aim of this study was to identify the most suitable atomization temperature, as well as the optimal concentration of GA and CMC to be used as carriers, in order to obtain grapefruit powder with the maximum dry matter yield and porosity, the minimum water content and, simultaneously, suitable color characteristics. To this end, it is necessary first to establish whether atomized grapefruit powder of the highest quality relates to the maximum or minimum value of the color attributes.

I.2. Materials and methods

I.2.1. Raw material

This study was carried out with grapefruit (*Citrus paradise* var. Star Ruby). Gum Arabic (Scharlau, Spain) and carboxymethyl cellulose (Alfa Aesar, Germany) were added to the liquidized grapefruit.

I.2.2. Preparation of feed mixture and spray drying conditions

Grapefruit was washed, peeled (carefully removing the albedo) and liquidized. Liquidized grapefruits were mixed with a water solution containing GA and/or CMC. Solutes were added to water according to the generated experimental design obtained from the response surface methodology (RSM, Table 1) and commented on below. Liquidized grapefruit (500 g) was mixed with 500 g of each one of these solutions. The mixture was stirred for 30 min until homogeneity was reached. The samples were immediately frozen at -40 °C until atomization. Thawed samples (for 24 h at 8 °C) were fed into a Büchi B-290 (Switzerland) mini spray dryer with the following operating conditions: aspiration of 35 m³/h; air flow rate 473 L/h with a co-current flow; pump flow rate 9 mL/min. Drying inlet air temperature was varied according to experimental design (Table 1). After the completion of the experiment and when the inlet air temperature fell below 50 °C, the samples were collected from the product collection vessel.

I.2.3. Experimental Design

For this study, a central composite design (CCD) and the response surface methodology (RSM) were applied to evaluate the effect of three process independent variables on six response variables, mainly related to the profitability of the process and the quality of the powder, and to propose which levels of the former are optimum for the purposes of achieving the best powder [25]. As independent variables, the inlet air temperature (T, 100 – 200 °C) and the concentration of gum Arabic (4-12 g GA/100g liquidized grapefruit) and carboxymethyl cellulose (0-2 g CMC/100g liquidized grapefruit) were selected. The response variables considered were those of water content (x_w), porosity (ϵ), luminosity (L^*), chromatic a^* and b^* color coordinates, dry matter yield (DMY). Twenty-three experimental runs were generated based on the corresponding rotatable and orthogonal central composite design (Table 1). The experiments were randomized.

Table 1. Matrix of the central composite experimental design applied and the experimental results (\pm SD) of water content (x_w), porosity (ϵ), dry matter yield (DMY), lightness (L^*), hue angle (h^*_{ab}) and chroma (C^*_{ab}) of the spray-dried powders.

T ⁽¹⁾	GA ⁽²⁾	CMC ⁽³⁾	x_w ⁽⁴⁾	ϵ (%)	DMY ⁽⁵⁾	L^*	h_{ab}	C^*_{ab}
150	8.0	1.0	0.029 \pm 0.003	71.6 \pm 0.2	32.48	90.5 \pm 0.2	82.6 \pm 0.4	9.7 \pm 0.2
150	8.0	1.0	0.027 \pm 0.003	72.0 \pm 0.3	34.86	89.9 \pm 0.2	78.0 \pm 0.5	9.7 \pm 0.3
150	8.0	1.0	0.033 \pm 0.006	74.7 \pm 0.2	34.45	90.8 \pm 1.7	88.3 \pm 0.4	9.5 \pm 0.2
150	8.0	1.0	0.063 \pm 0.003	72.6 \pm 0.2	35.57	91.5 \pm 0.2	83.5 \pm 0.2	10.3 \pm 0.2
150	8.0	1.0	0.034 \pm 0.010	73.8 \pm 0.4	41.96	91.4 \pm 0.2	83.8 \pm 0.7	10.1 \pm 0.2
150	8.0	1.0	0.073 \pm 0.002	74.1 \pm 0.2	37.50	91.4 \pm 0.2	83.9 \pm 0.4	11.2 \pm 0.2
150	8.0	1.0	0.079 \pm 0.013	74.7 \pm 0.6	31.34	90.91 \pm 0.5	83.8 \pm 0.4	11.8 \pm 0.3
150	8.0	1.0	0.076 \pm 0.010	74.6 \pm 0.5	36.20	91.5 \pm 0.3	85.9 \pm 0.5	10.5 \pm 0.2
150	8.0	1.0	0.067 \pm 0.002	72.4 \pm 0.3	33.09	89.9 \pm 0.4	77.8 \pm 0.3	10.9 \pm 0.2
150	14.7	1.0	0.142 \pm 0.004	68.6 \pm 0.2	37.67	91.2 \pm 0.3	86.3 \pm 0.2	8.6 \pm 0.2
120	12.0	0.0	0.096 \pm 0.002	70.16 \pm 0.6	55.12	90.3 \pm 0.2	77.4 \pm 0.3	10.3 \pm 0.3
180	12.0	2.0	0.057 \pm 0.002	68.8 \pm 0.4	25.40	89.9 \pm 0.2	78.5 \pm 0.3	11.8 \pm 0.2
150	8.0	2.7	0.123 \pm 0.007	75.2 \pm 0.9	16.88	88.6 \pm 0.3	72.2 \pm 0.2	12.3 \pm 0.3
200	8.0	1.0	0.036 \pm 0.002	76.2 \pm 0.8	28.44	88.0 \pm 0.2	76.9 \pm 0.3	13.8 \pm 0.2
180	4.0	0.0	0.079 \pm 0.003	45.3 \pm 1.5	35.90	66.5 \pm 1.9	63.9 \pm 0.6	30.4 \pm 0.3
100	8.0	1.0	0.181 \pm 0.002	68.2 \pm 0.3	26.20	86.2 \pm 0.2	79.9 \pm 0.2	10.7 \pm 0.2
120	4.0	0.0	0.110 \pm 0.003	64.6 \pm 0.4	41.28	82.3 \pm 0.5	68.5 \pm 0.2	20.9 \pm 0.4
120	12.0	2.0	0.178 \pm 0.002	70.6 \pm 0.6	22.34	90.1 \pm 0.2	78.4 \pm 0.7	9.5 \pm 0.2
180	12.0	0.0	0.204 \pm 0.012	69.5 \pm 0.3	60.94	88.7 \pm 0.3	74.8 \pm 0.2	11.4 \pm 0.2
180	4.0	2.0	0.045 \pm 0.003	78.2 \pm 0.4	21.58	87.2 \pm 0.2	77.9 \pm 0.3	17.8 \pm 0.3
150	8.0	0.0	0.116 \pm 0.004	76.0 \pm 0.4	63.98	90.2 \pm 0.2	79.1 \pm 0.2	11.6 \pm 0.2
120	4.0	2.0	0.115 \pm 0.002	76.5 \pm 0.4	17.60	84.7 \pm 0.9	66.6 \pm 0.2	14.5 \pm 0.2
150	1.3	1.0	0.074 \pm 0.003	64.4 \pm 1.0	25.28	80.3 \pm 0.7	63.5 \pm 0.4	21.7 \pm 0.5

⁽¹⁾Inlet temperature ($^{\circ}$ C), ⁽²⁾ Gum Arabic (g/100g liquefied grapefruit), ⁽³⁾ Carboxymethyl cellulose (g/100g liquefied grapefruit), ⁽⁴⁾ $g_{water}/100g_{grapefruit's\ own\ solutes}$, ⁽⁵⁾ g powder dry matter/100 g feed dry matter.

I.2.4. Analysis of response variables

The powder's water content was determined, in triplicate, using the gravimetric method in a vacuum oven (VACIOTEM, JP Selecta, Spain) at 60 ° C, p<100 mm Hg until constant weight. As the GA and CMC content of each sample was different (Table 1), the water content of the powders was referred to the grapefruit's own solutes (GS) (Eq. 1 and 2) to make the results comparable.

$$x_w = \frac{x_w^p}{(1 - x_w^p)(x_{GS/TS})} \quad (1)$$

$$x_{GS/TS} = \frac{m_L(1 - x_w^L)}{m_{GA} + m_{CMC} \pm m_L(1 - x_w^L)} \quad (2)$$

where: x_w is the water content of the powder referred to grapefruit's own solutes (GS, w/w), x_w^p is the water content of the powder (w/w), $x_{GS/TS}$ is the mass fraction of GS to total sample solutes, m_{GA} , m_{CMC} and m_L are the mass of gum Arabic, carboxymethyl cellulose and liquidized grapefruit, respectively, in the sample and x_w^L is the water content of the liquidized grapefruit (w/w).

The porosity, or percentage of air volume related to total volume, was calculated from the true and bulk densities (Eq. 3). The true density (ρ) of the product was calculated from its individual components. In this case, water and carbohydrates, both the grapefruit's own and those added, were considered to be the main components of the samples (Eq. 4). For the purposes of bulk density (ρ_b) determination, in triplicate, approximately 2 g of the powder were transferred to a 10mL graduated test tube and stirred for 10 s at 1600 rpm in a Vortex (Velp WX F202A0230, Italy). The bulk density was calculated as the ratio mass of the powder to the occupied volume in the tube after stirring.

$$\varepsilon = \frac{\rho - \rho_b}{\rho} \quad (3)$$

$$\frac{1}{\rho} = \frac{x_w^p}{\rho_w} + \frac{x_{CH}^p}{\rho_{CH}} \quad (4)$$

where ε is the porosity; ρ and ρ_b are the true and bulk densities, respectively; x_i^p and ρ_i are the mass fraction and density, respectively, of water ($i=w$) and carbohydrates ($i=CH$) of the powder, with $\rho_w (20^\circ\text{C}) = 0.9976 \text{ g/cc}$ and $\rho_{HC} (20^\circ\text{C}) = 1.4246 \text{ g/cc}$ [26].

The CIE $L^*a^*b^*$ color coordinates, hue angle (h_{ab}^* , Eq. 5) and chroma (C_{ab}^* , Eq. 6) of the samples were measured in triplicate using a spectrophotometer (MINOLTA, CM3600-D, Spain) with a reference illuminant D65 and 10° observer.

$$h_{ab}^* = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (5)$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (6)$$

The percentage of dry matter yield, was determined using Eq. (7).

$$DMY = 100 \frac{m^p (1 - x_w^p)}{m (1 - x_w)} \quad (7)$$

where m^p and x_w^p are the mass (g) and the water content (w/w), respectively, of the obtained powder; m and x_w are the mass (g) and the water content (w/w) of the product coming into the spray-dryer.

I.3. Results and Discussion

The water content of the liquidized grapefruit used for the study was $0.912 \pm 0.009 \text{ g/g}$. Table 1 shows the experimental results of the different response variables measured in the powders. A second order quadratic equation was used to express the response variables as a function of the independent ones (Eq. 8). Only the significant model terms ($p < 0.05$) were considered in the final reduced model. Table 2 shows the regression coefficients of the models with a significant correlation of the response variables with the independent ones. The determination coefficients, all in the range of 58-92, indicate that over 50% of the response variation may be explained in terms of all three independent variables.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad (8)$$

where Y_i is each one of the response variables and x_i are the three independent variables, as indicated in Table 2.

Table 2. Regression coefficients, adjusted determination coefficient (R^2) and standard error of the estimate (EE) for the polynomial model fitted to predict the response variables as a function of the independent variables.

	x_w	ε	DMY	L^*	h_{ab}	C_{ab}^*
β_0	0.021	45.38	-39.83	36.38	6.34	53.33
β_1	0.0002	-	1.01	0.45	0.66	-0.28
β_2	0.006	4.46	2.20	3.81	4.50	-3.74
β_3	0.113	15.11	-14.29	0.05	8.55	-11.11
β_1^2	-	-	-0.003	-0.0019	-0.002	0.0011
β_2^2	-	-0.19	-	-0.13	-0.20	0.13
β_3^2	0.027	-	3.39	-2.20	-4.27	2.15
β_{12}	-	-	-	-	-	-
β_{13}	-0.0011	-	-	0.08	-	-
β_{23}	-	-1.41	-0.95	-0.69	-	0.58
R^2 adj	58.22	59.45	90.63	83.45	77.76	91.74
EE	0.04	4.58	4.28	2.73	3.64	1.79

β_0 : constant model; β_i : estimated regression coefficient for the main linear effects, β_i^2 : estimated regression coefficient for the quadratic effects, β_{ij} : estimated regression coefficient for the interaction effects. Subscripts $i=1$: temperature ($^{\circ}C$); $i=2$: gum Arabic (g/100g liquidized grapefruit); $i=3$: carboxymethyl cellulose (g/100g liquidized grapefruit). x_w : water content (g_{water}/100g_{grapefruit solids}), ε : porosity (%), DMY: dry matter yield (g powder dry matter/100 g feed dry matter), L^* : Lightness, h^* : hue angle and C_{ab}^* : chroma.

I.3.1. Water content

The water content of the powdered products is related to drying efficiency, playing an important role in its free-flowing behavior and stability during storage, due to its effect on the glass transition and its behavior during crystallization [27]. The water content of the spray dried powders varied between 0.0106 and 0.0828 g water/g powder. Due to the different biopolymers content added to each sample, to make it possible to compare the

results of the different powders, they were referred to the grapefruit's own solutes (Eq. 1 and 2). The obtained values (Table 1) were correlated with the independent variables (Table 2). A positive effect of T, GA and CMC on x_w was observed, along with a negative interaction between T and CMC. As a result, the evolution of x_w with T and CMC was similar to that shown in Fig 1. At the lowest CMC content, a small x_w increase occurs when T increases, while at the highest CMC content, a sharp decrease in x_w is observed when T increases. As the most desirable powdered product would be that with the lowest water content, this will be obtained with a low concentration of GA, an intermediate one of CMC and at high T.

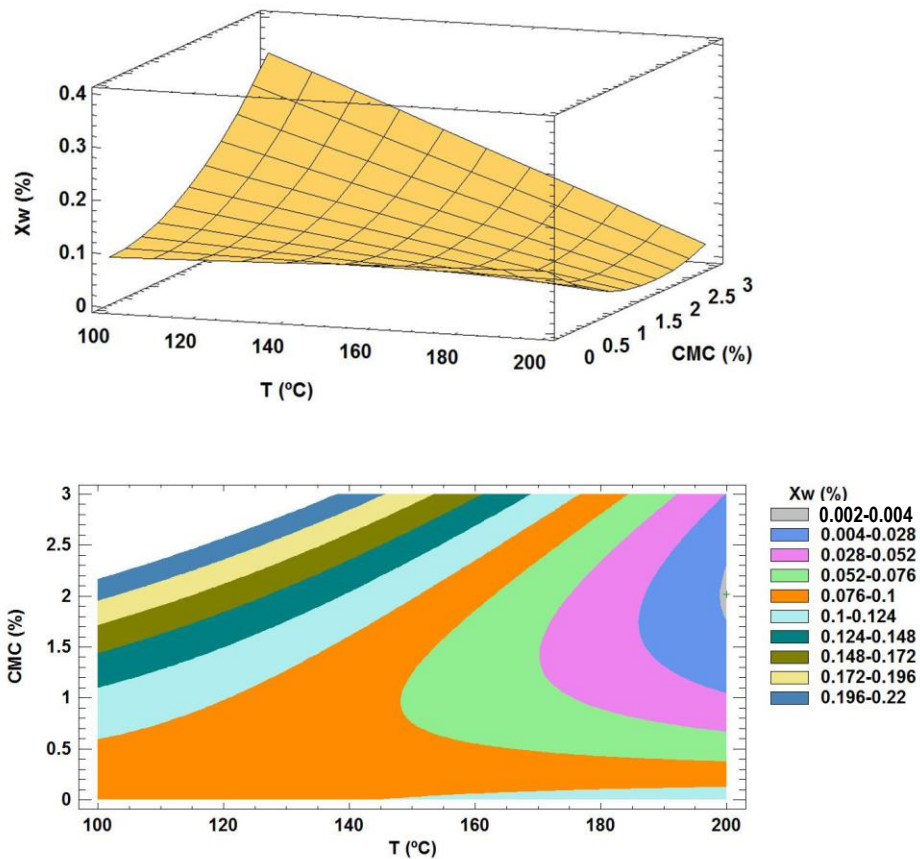


Fig. 1. Response surface (up) and contour plot (down) of the predicted model for the water content of the spray dried powder, referred to grapefruit's own solutes (x_w , g water /100 g grapefruit own solutes), as a function of carboximethylcellulose content (CMC, g/100g liquidized grapefruit) and spray-drying temperature (T).

I.3.2. Porosity

The porosity of the powder ranged from 45.3 to 78.2 % (Table 1). It was positively affected by the added solutes, while some negative quadratic effects of GA and a negative interaction between GA and CMC were observed (Table 2). In this way, the highest desired ε values will be obtained when a low-medium content of GA and a high CMC content are added (Fig 2).

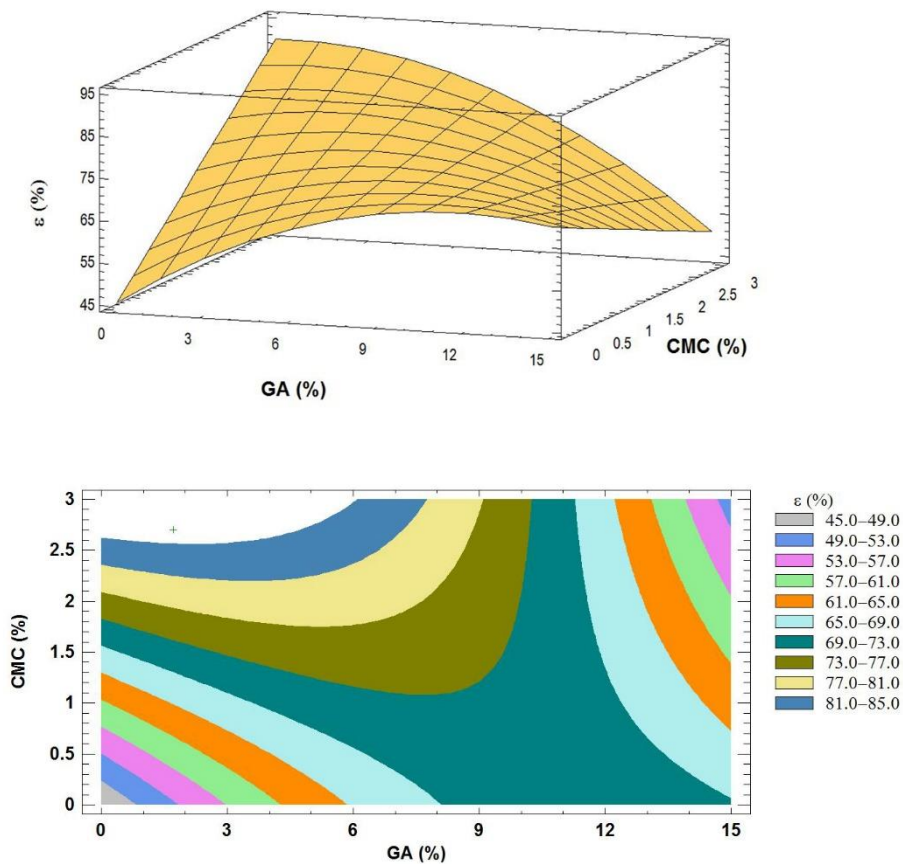


Fig. 2. Response surface (up) and contour plot (down) of the predicted model for the porosity (ε) of the spray dried powder as a function of GA and CMC content. For the plot, spray drying temperature has been fixed at 150 °C.

I.3.3. Color

As far as the color of the different obtained powders is concerned, the L^* values and the chromatic a^* and b^* coordinates are shown in Table 1 and Figure 3, respectively. From the a^* and b^* values, the color attributes, hue angle and chroma, were calculated (Eq. 5 and 6, Table 1). In Figure 3, the angle described by the sample position to the positive a^*

axis is the hue angle and the distance from the sample position to the grid origin ($a^*=0$, $b^*=0$) is the chroma. As can be seen in Table 1, the L^* values of the different grapefruit powders ranged from 82.3 to 91.5, except for the sample formulated with 4 % GA and dried at 180 °C, which was 66.5, an exceptionally low L^* value. This same sample, together with those obtained at (T=120 °C, 4% GA) and (T=150 °C, 1.3% GA, 1% CMC), also presented, in addition to the lowest L^* values, the lowest hue angle and the highest chroma (Figure 3 and Table 1). The addition of GA to grapefruit increases lightness and decreases a^* [5]. The lower amount of added carbohydrates in these samples could contribute to the observed results, as a lower dilution of the grapefruit pigments occurs. When we visually observed these three samples, despite actually being more orange in color than the rest of them, they were extremely sticky and not a free-flowing powder at all. In fact, they also had the lowest porosity values (Table 1). Taking all these considerations into account, the most desirable color for the grapefruit powder seems to be that which provides a high luminosity and hue angle and a low chroma. In this study, this color is achieved when the liquidized grapefruit is formulated with an intermediate-high GA and intermediate CMC content and is spray dried at an intermediate temperature.

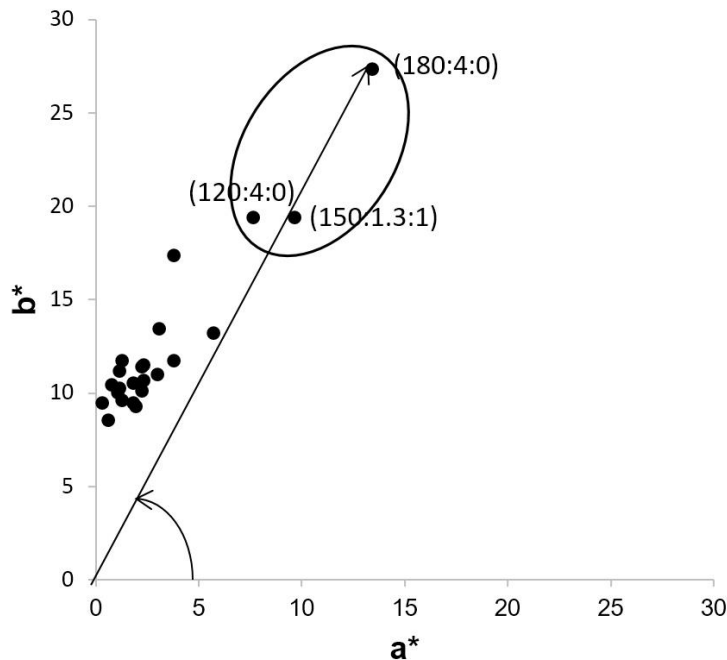


Fig. 3. Chromatic a^* and b^* grapefruit powders color coordinates. Samples surrounded by a circle are those that presented the lowest hue angle together with the greatest chroma; for them (spray drying temperature: gum arabic concentration: carboxymethylcellulose concentration) is indicated. For the sample (180:4:0) hue angle and chroma are indicated with arrows.

I.3.4. Product yield

Product yield is one of the main indices of the process performance related to its efficiency. Dry matter yield ranged from 16.9 to 64% (Table 1), in the same order as that obtained by other authors working with spray dried pomegranate juice [8] or tamarind pulp [14], for instance. When working with fruits, the low product yield of spray drying is remarkable, which is related to their aforementioned low T_g . In this study the yield was greater than 41 % in only 3 of the 23 spray drying runs carried out, these being the samples formulated with no CMC and a GA content of over 8 %. This leads to a significant increase in the operational costs, due both to the low process yield and to the need to add a high carrier content in an attempt to increase it. In fact, an economic study carried out in our laboratory, on both laboratory and industrial scales, suggests that the cost of obtaining powdered grapefruit by spray drying is 2.3 times higher than by freeze drying, taking into account all the costs involved in each process [28]. For this reason, it is extremely important to consider the process yield among the response variables when trying to optimize spray drying. In Table 2 and Figure 4, a positive linear correlation with T and GA and a strong negative linear correlation with CMC were observed, together with a negative and positive quadratic correlation with T and CMC, respectively, and a negative CMC-GA interaction. All this behavior leads to the highest product yield being obtained when the liquidized grapefruit is formulated with low CMC and high GA concentration and is dried at an intermediate inlet air temperature. The response surface shown in Fig. 4 has been obtained at a spray drying temperature of 150 °C. It maintains the shape but shifts to lower yield values when obtained at 100 or 200 ° C, for example. These results highlight the need to study the impact not only of the quantity but also of the type of carrier added. In this sense, CMC does not seem to be a suitable carrier for fruit spray drying. In contrast, the benefit of adding GA has been widely demonstrated [8, 14, 29, 30].

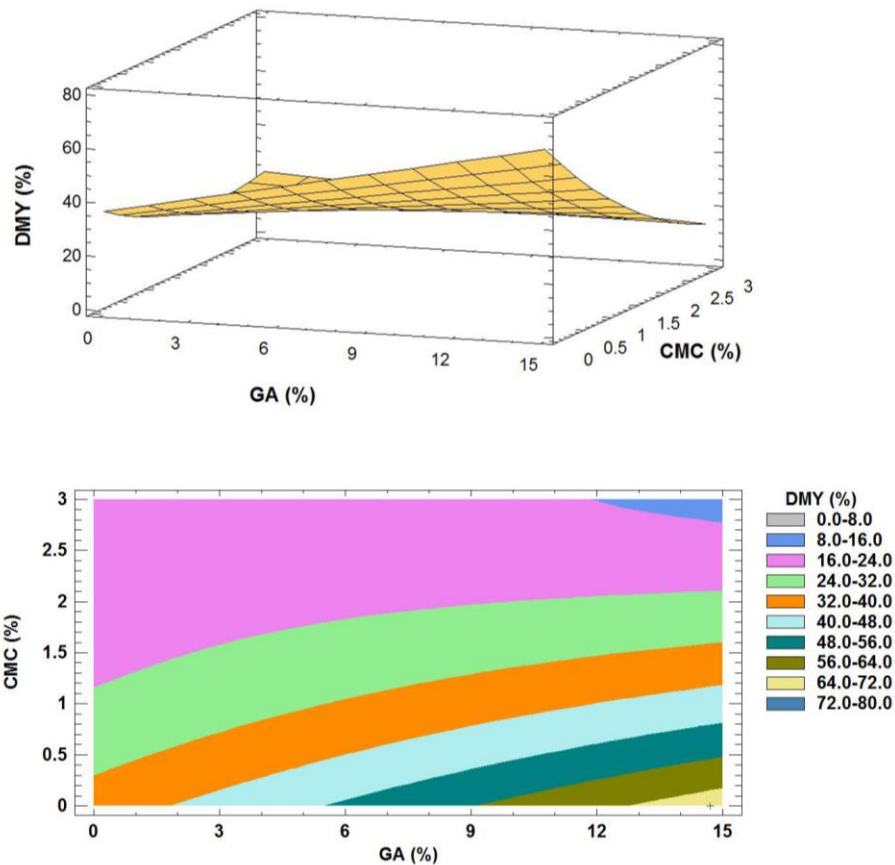


Fig. 4. Response surface (up) and contour plot (down) of the predicted model for dry matter yield (DMY, g powder dry matter/100 g feed dry matter) of the spray dried powder. For the plot, spray drying temperature was fixed at 150 °C.

I.3.5. Optimization of temperature and carrier concentration

The final objective of the response surface methodology is to establish the values of the independent variables that optimize the value of the response variables. Optimizing the mix formulation and temperature during spray drying for the purposes of obtaining the best powdered product can pursue different objectives. From the point of view of improving the productive process, it is fundamental to ensure the maximum performance of the process. In our study, when looking for the combination of the independent variables that statistically maximizes the product yield, $T = 130.1$ °C, 14.44% GA and 0.035% CMC were obtained. As can be observed, the temperature of this process is intermediate-lower, the concentration of GA is higher and the CMC is lower than those experimentally considered. According to the results obtained from the different response

variables (Table 1), this combination of solutes supposes that the powders obtained would have a high water content and be low in porosity, which is undesirable. If the aim is to obtain a product with the best quality characteristics of those studied, it will be a question of obtaining the one that had the lowest water content and chroma and the maximum porosity, luminosity and hue angle. Statistically, this would be obtained with $T = 167.7$ °C, 9.30% GA and 1.28% CMC. In this case, the GA concentration is intermediate and the CMC concentration is high, implying a low yield. When considering the optimization taking all the variables into account, the conditions would be $T = 141.9$ °C, 12.82% GA and 0% CMC. In this case, the predicted dry matter yield for the process would be 63.97%. The choice of one or other process conditions will be a function of the final use of the powdered product. From the point of view of the profitability of the process, maximizing the yield will always be desirable. However, considering this parameter alone could only be justified if the final use of the powdered product is as an ingredient in the formulation of other foods. In the same way, prioritizing quality would only be justified if the product were to be offered directly to the consumer, although even in this case it would seem necessary to consider the quality/cost ratio.

I.4. Conclusions

The results of this study propose adding 12.82 g of GA / 100g liquidized and drying at 141.9 °C, in order to obtain spray dried grapefruit powder with the maximum yield and porosity, the best color and the lowest water content. The use of CMC alone or combined with GA is not recommended. It is not easy to define the best value of the color coordinates and attributes of the powder obtained by spray drying, because what may occur, as happens in the case of the grapefruit, is that the color of the powder that most closely resembles that of the fruit corresponds to an extremely sticky product that could not be considered a free-flowing grapefruit powder. In this study, the best color corresponds to a very luminous powder, with low chroma and orange hue, although much more yellow than red.

Acknowledgments

The authors thank the Ministerio de Economía y Competitividad for the financial support given through the Project AGL 2012-39103. This mentioned received funding did not lead to any conflict of interests regarding the publication of this manuscript. The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

I.5. References

- [1] Igual M, García-Martínez E, Camacho MM, Martínez-Navarrete N. Impact of conventional and non-conventional technologies applied to obtain fruit products in the flavonoid content and antioxidant capacity of grapefruit. In: Yamane K, Kato Y (eds.) Handbook on flavonoids: dietary sources, properties and health benefits, Nova Science Publishers, Inc., United States, 2012.
- [2] Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM, Cal-Vidal J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innov. Food Sci Emerg Technol* 2005; 6:420–428.
- [3] FAO. Global initiative on food loss and waste reduction. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy, 2015.
- [4] Kaya A, Aydın O, Dincer I. Experimental and numerical investigation of heat and mass transfer during drying of Hayward kiwi fruits (*Actinidia deliciosa Planch*). *J Food Eng* 2008; 88:323-330.
- [5] Telis VRN, Martínez-Navarrete N. Collapse and color changes in grapefruit juice powder as affected by water activity, glass transition, and addition of carbohydrate polymers. *Food Biophys* 2009; 4:83–93.
- [6] Levi G, Karel M. Volumetric shrinkage (collapse) in freeze-dried carbohydrates above their glass transition temperature. *Food Res Int* 1995; 28(2):145-151.
- [7] Roos YH. Phase Transitions in Food, Academic Press, San Diego. 1995.
- [8] Yousefi S, Zahra ED, Mousavi SM. Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum L.*). *J Food Sci Technol* 2011; 48(6):677–684.

- [9] Boonyai P, Bhandari B, Howes T. Stickiness measurement techniques for food powders: a review. *Powder Technol* 2004; 145:34–46.
- [10] Madene A, Jacquot M, Scher J. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *Int J Food Sci Technol* 2006; 41:1–21.
- [11] Murúa-Pagola B, Beristain-Guevara CI, Martínez-Bustos F. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J Food Eng* 2009; 91:380–386.
- [12] Fang Z, Bhandari B. Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. *Food Res Int* 2012; 48:478–483.
- [13] Bhusari SN, Muzaffar K, Kumar P. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. *Powder Technol* 2014; 266:354–364.
- [14] Muzaffar K, Kumar P. Parameter optimization for spray drying of tamarind pulp using response surface methodology. *Powder Technol* 2015; 279:179–184.
- [15] Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Res Int* 2007; 40:1107–1121.
- [16] Adhikari B, Howes T, Shrestha A, Bhandari BR. Effect of surface tension and viscosity on the surface stickiness of carbohydrate and protein solutions. *J Food Eng* 2007; 79:1136–1143.
- [17] Rodriguez-Hernandez GR, Gonzalez-Garcia R, Grajales-Lagunes A, Ruiz-Cabrera MA. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. *Dry Technol* 2005; 23:955–973.
- [18] Fazaeli M, Emam-Djomeh Z, Kalbasi-Ashtari A, Omid M. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food Bioprod Process* 2005; 90:667–675.
- [19] Jafari, SM, Ghaleñoia, MG, Dehnadet, D. Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder Technol.* 2017; 311: 59-65.

- [20] Tonon RV, Brabet C, Hubinger MD. Influence of process conditions on the physicochemical properties of acai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *J Food Eng.* 2008; 88:411–418
- [21] León-Martínez FM, Méndez-Lagunas LL, Rodríguez-Ramírez J. Spray drying of nopal mucilage (*Opuntia ficus-indica*): Effects on powder properties and characterization. *Carbohydr Polym* 2010; 81:864–870.
- [22] Igual M, Ramires S, Mosquera LH, Martínez-Navarrete N (2014) Optimization of spray drying conditions for lulo (*Solanum quitoense* L.) pulp. *Powder Technol* 2010; 256:233–238.
- [23] Rahman MS. Toward prediction of porosity in foods during drying: a brief review *Dry Technol* 2001; 19 (1):1-13.
- [24] Kha T, Nguyen MH, Roach PD. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *J Food Eng* 2010; 98:385-392.
- [25] Yolme, M, Jafari, SM. Applications of Response Surface Methodology in the Food Industry Processes. *Food Bioprocess Technol* 2017; 10(3): 413-433.
- [26] Choi Y, Okos MR. Thermal properties of liquid foods. Review. In: *Physical and Chemical properties of food*. Okos MR (ed.) American Society of Agricultural Engineers, Michigan, USA, 1986.
- [27] Santhalakshmy S, Sowriappan JB, Sneha F, Mallela S. Effect of inlet temperature on physicochemical properties of spray-dried jamun fruit juice powder. *Powder Technol* 2015; 274:37–43.
- [28] Casanova MA. Viabilidad económica de producción industrial de fruta en polvo en función del proceso. Trabajo final de Máster en Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València. Valencia. Spain. 2016.
- [29] Divya AS, Swetarai CK, Prasad N. Effect of guar gum and gum arabic addition on functional properties on the quality characteristics of chicken nuggets. *Indian J Poult Sci* 2013; 48:58-62.
- [30] Phisut N. Spray drying technique of fruit juice powder: some factors influencing the properties of product. *Int Food Res J* 2012; 19(4):1297-1306.

CAPÍTULO II

Modificación de la formulación optimizada: ensayo con nuevos biopolímeros y su nivel de dilución.

Partiendo de los resultados obtenidos en el Capítulo I y con la finalidad de poder disminuir la cantidad de goma arábica (GA) a añadir al licuado de pomelo para su atomización, se quiso comprobar la viabilidad del uso combinado de GA y carboximetilcelulosa (CMC) con otros biopolímeros de uso frecuente en alimentos como la maltodextrina (MD), un aislado de proteína de suero de leche (WPI) y el almidón modificado con anhídrido octenil succínico (OSA). Además se consideró oportuno tratar de reducir el nivel de dilución de la muestra que entra al atomizador. En este Capítulo de la Tesis se presenta el trabajo realizado en este sentido y los resultados obtenidos, estructurado en 3 apartados. Al final del Capítulo se presentan las conclusiones de toda esta parte del estudio y las referencias bibliográficas correspondientes (Capítulos II.IV y II.V, respectivamente).

II.I. Uso combinado de goma arábica, carboximetilcelulosa, maltodextrina y aislado de proteína de suero de leche.

II.I.1. Introducción

Siendo conscientes de la necesidad de incorporar biopolímeros como facilitadores o *carriers* del proceso de atomización de fruta en polvo, que a su vez confieren estabilidad al producto obtenido, y teniendo en cuenta los resultados mostrados en el Capítulo I, se planteó la parte del estudio que se describe en este primer apartado del segundo Capítulo de la Tesis.

Los carriers pueden agruparse en base a su funcionalidad. Así, por una parte, están algunos carbohidratos de alto peso molecular, capaces de aumentar la temperatura de transición vítrea (T_g), entre los que se encuentran los almidones, maltodextrinas y gomas (Madene et al. 2006; Murúa-Pagola et al. 2009). Dadas las diferentes formas de actuar de los diferentes grupos de *carriers*, se ha demostrado que su mezcla es más eficiente que el uso de ellos por separado en el secado por atomización (Fazaeli et al. 2012). En este sentido, y teniendo en cuenta resultados previos obtenidos en el grupo de investigación, la goma arábica (GA) fue el carbohidrato seleccionado en un primer momento para este trabajo (Telis & Martínez-Navarrete 2009; Mosquera et al. 2012). Su uso mayoritario combinado con otro biopolímero minoritario como la carboximetilcelulosa (CMC) pretendía, en la medida de lo posible, poder disminuir la cantidad de GA a utilizar. Con estos 2 biopolímeros se desarrolló todo el trabajo mostrado en el Capítulo I, que permitió llegar a la conclusión de que la atomización a 141.9 °C y la formulación del licuado de pomelo con un 12.82 % de GA y sin nada de CMC añadida era la más adecuada para obtener un producto con las mejores propiedades físicas estudiadas y el máximo rendimiento. De hecho, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que la CMC disminuye el rendimiento del proceso. Por otra parte, la formulación obtenida supone el uso de una alta concentración de GA, cuyo coste es bastante elevado.

Teniendo en cuenta lo anterior, se quiso ensayar con otros biopolímeros de uso frecuente en la industria de alimentos, como son la maltodextrina (MD) y aislado de proteína de suero de leche (WPI). La MD, aunque contribuye en menor medida al aumento de la T_g (Mosquera et al. 2012), ha sido un biopolímero muy utilizado en atomización por su efecto en propiedades como la humedad, pegajosidad, rendimiento e higroscopicidad que confiere a los productos en polvo (Fang & Bhandari 2012; Bouquerand et al. 2008; Dwyer 2008). Por su parte, el carácter anfifílico de las proteínas parece ofrecer mejores propiedades a la película formada alrededor

de las partículas de polvo evitando la pegajosidad de las mismas (Bhusari et al. 2014; Gharsallaoui et al. 2007; Adhikari et al. 2007). De hecho, diferentes autores han descrito como el uso de pequeñas cantidades de proteínas puede ser tan eficiente como el de una gran cantidad de carbohidratos en el rendimiento (Adhikari et al. 2007; Fang & Bhandari 2012). El aislado de proteína de suero de leche ha sido muy utilizado con este fin (Madene et al. 2006; Murúa-Pagola et al. 2009; Osorio et al. 2014; Çakir-Fuller 2015).

El objetivo perseguido en esta parte del estudio fue evaluar si el uso combinado de 4 biopolímeros en la formulación, 2 mayoritarios (GA y MD) y 2 minoritarios (CMC y WPI), presentaba ventajas respecto al uso ya estudiado de sólo GA y CMC.

II.1.2. Materiales y métodos

II.1.2.1. Materia prima

Para esta parte del estudio se siguió utilizando pomelo (*Citrus paradisi*, var. Star Ruby), adquirido en un supermercado local de la ciudad de Valencia, seleccionando las frutas en base a su color, tamaño y ausencia de daños. Los biopolímeros utilizados en este caso fueron, además de GA y CMC, MD 16.5-19.5 dextrosa equivalente (DE), suministrados por la empresa Alfa Aesar (Alemania) y WPI (LACPRODAN® DI-9212 de Arla Foods Ingredients, Dinamarca).

II.1.2.2. Diseño experimental

El diseño de experimentos utilizado en este caso, basado de nuevo en la metodología de superficie respuesta, se planteó considerando como variables independientes la temperatura de entrada del aire al atomizador (100-170 °C), la proporción de GA y MD (4-12 g/100 g de licuado de pomelo) y el contenido de CMC y WPI (0-2 g/100 g de licuado de pomelo), concentraciones seleccionadas en base a experiencias previas (Shavakhi et al. 2012; Kaur et al. 2013; Igual et al. 2014). En cuanto a las variables respuesta se consideraron las mismas que en el Capítulo I: la humedad, expresada en solutos de pomelo (x_w^{SP}), luminosidad (L^*), ángulo de tono (h_{ab}^*), (Croma (C_{ab}^*), porosidad (ε) y rendimiento en materia seca (RMS). Las experiencias se realizaron de manera aleatoria, con un total de 59 experiencias según el diseño compuesto central rotatable ortogonal (Tabla II.1.1).

II.I.2.3. Preparación de la muestra y condiciones del equipo

La preparación de la muestra a atomizar, su caracterización a nivel de °Brix y contenido en agua y la atomización fue siguiendo el mismo protocolo descrito en el Capítulo I, excepto las formulaciones preparadas y la temperatura de entrada del aire al atomizador que variaron según lo especificado en la Tabla II.I.1. Con el fin de trabajar, para las 59 experiencias previstas, con la misma materia prima, se preparó un lote homogéneo de licuado de pomelo, que se formuló y mantuvo congelado a -20 °C hasta su uso, previa descongelación a 4 °C en las 24 h anteriores. Los productos en polvo obtenidos de los diferentes tratamientos fueron envasados al vacío y se conservaron en un desecador con silicagel a temperatura ambiente hasta realizar los análisis.

II.I.2.4. Análisis de las variables respuesta

Las variables respuesta se analizaron según lo descrito en el Capítulo I.

II.I.2.5. Análisis estadístico

Se aplicó la metodología de superficie respuesta descrita en el Capítulo I.

Tabla II.I.1. Matriz del diseño experimental aplicado y resultados experimentales del contenido en agua (x_w^{SP}), luminosidad (L^*), ángulo de tono (h_{ab}^*), croma (C_{ab}^*), porosidad (ϵ) y rendimiento en materia seca (RMS) de los productos atomizados.

Exp ⁽¹⁾	T ⁽²⁾	GA ⁽³⁾	MD ⁽⁴⁾	CMC ⁽⁵⁾	WPI ⁽⁶⁾	$x_w^{SP(7)}$	L^*	h_{ab}^*	C_{ab}^*	ϵ (%)	RMS ⁽⁸⁾
1	120	6	1	0	0	0.132	85.9	74.5	15.5	74.76	45.8
2	120	1	6	0	1	0.131	85.3	73.1	17.2	60.84	42.8
3	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.112	92.2	88.5	5.7	70.61	38.1
4	170	3.5	3.5	0.5	0.5	0.06	90	83	9.1	70.86	35.5
5	120	1	1	0	0	0.091	46	57	37	0	8.8
6	150	6	1	0	0	0.065	90.2	84	10.6	65.21	52
7	120	6	1	1	0	0.117	90	85.2	10.1	75.04	19.7
8	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.106	91	85.7	9.2	69.13	22.7
9	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.119	90	83.6	12.7	70.27	27.8
10	135	3.5	3.5	0	0.5	0.104	88.8	78.2	12.9	71.12	49
11	120	1	6	1	1	0.125	87.4	78.7	16.5	67.1	24.2
12	150	1	1	1	0	0.067	84.4	73	18.9	69.5	15.5
13	120	1	6	0	0	0.123	79	67.2	24	0	31
14	135	3.5	9.44	0.5	0.5	0.096	90.9	78.6	8.7	67.87	29.5
15	150	1	6	1	1	0.085	90.8	79.6	7.3	76.73	19.8
16	120	6	6	0	1	0.149	90.2	87	5.3	71.98	33.9
17	120	1	6	1	0	0.082	91.8	87.4	7.5	76.16	23.2
18	150	1	1	1	1	0.066	87.6	78	13.5	70.37	25.5
19	120	6	1	1	1	0.145	88	87	6.8	69.27	15.7
20	150	1	1	0	0	0.081	63.8	61.3	37	0	35.7
21	135	3.5	0	0.5	0.5	0.101	83.6	84.0	8.2	71.89	21.6
22	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.067	89	87.4	5.3	71.62	38.4
23	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.069	91.7	87.9	7.3	69.77	36.9
24	120	6	6	1	1	0.171	92	81	5.3	73.71	28.4
25	135	0	3.5	0.5	0.5	0.123	75	69.9	21.7	56.13	25.6
26	150	1	6	0	0	0.066	82	74.1	15.1	68.87	44.4
27	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.125	85	78.5	10	68.73	31
28	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.114	90	89.6	5.8	69.55	29
29	150	6	1	0	1	0.099	89.2	86.5	8.7	72.22	43.2
30	135	9.44	3.5	0.5	0.5	0.102	92	88	6.3	73.02	36.5
31	135	3.5	3.5	0.5	1.7	0.154	88	87.9	7.8	66.79	38.5
32	150	6	1	1	0	0.080	87.9	85.8	9.8	73.67	34.4
33	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.116	84.8	83.4	10.5	67.08	27.3
34	150	6	6	1	1	0.055	91.8	88.7	5.1	69.52	28.6
35	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.093	88.7	82.1	6.9	68.65	37
36	150	1	6	0	1	0.040	90.8	84.3	7.1	72.22	59
37	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.081	89.7	76.7	8.8	70.24	28.5
38	150	6	6	1	0	0.058	88.4	73.4	9.5	70.88	26.5
39	135	3.5	3.5	0.5	0	0.106	87.9	74	11.5	72.86	28.7
40	120	6	1	0	1	0.100	86.1	71.3	10.5	72.97	54.8
41	120	1	1	1	1	0.103	69.2	68.9	17.3	0	23.7
42	150	6	6	0	1	0.094	91	74.9	7.9	71.15	55
43	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.103	88.3	74.8	9	73.3	27.2
44	135	3.5	3.5	1.7	0.5	0.145	89	71.6	9.5	76.34	15.2
45	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.114	87.7	83.5	9.5	70.27	28.1
46	150	6	6	0	0	0.084	89.6	76.8	9.7	71.66	46.4
47	100	3.5	3.5	0.5	0.5	0.148	72	64.9	24.2	65.68	25.1
48	120	1	1	0	1	0.094	63.4	62.2	31.5	0	25.9
49	150	1	1	0	1	0.061	66.9	63.3	31.6	0	43.5
50	120	1	1	1	0	0.116	72	60.2	23.8	0	20.6
51	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.117	89.2	78.2	8.9	71.42	29.4
52	120	6	6	0	0	0.189	89.8	76	8.9	72.44	41.3
53	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.094	87.4	85	7.5	71.78	38.7
54	120	6	6	1	0	0.103	89.2	72.5	8.8	78.76	25.9
55	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.127	86	85	8	71.93	38.2
56	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.095	89.2	83	7.5	71.2	39.1
57	135	3.5	3.5	0.5	0.5	0.120	85.8	77.2	11.5	71.47	34.6
58	150	6	1	1	1	0.052	91.5	84.2	6.5	76.07	33.8
59	150	1	6	1	0	0.037	86.5	69.9	12	78.68	29

⁽¹⁾Experiencia, ⁽²⁾Temperatura del aire que entra al atomizador (°C), ⁽³⁾Goma Arábica (g/100 g licuado con biopolímeros), ⁽⁴⁾Maltodextrina (g/100 g licuado con biopolímeros), ⁽⁵⁾Carboximetilcelulosa (g/100 g licuado con biopolímeros), ⁽⁶⁾Aislado de proteína de suero de leche (g/100 g licuado con biopolímeros), ⁽⁷⁾Humedad (g agua /100 g de solutos del pomelo), ⁽⁸⁾Rendimiento en materia seca (g solutos en el polvo/100 g solutos en el licuado con biopolímeros).

II.1.3. Resultados y discusión

La humedad y °Brix del licuado de pomelo utilizado en esta parte del trabajo fue 90.6 ± 1.3 g agua/100 g licuado y 10.75 ± 0.15 g sólidos solubles/100 g fracción líquida. Los resultados obtenidos para cada una de las variables respuesta estudiadas en las diferentes muestras en polvo obtenidas se presentan en la Tabla II.I.1 y los modelos finales reducidos que proporciona la metodología de superficie de respuesta, aplicada de la misma forma que en el Capítulo I a las variables respuesta significativas, en la Tabla II.I.2. Los modelos que resultaron significativos ($p < 0.05$), presentaron un coeficiente de determinación ajustado, R^2 , entre 0.50 y 0.93. La concentración de WPI nunca presentó correlación cuadrática ni interacciones significativas ($p > 0.05$) con el resto de variables.

II.I.3.1. Contenido en agua

Como ya se ha comentado, una alta humedad en un producto atomizado favorece la pegajosidad interpartícula y también la de las partículas con el equipo, provocando un mal funcionamiento del mismo y problemas de rendimiento (Roos & Silalai 2011). El contenido en agua se ha referido, al igual que en el Capítulo I, a los solutos propios del pomelo. El máximo valor de humedad (0.189 g agua/g SP) lo presentó la muestra con un 6 % MD y 6 % GA y atomizada a 120 °C (experiencia 52, Tabla II.I.1), mientras que su mínimo (0.037 g agua/g SP) se obtuvo en la muestra con 1 % GA, 6 % MD y 1 % CMC, atomizada a 150 °C (experiencia 59, Tabla II.I.1). La correlación de la humedad con las variables de proceso estudiadas, aunque fue significativa, fue la que mostró el coeficiente de correlación más bajo ($R^2=0.50$). El análisis estadístico de los resultados mostró que las únicas variables que influyeron significativamente ($p < 0.05$) en la humedad fueron la temperatura de atomización, de forma negativa, y la concentración de GA, de forma positiva (Tabla II.I.2). Es decir que el producto en polvo con menor humedad se obtendrá al atomizar a alta temperatura y con un porcentaje bajo de GA añadida. Estos resultados coinciden con lo observado en el Capítulo I para estas 2 variables de proceso.

Tabla. II.I.2. Coeficientes de regresión, coeficiente de determinación ajustado (R_{adj}^2) y error estándar de la estima (EE) del modelo polinómico ajustado para predecir las variables respuesta en función de las variables independientes.

Y_i	β_0	Lineal					Cuadrático				Interacción					R_{adj}^2	EE
		β_1	β_2	β_3	β_4	β_5	β_1^2	β_2^2	β_3^2	β_4^2	β_{12}	β_{13}	β_{23}	β_{24}	β_{34}		
x_w^{SP}	0.319	-0.0017	0.0029	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50.1	0.02
L^*	-126.07	2.119	13.648	12.360	17.943	2.304	-0.00606	-0.313	-0.20403	-	-0.0429	-0.045	-0.638	-2.152	-1.487	84.0	3.43
h_{ab}^*	-102.04	2.251	3.393	2.085	18.657	4.79	-0.00078	-	-13.3	-	-	-	-0.595	-	-	59.2	5.78
C_{ab}^*	178.33	-1.908	-6.992	-3.381	-22.821	-3.35	0.00665	0.338	-	6.07	-	-	0.429	1.70	1.31	84.3	3.09
ϵ	-173.82	1.083	50.87	15.949	33.14	-	-	-1.052	-0.7915	-	-0.209	-	-1.79	-5.551	-	73.2	12.1
RMS	-0.653	0.234	2.869	1.541	-16.88	-	-	-	-	-	-	-	-0.440	-	-	59.5	6.74

β_0 : constante del modelo; β_i : coeficientes de regresión estimados para los efectos lineales; β_i^2 : coeficientes de regresión estimados para los efectos cuadráticos; β_{ij} : coeficientes de regresión estimados para las interacciones. Subíndices: i=1: Temperatura del aire que entra al atomizador (°C); i=2: Goma Arábica (g/100 g licuado con biopolímeros), i=3: Maltodextrina (g/100 g licuado con biopolímeros); i=4: Carboximetilcelulosa (g/100 g licuado con biopolímeros); i=5: aislado de proteína de suero de leche (g/100 g licuado con biopolímeros); x_w^{SP} : humedad (g agua /100 g solutos del pomelo), L^* : luminosidad, h_{ab}^* : ángulo de tono, C_{ab}^* : croma, ϵ : porosidad (%), RMS: rendimiento en materia seca (g solutos en el polvo/100 g solutos en el licuado con biopolímeros).

II.1.3.2. Porosidad

La porosidad de las diferentes muestras (Tabla II.I.1) mostró una correlación significativa ($p < 0.05$) y positiva con todas las variables de proceso consideradas, excepto con WPI (Tabla II.I.2). No obstante, se observaron algunos efectos cuadráticos negativos de GA y MD, así como algunas interacciones negativas entre T, GA, MD y CMC, que hacen que finalmente la mayor porosidad se obtenga, si la temperatura de atomización es baja o la concentración de CMC es baja, al añadir alta concentración de GA y baja de MD. Sin embargo, al atomizar a alta temperatura o con alta cantidad de CMC, la porosidad es mayor al añadir baja concentración de GA y alta de MD (Fig. II.I.1). Cuando sólo se utiliza GA y CMC, también se recomendaba añadir poca cantidad de la primera si la concentración de la segunda era alta (Capítulo I).

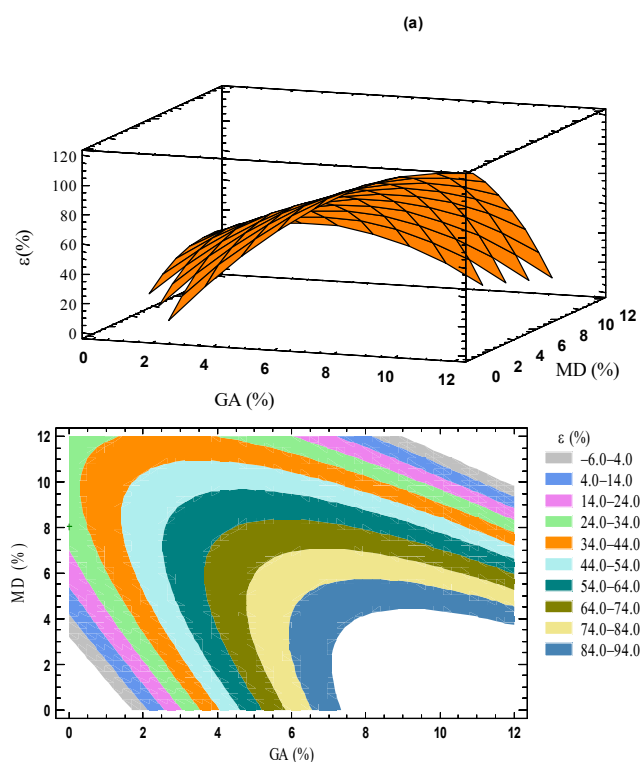


Figura II.I.1. Superficie de respuesta (arriba) y gráfico de contorno (abajo) del modelo predicho para la porosidad en función del contenido en goma arábica (GA) y maltodextrina (MD) (g biopolímero/100 g licuado con biopolímeros). Gráficos obtenidos a temperatura de atomización de 100 °C (a), 135 °C (b), 170 °C (c) y concentración del resto de biopolímeros intermedia (WPI=0.85 %, CMC=0.85 %).

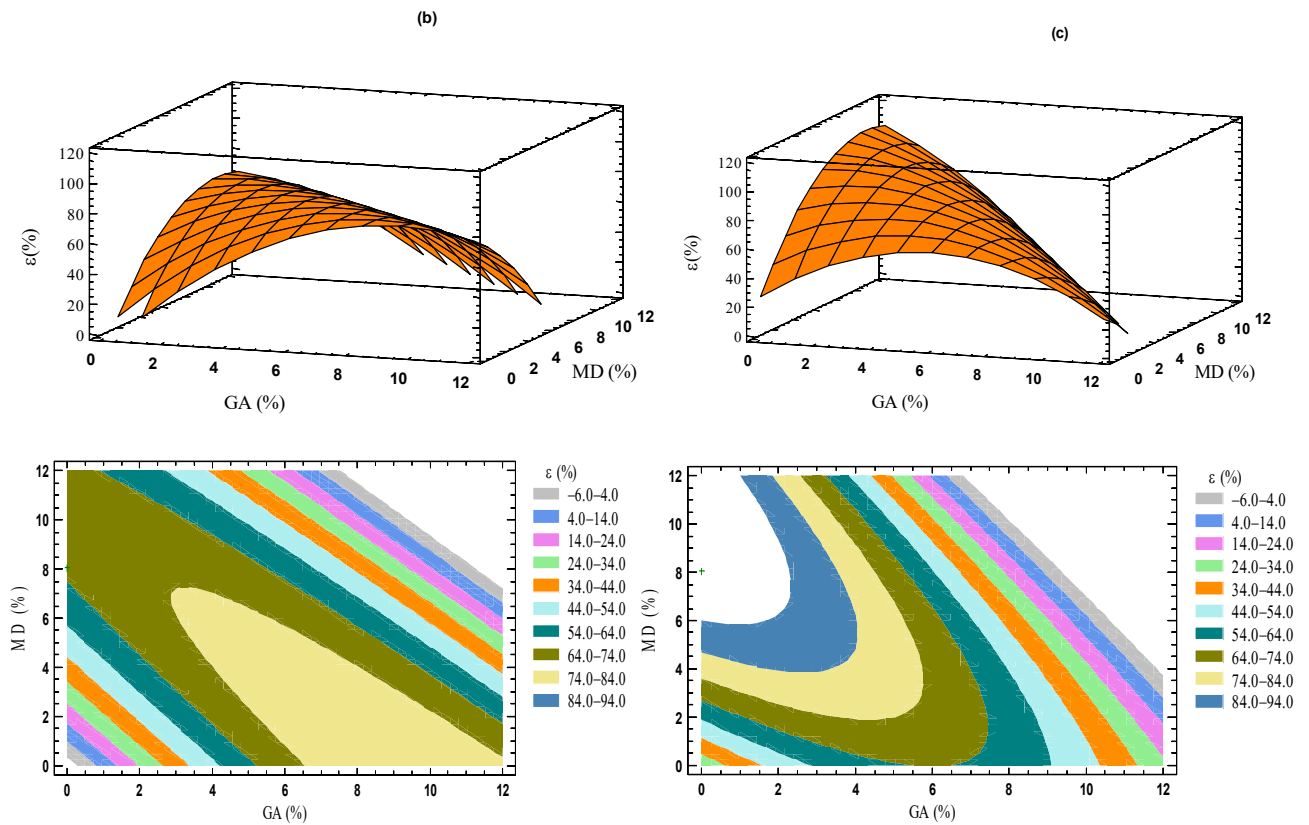


Figura II.I.1. (Continuación) Superficie de respuesta (arriba) y gráfico de contorno (abajo) del modelo predicho para la porosidad en función del contenido en goma arábica (GA) y maltodextrina (MD) (g biopolímero/100 g licuado con biopolímeros). Gráficos obtenidos a temperatura de atomización de 100 °C (a), 135 °C (b), 170 °C (c) y concentración del resto de biopolímeros intermedia (WPI=0.85 %, CMC=0.85 %).

II.I.3.3. Color

Los valores de L^* , a^* y b^* de las diferentes muestras aparecen en la Tabla II.I.1 y en la Fig. II.I.2. Como puede observarse, los valores de L^* variaron entre 46 y 92.2. Con los valores de a^* y b^* puede calcularse el tono y pureza de las muestras (Tabla II.I.1), que puede apreciarse también de forma gráfica en la Fig. II.I.2, todo ello según lo descrito en el Capítulo I. Los valores de h^*_{ab} variaron entre 57 y 89.6 y los de C^*_{ab} entre 5.1 y 37.

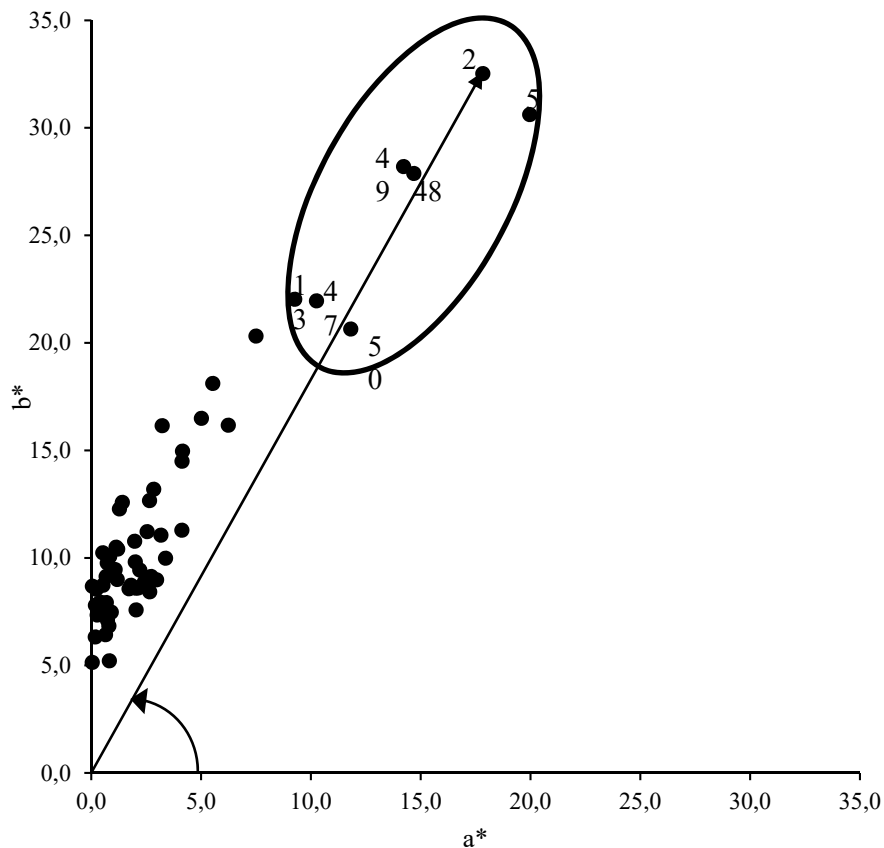


Figura II.1.2 Plano cromático (a^* , b^*). Las muestras que se encuentran rodeadas por el óvalo son las que presentan menor ángulo de tono y mayor cromas. El número que las identifica se corresponde el número de experiencia según la Tabla II.1.1. Para la muestra 20, el ángulo de tono y el cromas aparecen indicados con flechas.

Coincidiendo con lo ya observado en el Capítulo I, las muestras que presentaron menor luminosidad y ángulo de tono y mayor pureza fueron las que presentaron un aspecto totalmente apelmazado, tanto que no fue posible determinar su porosidad por el método experimental utilizado con el resto de muestras. En este sentido se confirma que el color más deseable para el pomelo en polvo será el que responda a una mayor L^* y h^*_{ab} y menor C^*_{ab} . En este caso, esto se consigue cuando el pomelo licuado se formula con un contenido medio-alto en biopolímeros y se atomiza a una temperatura que podrá ser mayor cuanto menor sea el contenido en biopolímeros añadido. En lo que respecta al color, en el Capítulo I también se recomendaba un contenido medio-alto de GA, medio de CMC y T intermedia. La menor cantidad de biopolímeros implicada en aquél caso, justifica la necesidad de trabajar a temperaturas intermedias. En este sentido, el efecto del proceso de atomización en el color parece que se relaciona más con el color que aportan los biopolímeros que con el propio efecto que pueda tener la temperatura en reacciones de pardeamiento, por ejemplo.

II.I.3.4 Rendimiento del proceso

El rendimiento en materia seca (Tabla II.I.1), en este caso, varió entre 8.8 y 59 g solutos en el polvo/100 g solutos en la mezcla de entrada al atomizador. Según se observa en la Tabla II.I.2, tanto el aumento de la temperatura de atomización como de la concentración de todos los biopolímeros, excepto WPI, contribuyeron a aumentar significativamente ($p < 0.05$) el rendimiento. Yousefi et al. (2011) también encontraron que la temperatura del aire que entra al atomizador es un factor influyente en el rendimiento del proceso, lo que puede atribuirse a la mayor eficiencia de la transferencia de calor y masa que ocurre cuando se utilizan temperaturas de aire de entrada superiores a 135°C. También se observó una interacción negativa entre GA y MD, de manera que cuando la concentración de MD es pequeña, al aumentar GA, aumenta RMS (Fig. II.I.3).

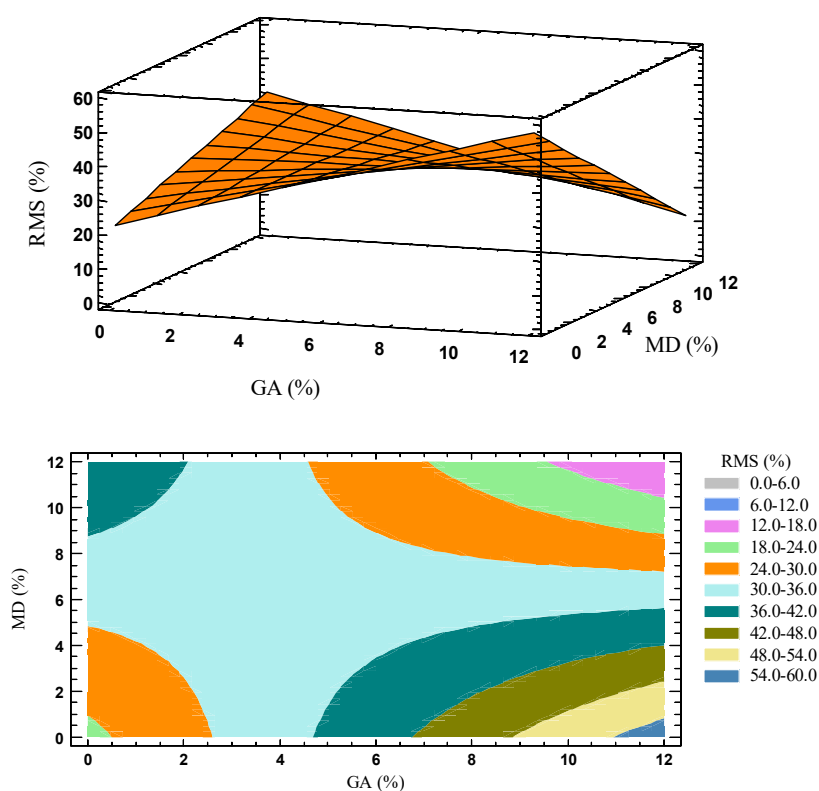


Figura II.I.3 Superficie de respuesta (arriba) y gráfico de contorno (abajo) del modelo predicho para el rendimiento en materia seca (RMS, g materia seca en el polvo/100 g materia seca en el licuado con biopolímeros) en función del contenido en goma arábica (GA) y maltodextrina (MD) (g biopolímero/100 g licuado con biopolímeros). Superficie de respuesta obtenida a temperatura de atomización intermedia (135 °C) y concentración intermedia del resto de biopolímeros (WPI = 0.85 %, CMC = 0.85 %).

En cambio, cuando se añade mayor cantidad de MD, es mejor disminuir la cantidad de GA para conseguir mayor rendimiento. El máximo rendimiento en materia seca se obtiene al añadir poca MD y mucha GA, siendo más desfavorable mezclar mucha MD y poca GA. En el Capítulo I también se recomendaba añadir una cantidad alta de GA. No obstante, en aquél caso se observaba un efecto negativo de la CMC que ahora no se observa. En este sentido, parece que la presencia de MD mitiga el efecto perjudicial de la CMC, desde el punto de vista del rendimiento. Sin embargo, como en este caso no se recomienda utilizar mucha MD, se confirma que tampoco es recomendable incorporar CMC.

II.1.3.5. Optimización del proceso

De la misma forma que se hizo en el Capítulo I, se quiso conocer el papel de la temperatura de atomización y de los biopolímeros, por una parte, en la calidad del producto y, por otra, en el rendimiento del proceso. En este sentido, cuando se maximiza el rendimiento, el mejor proceso resulta de aplicar una temperatura al aire que entra al atomizador de 136 °C y formular el licuado de pomelo con 9.43 % GA, 0 % MD, 0 % WPI y 0.04% CMC. El priorizar la calidad del producto basándose en mejorar sus características de color (luminosidad y ángulo de tono máximos y croma mínimo), una humedad baja y porosidad alta, lleva a recomendar 165 °C, 5.8 % GA, 2.7 % MD, 1.7 % WPI y 0.48 % CMC.

Si el objetivo es conseguir el producto con las mejores propiedades físicas, pero también con el máximo rendimiento, entonces la temperatura debería ser 148 °C con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI. Comparando este resultado con el obtenido en el Capítulo I (141.9 °C, 12.82 % de GA), se puede observar, por una parte, que la temperatura recomendada para el aire que entra al atomizador es del mismo orden. Además, en este caso, se confirma que el uso de CMC no es adecuado para este producto. Por otra parte, se comprueba que la suma de GA+MD+WPI (12,05 %) coincide prácticamente con el 12.82 % de GA que se recomienda añadir cuando ésta se utiliza sola. En ese sentido, sí que parece que el uso moderado tanto de MD como de WPI permitirían disminuir el coste asociado al uso único de GA. Cuando se compara el valor predicho que tendrían las propiedades de los productos obtenidos trabajando en las condiciones óptimas propuestas en el Capítulo I ($x_w=0.12$ g agua/g_{SP}, $L^*=92.14$, $h^*_{ab}=80.44$, $C^*_{ab}=8.74$, $\varepsilon=70.91$ %, RMS=63.97 g solutos en el polvo/100 g solutos en el licuado con biopolímeros) y en el II ($x_w=0.0626$, $L^*=94.09$, $h^*_{ab}=92.51$, $C^*_{ab}=5.21$, $\varepsilon=69.29$ %, RMS=59 g solutos en el polvo/100 g solutos en el licuado con biopolímeros), se observa

que en ambos casos los polvos atomizados serían muy similares. En concreto, el uso de GA+MD+WPI frente a la incorporación de sólo GA, en las proporciones propuestas, supondría la obtención de un producto con menor humedad y mejor color, aunque con una porosidad ligeramente inferior y con algo menos de rendimiento. Con estos resultados tan similares, que no permiten decantarse por una u otra opción, y que parecen apuntar a que lo importante es mantener una proporción final de biopolímeros entorno al 12 %, con al menos un 9.5 % de GA, se quiso comprobar la eficacia del uso de OSA, en sustitución de la GA y/o MD, en este producto.

II.II. Interés de incorporar almidón modificado con anhídrido octenil succínico.

II.II.1. Introducción

Con el fin de reducir los costes del proceso de atomización, se planteó la incorporación de almidón modificado con anhídrido octenil succínico (OSA) a la formulación óptima obtenida en el Capítulo II.I, para sustituir a la GA y/o a la MD. Por otra parte, también se quiso estudiar si el hecho de incorporar OSA podría permitir disminuir o evitar el uso de alguno de los otros biopolímeros ensayados hasta el momento, con el fin de simplificar la formulación.

El OSA parece que tiene un gran potencial. Este biopolímero se ha utilizado ya como sustituto de algunos componentes alimenticios como la goma arábiga, las grasas y las proteínas y se caracteriza por ser un polímero anfifílico, obtenido mediante modificaciones químicas para mejorar las propiedades químicas, fisicoquímicas y funcionales del almidón nativo. La estabilización mediante OSA consiste en la ganancia de elementos hidrófobos (grupos octenilos) por parte de la molécula de almidón, que es hidrófila por naturaleza y, por tanto, tiene una alta afinidad por el agua, baja solubilidad y limitada manipulación. Los almidones modificados, con propiedades mejoradas, alta solubilidad y relativamente baja viscosidad (Dokić et al. 2012), son cada vez más importantes, no sólo por su bajo coste sino por sus numerosas aplicaciones industriales, particularmente en emulsificación, encapsulación, formación de películas y recubrimientos, elaboración de geles, etc., (Altuna et al. 2018). Cuando los gránulos de almidón OSA se disuelven en agua, migran a la interfase aire/agua formando una capa en la cual los grupos hidrófobos se orientan hacia el aire mientras que el resto del almidón se dispersa en el agua, reduciendo así la tensión superficial y por tanto mejorando la humectabilidad. Por ello, los almidones OSA son utilizados como emulsificantes y estabilizantes en muchos productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos y en diferentes sistemas aceite-agua. Como resultado de estas excelentes propiedades, el OSA se ha utilizado ampliamente para hacer microcápsulas sólidas que contienen compuestos hidrofóbicos: aceites esenciales, aceites de pescado, aceites de frutas y aceite de la dieta. Hay estudios en que se compara el efecto encapsulante del OSA con las b-ciclodextrinas, maltodextrina y proteína de la leche, mostrando mejor rendimiento en la retención de compuestos (Sweedman et al. 2013; Li 2014). También se ha observado que es un excelente protector de la vitamina C y otros compuestos bioactivos como el ácido linoleico, la vitamina A y algunos carotenoides

(Gonçalves et al. 2016; Janiszewska-Turak 2017; He et al. 2016) y que no altera el sabor ni el aroma de la fruta, en estudios realizados con maracuyá, además de que es fácil de diluir en agua fría (Borrmann et al. 2013; Paim et al. 2016; Ramakrishnan et al. 2018)

El almidón OSA es un aditivo (E-1450) permitido por la legislación incluso en alimentos para lactantes (Reglamento (CE) nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios). Tiene propiedades digestivas diferentes a las del sustrato nativo, sobre todo porque se digiere lentamente o es completamente resistente a la digestión. Los almidones se pueden dividir en tres familias de moléculas: almidón digerido rápidamente (RDS), almidón digerido lentamente (SDS) y almidón resistente (RS), teniendo en cuenta su susceptibilidad relacionada con la digestión. La modificación con OSA aumenta los niveles de SDS y RS más que otras modificaciones tales como hidroxipropilación, acetilación o reticulación en diversas combinaciones. Esto es positivo ya que la fibra funcional de alta SDS se considera beneficiosa para la nutrición humana. Esto ha sido probado in vivo en seres humanos, donde se comprobó la menor respuesta glucémica tras su ingesta y los efectos en otras funciones gastrointestinales (Wolf et al. 2001).

Para conocer el interés de incorporar OSA en la formulación optimizada en el apartado II.I de esta Tesis y, al mismo tiempo tratar de simplificarla, en esta parte del estudio se planteó un diseño que considera diferentes modificaciones de la formulación del licuado de pomelo optimizada. A los polvos obtenidos después de su atomización se les analizaron los mismos parámetros estudiados en los capítulos anteriores: humedad del polvo obtenido (x_w), porosidad (ϵ), rendimiento en materia seca (RMS) y color. Además, se quiso incluir un estudio del impacto de los diferentes biopolímeros en los compuestos bioactivos (vitamina C y fenoles totales) y en la actividad antioxidante (AOA) de la fruta.

II.II.2. Materiales y métodos

II.II.2.1. Materia prima

La fruta empleada fue pomelo (*Citrus paradisi*, variedad. Star Ruby), adquirido en un supermercado local de la ciudad de Valencia, España, seleccionando las frutas en base a su color, tamaño y ausencia de daños, la misma utilizada en las etapas anteriores. Los biopolímeros utilizados en este caso fueron también maltodextrina (MD) con un valor de 16.5-19.5 de dextrosa equivalente (DE), goma Arábiga (GA, E-414), carboximetilcelulosa (CMC, E-466), suministrados por la empresa Alfa Aesar (Alemania) y el aislado de proteína de suero

de leche (WPI, LACPRODAN® DI-9212 de Arla Foods Ingredients, Dinamarca). Además se incorporó un almidón modificado, el Octenil Succinato Sódico de almidón (OSA, E-1450, CLEARGUM CO 01) de la empresa Roquette Laisa (Valencia, España).

II.II.2.2. Diseño experimental

A partir del óptimo obtenido en el apartado anterior, se planteó un diseño experimental teniendo en cuenta las combinaciones obtenidas después de intercambiar las concentraciones de GA por MD y viceversa; utilizando sólo GA en la misma proporción de la suma de las proporciones de GA y MD y sustituyendo éstas por OSA, además de reduciendo la cantidad de WPI (Tabla II.II.1). La formulación del óptimo se repitió con el mismo lote de pomelo utilizado para el resto de formulaciones, para obviar la variabilidad debida a la propia fruta (Exp. 1, Tabla II.II.1).

Tabla II.II.1 Concentración de biopolímeros utilizado para cada una de las formulaciones estudiadas. El óptimo estadístico es el óptimo obtenido en el apartado II.I.

Exp. ⁽¹⁾	GA ⁽²⁾	MD ⁽³⁾	OSA ⁽⁴⁾	WPI ⁽⁵⁾
<i>Óptimo</i>	9.44	1.25	0	1.44
1	9.44	1.25	0	1.44
2	1.25	9.44	0	1.44
3	10.7	0	0	1.44
4	10.7	0	0	0.50
5	10.7	0	0	0.00
6	0	10.7	0	0
7	0	1.25	9.44	1.44
8	0	1.25	9.44	0
9	9.44	0	1.25	1.44
10	9.44	0	1.25	0
11	0	0	10.7	1.44
12	0	0	10.7	0

⁽¹⁾Experiencia, ⁽²⁾ Goma arábica (g/100g licuado con biopolímeros), ⁽³⁾ Maltodextrina (g/100g licuado con biopolímeros), ⁽⁴⁾ Octenil succinato sódico de almidón (g/100g licuado con biopolímeros), ⁽⁵⁾ Aislado de proteína de suero de leche (g/100 g licuado con biopolímeros).

II.II.2.3. Preparación de la muestra y condiciones del equipo

La muestra a atomizar se preparó siguiendo el mismo protocolo descrito en el Capítulo I. El licuado de pomelo recién obtenido y después de formulado según lo descrito en la Tabla II.II.1, se caracterizó en cuanto a °Brix y contenido en agua (Capítulo I). El atomizador y las condiciones impuestas al equipo fueron las mismas que las descritas en el Capítulo I, pero utilizando una temperatura de entrada del aire al atomizador constante obtenida de la optimización del proceso en el Capítulo II.I, es decir, de 148 °C. Los productos en polvo obtenidos de los diferentes tratamientos fueron envasados al vacío y se conservaron en un desecador con silicagel a temperatura ambiente hasta realizar los análisis.

II.II.2.4. Análisis de las muestras atomizadas

La humedad del polvo obtenido, la porosidad, el rendimiento en materia seca y el color se analizaron según lo descrito en el Capítulo I. Además, se calculó también la diferencia de color (ΔE) de cada producto en polvo obtenido con el correspondiente a la formulación del óptimo, según la ecuación 1.

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (1)$$

La vitamina C se determinó mediante HPLC (Jasco, Italia). Para su cuantificación, se redujo el ácido deshidroascórbico a ácido ascórbico mezclando 0.5 g de polvo con 2 mL de una disolución de DL-dithiothreitol (20 g/L, Scharlab S.L, España) durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad (Sánchez-Mata et al. 2000; Sánchez-Moreno et al. 2003). Posteriormente, 1 g de esta mezcla se extrajo con 9 mL de ácido oxálico al 0.1% (Scharlab S.L, España) agitando durante 3 min y filtrando a través de un filtro de membrana de 0.45 mm antes de la inyección. Se utilizó una columna KROMAPHASE100-C18, 5mm (4.6x250mm) (Scharlab S.L, España) con fase móvil de ácido oxálico al 0.1 %. El volumen de inyección fue de 20 mL y la velocidad del flujo de 1 mL/min. La detección se realizó a 243 nm (detector UV-visible MD-1510) y a 25 °C. Los patrones de ácido L (+) ascórbico (Scharlab S.L, España) utilizados para la elaboración de la recta patrón se prepararon en un intervalo de concentraciones entre 10 y 530 ppm. El contenido en vitamina C se calculó como mg de ácido ascórbico por 100 g de solutos del pomelo (mg AA/100g SP) según la ecuación 2.

$$m = \frac{m_i^p}{(1 - x_{b,h}^p) * x_{SP/ST}} \quad (2)$$

Donde m es la cantidad del compuesto analizado referido a los solutos del pomelo (mg/100g SP), m_i^p es la masa del compuesto analizado en el polvo (mg/100g polvo), $x_{b,h}^p$ es la humedad del polvo en base húmeda (g agua/g polvo obtenido), $x_{SP/ST}$ es la fracción másica de solutos propios del pomelo (SP) respecto a los solutos totales (ST).

El extracto utilizado para la cuantificación de los fenoles totales se obtuvo a partir de la mezcla homogénea de 1 g de muestra con 9 mL de metanol:agua (70:30), en oscuridad y agitación magnética (400 rpm.; Multistirrer; Velp Scientifica, Usmate Velate, Italia), a temperatura ambiente durante 30 min. El producto obtenido fue centrifugado a 5867 x g a 4 °C durante 10 min (Eppendorf centrifuga 5804 R, Alemania). El contenido en fenoles totales se analizó en el sobrenadante recogido mediante el método colorimétrico de Folin–Ciocalteu (Selvendra & Ryden 1990; Benzie and Strain 1999). Para ello, se mezcló una alícuota de 250 mL del extracto con 15 mL de agua destilada y 1.25 mL de reactivo de Folin–Ciocalteu (Sigma-Aldrich, Alemania). Después de 8 min, se añadieron 3.75 mL de Na₂CO₃ anhidro al 7.5 % (Scharlab SL, España) hasta ajustar a un volumen final de 25 mL. La absorbancia fue medida a 765 nm (espectrofotómetro UV-visible V-1200 VWR International Eurolab S.L, España) después de 2 h de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad. El contenido en fenoles totales se expresó como mg de ácido gálico equivalente por 100 g de solutos del pomelo (mg GAE/100g SP) (Ec. 2) utilizando una curva patrón en un intervalo de concentraciones entre 0 y 1000 ppm de ácido gálico (Sigma-Aldrich, Schnellendorf, Alemania).

La actividad antioxidante de las muestras se evaluó empleando el radical estable 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrateel (DPPH) (Puupponen-pimiä et al. 2003), basado en la capacidad de las sustancias antioxidantes para captar radicales libres. Para esto se mide la absorbancia a tiempo inicial (A_C) a 515 nm con 3.9 mL del reactivo DPPH (0.030 g L⁻¹, Sharlau S.L, España) en un espectrofotómetro V-1200 (VWR International Europe bvba, Bélgica). Después se añade 0.1 mL del extracto y se vuelve a medir la absorbancia tras 5 min, cuando la reacción ha terminado (A_M). El porcentaje de DPPH se calculó a partir de la ecuación 3. Los resultados fueron expresados como milimoles de trolox equivalente (TE)/100 gramos de solutos de pomelo (mmol TE/100g SP), empleando una recta de calibrado en el intervalo de 8-125ppm.

$$\%DPPH = \frac{(A_C - A_M)}{A_C} \times 100 \quad (3)$$

II.II.2.5. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de la variancia (ANOVA). Para el análisis de los compuestos bioactivos se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson al 95% de nivel de significación. Para todo ello se utilizó el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII

II.II.3. Resultados y discusión

La humedad determinada para la muestra obtenida en las mismas condiciones que el óptimo presentado en el Capítulo I fue de 0.0645 g agua/100g SP, similar a la obtenida en el Capítulo II.I. En la Figura II.II.1 se presentan los valores de humedad de las muestras con diferente formulación analizadas. Las muestras con más agua fueron aquellas formuladas con GA y MD mientras que las que presentaron menor humedad fueron las que llevan en su formulación OSA, siendo la más baja la combinación de MD y OSA (Tabla II.II.1).

Estas muestras, a su vez, mostraron, en general, una porosidad mayor que el resto (Fig. II.II.2). Joardder et al. (2016) indican que uno de los factores más importantes que afectan a la porosidad es la humedad, cuanto más bajo es el contenido de agua de las muestras mayor es la porosidad. Este parámetro fue alto en todas las muestras estudiadas y varió entre un 70 y un 83

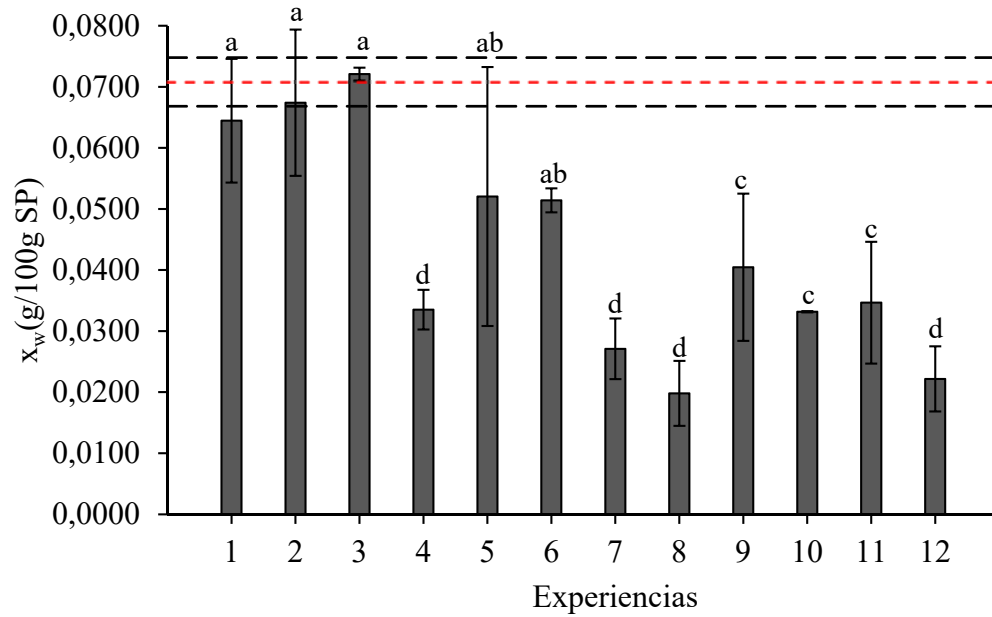


Figura II.II.1 Humedad de las muestras obtenidas de las diferentes experiencias de atomización (g agua en 100 g de solutos de pomelo). La línea roja (---) representa el valor promedio de los valores de humedad del óptimo obtenido en el Capítulo II.I y las líneas negras (---) representan la desviación estándar. Distintas letras (a-d) indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$). El número en el eje de las experiencias identifica las muestras correspondientes al número de experiencia según la Tabla II.II.1.

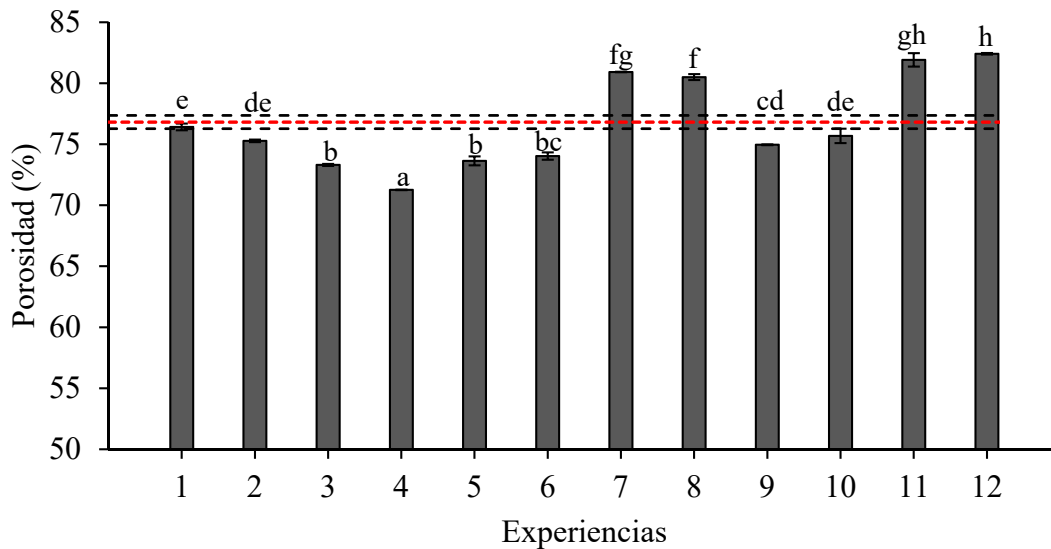


Figura II.II.2 Porosidad de las muestras obtenidas de las diferentes experiencias de atomización. La línea roja (---) representa el valor promedio de los valores de porosidad del óptimo obtenido en el Capítulo II.I y las líneas negras (---) representan la desviación estándar. Distintas letras (a-h) indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$). El número en el eje de las experiencias identifica las muestras correspondientes al número de experiencia según la Tabla II.II.1.

El rendimiento en materia seca calculado para cada una de las muestras estudiadas varió entre 45.44 % y 60.12 % y fue menor, en todos los casos, que el obtenido para las muestras atomizadas en las condiciones utilizadas para la obtención del óptimo indicado en el Capítulo II.I (Fig II.II.3). Éste no presentó diferencias con el obtenido en el apartado anterior.

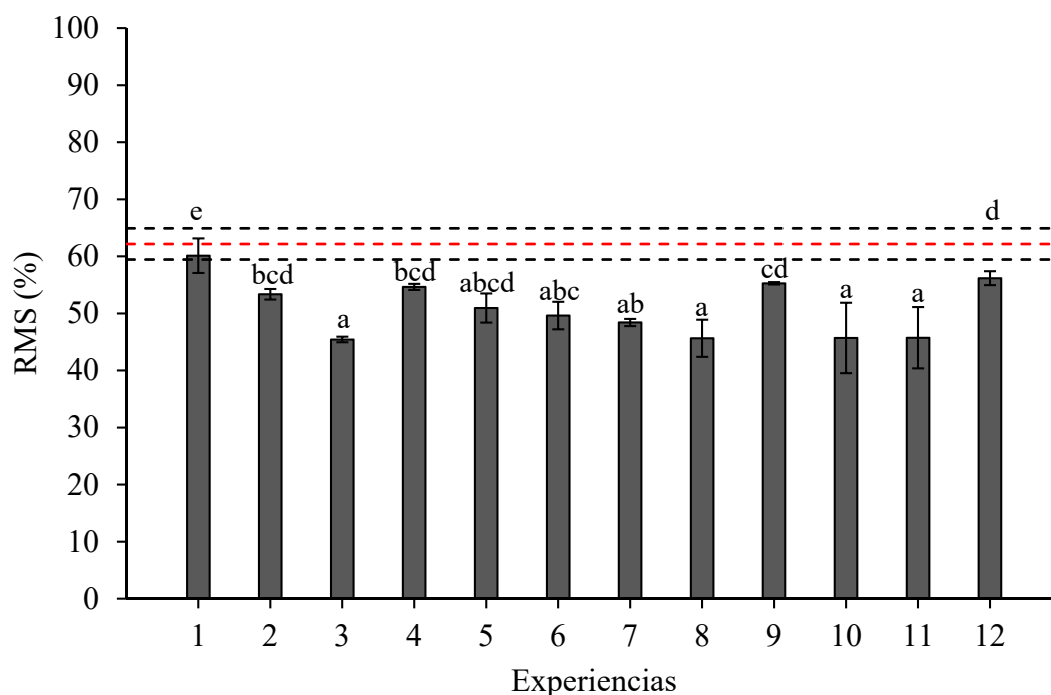


Figura II.II.3 Rendimiento en materia seca (g totales de sólidos secos / 100 g de sólidos secos de producto que entra en el atomizador). La línea roja (---) representa el valor promedio de los valores de RMS del óptimo obtenido en el Capítulo II.I y las líneas negras (---) representan la desviación estándar. Distintas letras (a-e) indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$). El número en el eje de las experiencias identifica las muestras correspondientes al número de experiencia según la Tabla II.II.1.

En cuanto a los parámetros de color, la Figura II.II.4 presenta los valores obtenidos para las coordenadas a^* y b^* . Las muestras que se encuentran dentro de la circunferencia son aquellas que se parecen más al óptimo obtenido en el Capítulo II.I. Aunque existen algunas diferencias en todos los parámetros, las formulaciones presentaron un color similar, siendo su tonalidad anaranjada. La luminosidad varió entre 85.8 y 91, el tono entre 60.4 y 77.2 y el croma entre 6.7 y 11.5. La muestra formulada con sólo OSA (experiencia 12, Tabla II.II.1) presentó los valores de h_{ab}^* y C_{ab}^* más altos. Al calcular la diferencia de color tomando como referencia la muestra obtenida en la experiencia 1 (Tabla II.II.1), se obtuvieron valores entre 0.34 y 4.66 (Fig. II.II.5), siendo la muestra que sólo está formulada con OSA la más diferente. En cualquier caso, los

cambios de color observados están en el límite de lo percibido por el ojo humano (Bodart et al. 2008).

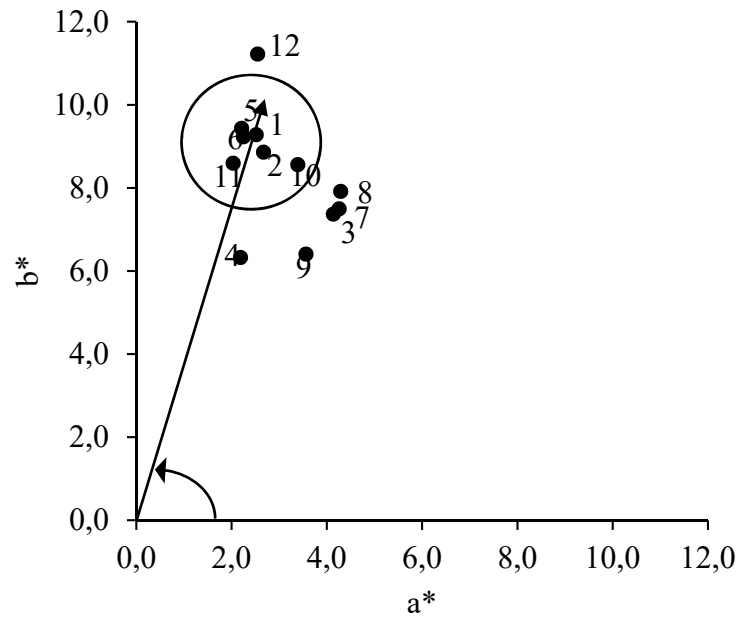


Figura II.II.4 Plano cromático (a^* , b^*). Las muestras que se encuentran rodeadas por la circunferencia son las que se acercan más a la formulación óptima. El número que las identifica se corresponde el número de experiencia según la Tabla II.II.1. Para la muestra 1, el ángulo de tono y el croma aparecen indicados con flechas.

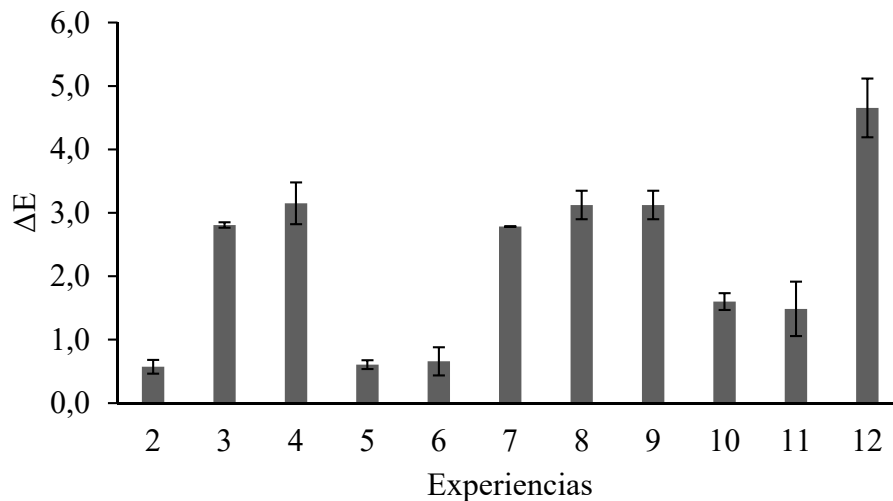


Figura II.II.5 Diferencia de color de las muestras obtenidas de las diferentes experiencias de atomización tomando como referencia la muestra obtenida de la experiencia 1 (Tabla II.II.1). El número en el eje de las experiencias identifica las muestras correspondientes al número de experiencia según la Tabla II.II.1.

La capacidad antioxidante fue similar en todos los casos y varió entre 0.91 y 1.25 mmol TE / 100 g SP (Fig. II.II.6). En cuanto al contenido en fenoles totales, éste varió entre 341 y 667 mg GAE/100g SP (Fig. II.II.7), siendo los de mayor contenido aquellas muestras formuladas con GA y MD (experiencias 1 y 2).

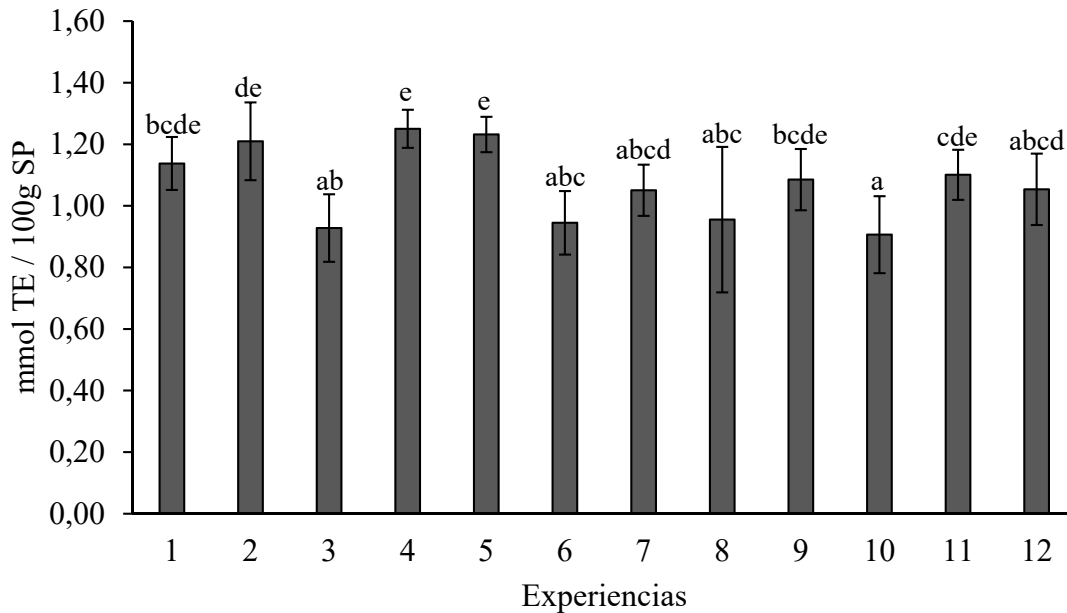


Figura II.II.6 Actividad antioxidante de las muestras obtenidas de las diferentes experiencias de atomización. Diferentes letras (a-e) indican diferencias significativas ($p < 0.05$). El número en el eje de las experiencias identifica las muestras correspondientes al número de experiencia según la Tabla II.II.1.

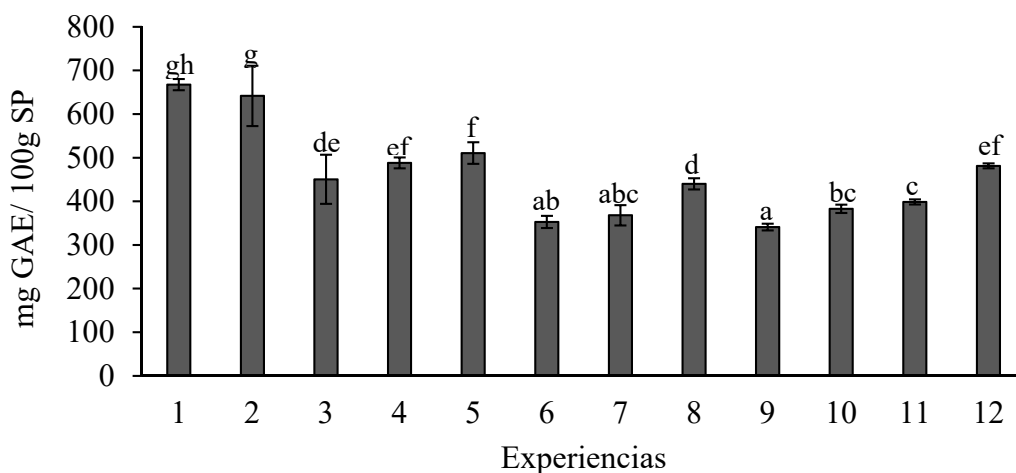


Figura II.II.7 Contenido en fenoles totales de las muestras obtenidas de las diferentes experiencias de atomización. Distintas letras (a-h) indican diferencias significativas ($p < 0.05$). El número en el eje de las experiencias identifica las muestras correspondientes al número de experiencia según la Tabla II.II.1.

En la Figura II.II.8, se muestran los resultados del contenido en vitamina C de las diferentes formulaciones estudiadas. Se observa que las muestras con mayor contenido de este compuesto son, además de la formulación correspondiente al óptimo, aquellas que contienen OSA, independientemente de la cantidad y del resto de biopolímeros que completan su formulación (experiencias 7-12).

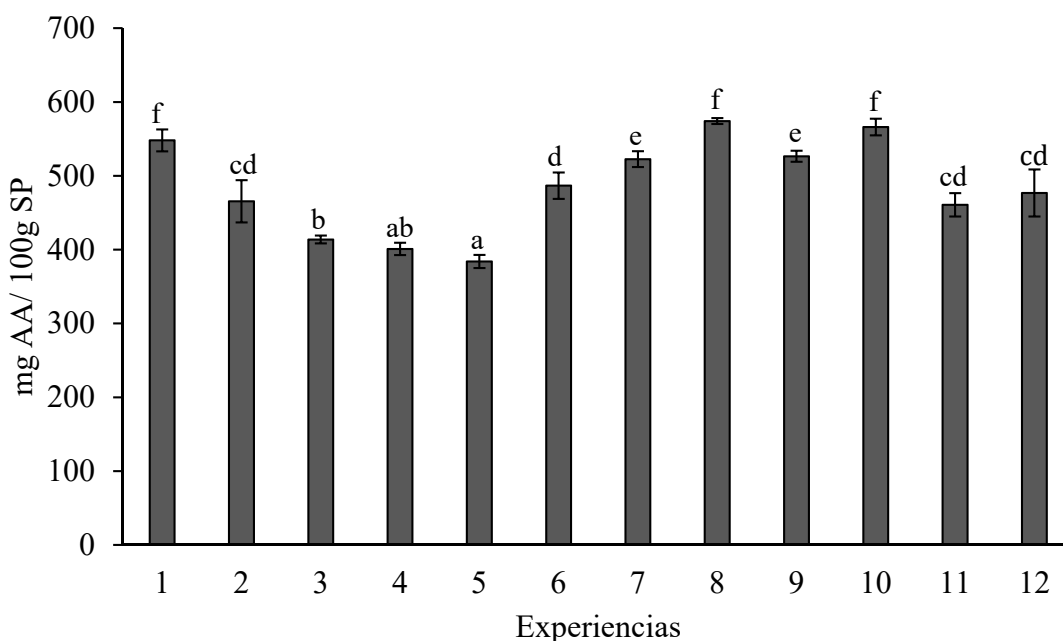


Figura II.II.8 Contenido de vitamina C para las muestras obtenidas de las diferentes experiencias de atomización. Distintas letras (a-e) indican diferencias significativas ($p < 0.05$). El número en el eje de las experiencias identifica las muestras correspondientes al número de experiencia según la Tabla II.II.1.

De los resultados obtenidos puede deducirse que la utilización de OSA en la formulación del pomelo en polvo podría ser interesante ya que se obtienen productos de menor humedad, mayor porosidad y con un mayor contenido en vitamina C. Sin embargo, estas muestras presentan menor contenido en compuestos fenólicos y menor rendimiento que la formulación óptima propuesta inicialmente, además de presentar las mayores diferencias de color.

La Tabla II.II.2 muestra los coeficientes de correlación de Pearson entre la actividad antioxidante, la vitamina C y fenoles totales. Los resultados obtenidos de la correlación de Pearson entre la actividad antioxidante, la vitamina C y fenoles totales mostraron que tanto la vitamina C ($r=0.4197$) como los fenoles totales ($r=0.4183$) analizados en el polvo de pomelo presentaron una contribución positiva y significativa a la capacidad antioxidante ($p < 0.05$).

II.III. Estudio del efecto del nivel de dilución de los biopolímeros.

II.III.1. Introducción

Aunque la dilución de la muestra antes de entrar al atomizador es una práctica que se realiza habitualmente para facilitar el proceso de secado (Celli et al. 2015), parece que esta práctica y el mayor tiempo de atomización, por la mayor cantidad de muestra que hay que procesar para obtener el polvo, está reñido con la alta calidad característica de estos productos. Así, en la bibliografía se han encontrado experiencias en las que se ha utilizado la atomización para deshidratar alimentos con y sin dilución previa (Tabla II.III.1).

Tabla II.III.1 Ejemplos de alimentos deshidratados por atomización con o sin dilución de los biopolímero

Alimento	Biopolímeros	Dilución con H ₂ O	Propiedades estudiadas	Referencia
Anacardo	Goma Arábica (10 % w/v) Maltodextrina (20 y 10 % w/v)	No	Color/pH/Estabilidad/Recuento de Células/Rehidratación	Pereira et al. 2014
Mandarina	Maltodextrina y Jarabe de Maíz (1:1) (30, 35 y 40 % w/v)	No	Humedad/pH/Densidad aparente/Color / Vitamina C/ Evaluación sensorial	Lee et al. 2016
Pulpa de Tamarindo	Proteína de Soja (25 % w/v)	No	Humedad/pH/Porosidad/ Tamaño de partícula/Color /Actividad antioxidante	Muzaffar & Pradyuman 2016
Mango	Maltodextrina (6% w/w)	Si	Tamaño de partícula/humedad/Color/ Morfología	Zotarelli et al. 2017
Remolacha	Goma Arábica Maltodextrina (10 y 20 g/100 g)	No	Humedad/Porosidad/ Tamaño de partícula/Color /Actividad antioxidante/ Eficiencia de encapsulación	Bazaria and Kumar 2017
Manzana, melón, Naranja	Goma Arábica Maltodextrina (10 y 20 % w/w)	Si	Humedad/ Higroscopicidad/ Apelmazamiento/ Color	Fontes et al. 2014
Piel de Pitaya roja	Maltodextrina (4 a 26 % w/w)	Si	Retención de betacianina/ Color/Humedad/Higroscopicidad	Bakar et al. 2013
Té verde	Disolución de maltodextrina (40% w/v) (33 g/100 g)	Si	Análisis de compuesto bioactivos	Tengse et al. 2017

Tabla II.III.1 (Continuación). Ejemplos de alimentos deshidratados por atomización con o sin dilución de los biopolímero

Alimento	Biopolímeros	Dilución con H ₂ O	Propiedades estudiadas	Referencia
Guaraná	Goma Arábica Maltodextrina (10 a 20 % w/w)	Si	Análisis de compuesto bioactivos/ Morfología	Klein et al. 2015
Guayaba rosa	Maltodextrina (10 y 20 % w/v)	Si	Humedad/Tamaño de partícula/ Contenido de Licopeno	Shishir et al. 2016

En este trabajo, los diseños planteados en los Capítulos I y II.I, incluían algunas experiencias con concentraciones altas en biopolímeros, lo que suponía una alta viscosidad del licuado. Para evitar problemas en el atomizador, a todas las formulaciones se les adicionó agua en una proporción 1:1. No obstante, la formulación óptima obtenida como resultado del estudio reflejado en el Capítulo II.I parece presentar la posibilidad de disminuir o eliminar la adición de agua. Por todo esto, se ha estudiado cómo afecta en los parámetros de calidad del producto en polvo la no dilución de la muestra que va a ser atomizada.

II.III.2. Materiales y métodos

II.III.2.1. Materia prima

El pomelo (*Citrus paradisi*, variedad. Star Ruby), se adquirió en un supermercado local de la ciudad de Valencia, España, seleccionando las frutas en base a su color, tamaño y ausencia de daños. Los biopolímeros utilizados en este caso fueron también maltodextrina (MD) con un valor de 16.5-19.5 de dextrosa equivalente (DE), goma arábica (GA), carboximetilcelulosa (CMC), suministrados por la empresa Alfa Aesar (Alemania) y el aislado de proteína de suero de leche (WPI, LACPRODAN® DI-9212 de Arla Foods Ingredients, Dinamarca).

II.III.2.2. Diseño experimental

A partir del óptimo obtenido en el Capítulo II.I, en esta fase del trabajo, se diseñó una experiencia para estudiar la influencia de la dilución de la muestra antes de la atomización en la calidad del producto atomizado. Para ello se fue reduciendo la cantidad de agua añadida partiendo de la utilizada en los apartados anteriores (relación 1:1) hasta cero. Las proporciones

ensayadas de licuado con biopolímeros:agua fueron 1:1 (dilución 100 %), 1:0.75 (dilución 75 %), 1:0.5 (dilución 50 %), 1:0.25 (dilución 25 %) y 1:0 (dilución 0 %).

II.III.2.3. Preparación de la muestra y condiciones del equipo

La preparación de la muestra y su análisis en cuanto a °Brix y contenido en agua y las condiciones de atomización se realizó utilizando el mismo protocolo descrito en el Capítulo I, pero utilizando una temperatura de entrada del aire al atomizador obtenida de la optimización del proceso en el Capítulo II.I, es decir, de 148 °C. Los productos en polvo obtenidos de los diferentes tratamientos fueron envasados al vacío y se conservaron en un desecador con silicagel a temperatura ambiente hasta realizar los análisis.

II.III.2.4. Análisis de las muestras atomizadas

Las muestras se analizaron según lo descrito en el Capítulo II.II.2.4.

II.III.2.5. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de la variancia (ANOVA) con el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII.

II.III.3. Resultados

Los productos en polvo obtenidos después de la atomización de las muestras con diferente grado de dilución no presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a su humedad (Fig. II.III.1).

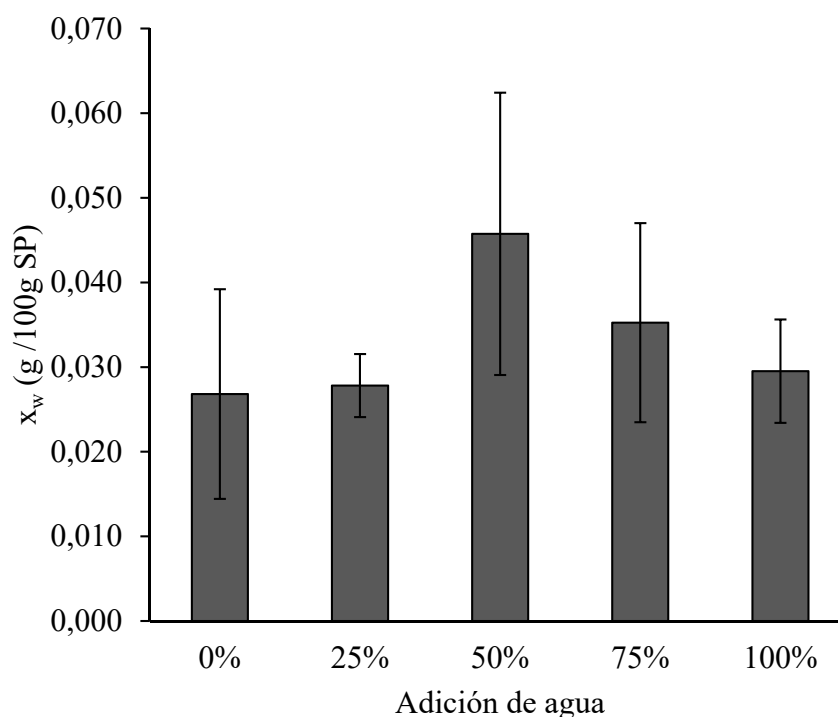


Figura II.III.1 Humedad de las muestras formuladas con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI y atomizadas a 148°C, sin diluir (0%) y diluidas con un 25, 50, 75 y 100% de agua.

La porosidad, sin embargo, fue más alta cuando la dilución de la muestra fue mayor de 75%, observándose diferencias significativas (Fig. II.III.2). Es decir, parece que las muestras más diluidas producen un polvo más fino y suelto.

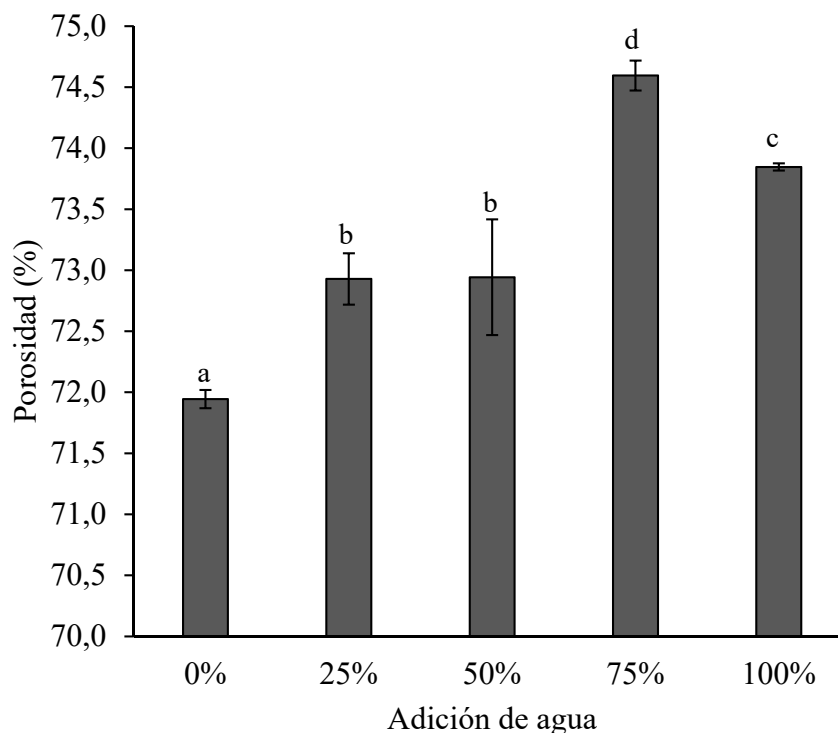


Figura II.III.2 Porosidad de las muestras formuladas con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI y atomizadas a 148°C, sin diluir (0%) y diluidas con un 25, 50, 75 y 100% de agua. Diferentes letras (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

En cuanto al color (Fig. II.III.3 y II.III.4), éste se ve más afectado en las experiencias con las formulaciones más diluidas (75 y 100%). Según lo comentado en el Capítulo I, el pomelo atomizado con el mejor color será el que sea muy luminoso, bajo en croma y con alto ángulo de tono. En este sentido, no sería recomendable no diluir la muestra. Sin embargo, conviene recordar que el mejor color en aquél caso se estableció teniendo en cuenta que, por su composición en biopolímeros y temperatura de atomización, los polvos con un color más parecido al del pomelo habían quedado totalmente apelmazados tras su obtención. En este caso, en que la formulación y temperatura de proceso son las mismas, el polvo no queda apelmazado y, por lo tanto, si que es deseable conseguir un polvo de color parecido al del pomelo. Si se observa la Figura II.III.5, esto se consigue cuando no se diluye la muestra.

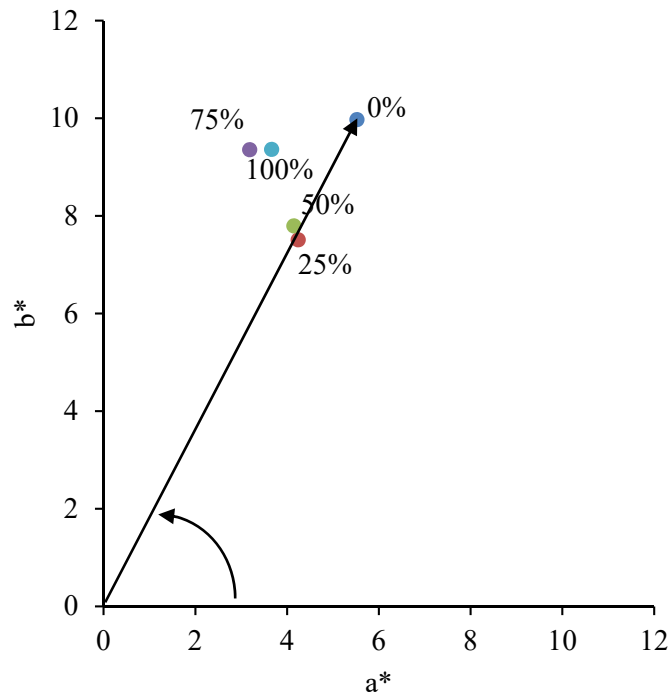


Figura II.III.3 Plano cromático (a^* , b^*) de las muestras formuladas con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI y atomizadas a 148°C, sin diluir (0%) y diluidas con un 25, 50, 75 y 100% de agua. Para la muestra 0%, el ángulo de tono y el croma aparecen indicado con la flecha.

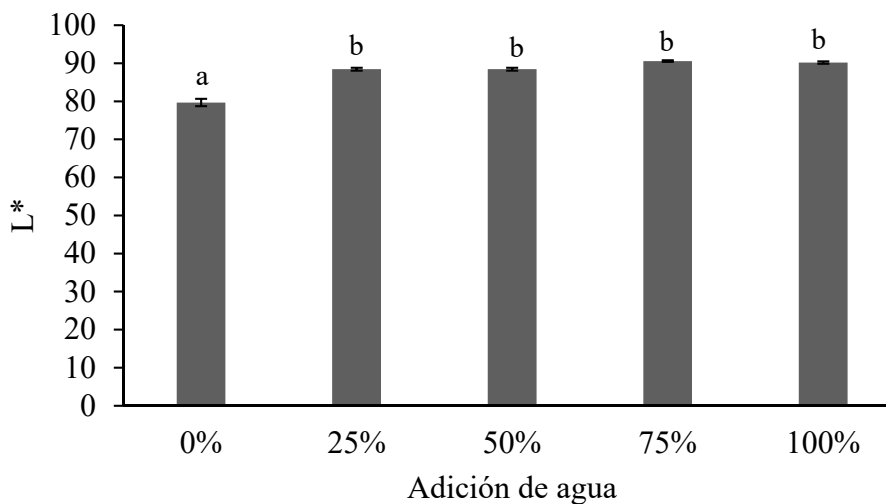


Figura II.III.4. Luminosidad de las muestras formuladas con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI y atomizadas a 148°C, sin diluir (0%) y diluidas con un 25, 50, 75 y 100% de agua. Diferentes letras (a y b) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

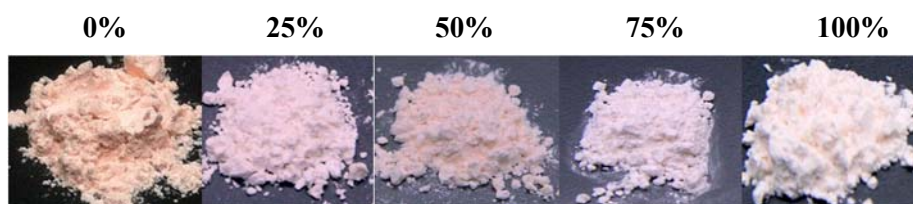


Figura II.III.5. Imágenes de los polvos donde se aprecia las diferencias de color.

La Figura II.III.6 muestra el rendimiento del proceso de atomización de las diferentes muestras estudiadas. Los rendimientos varían entre 46.89 % y 98.72 %, siendo el mayor rendimiento el obtenido para las muestras que se atomizaron sin diluir.

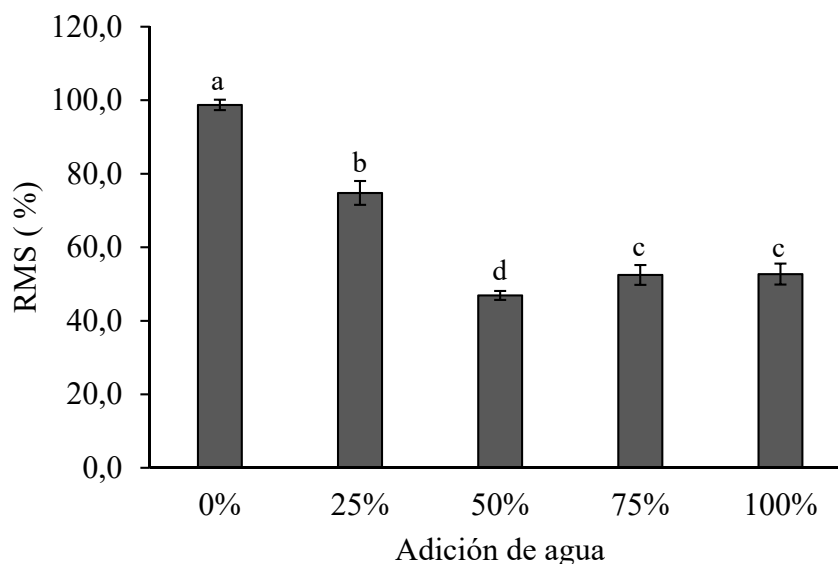


Figura II.III.6 Rendimiento en materia seca de las muestras formuladas con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI y atomizadas a 148°C, sin diluir (0%) y diluidas con un 25, 50, 75 y 100% de agua. Distintas letras (a-d) indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Los resultados obtenidos de la determinación de la actividad antioxidante se presentan en la Figura II.III.7. No se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las experiencias, aunque sí que se observó que los mayores valores correspondieron a las muestras sin diluir y a las diluidas un 25 y un 50%.

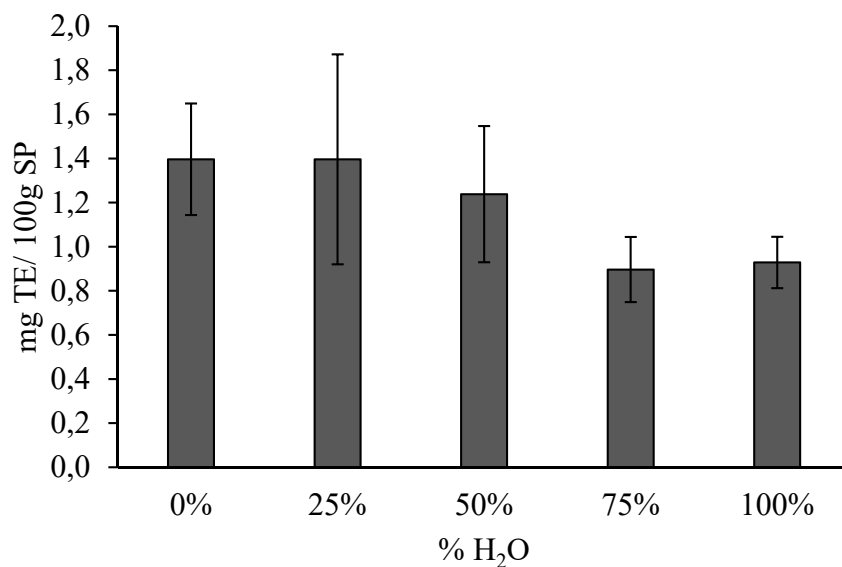


Figura II.III.7 Actividad antioxidante de las muestras formuladas con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI y atomizadas a 148°C, sin diluir (0%) y diluidas con un 25, 50, 75 y 100% de agua.

El contenido en fenoles totales varió entre 713 y 698 mg GAE/100g S.P, siendo las muestras menos diluidas las que presentaron mayores valores (Fig. II.III.8).

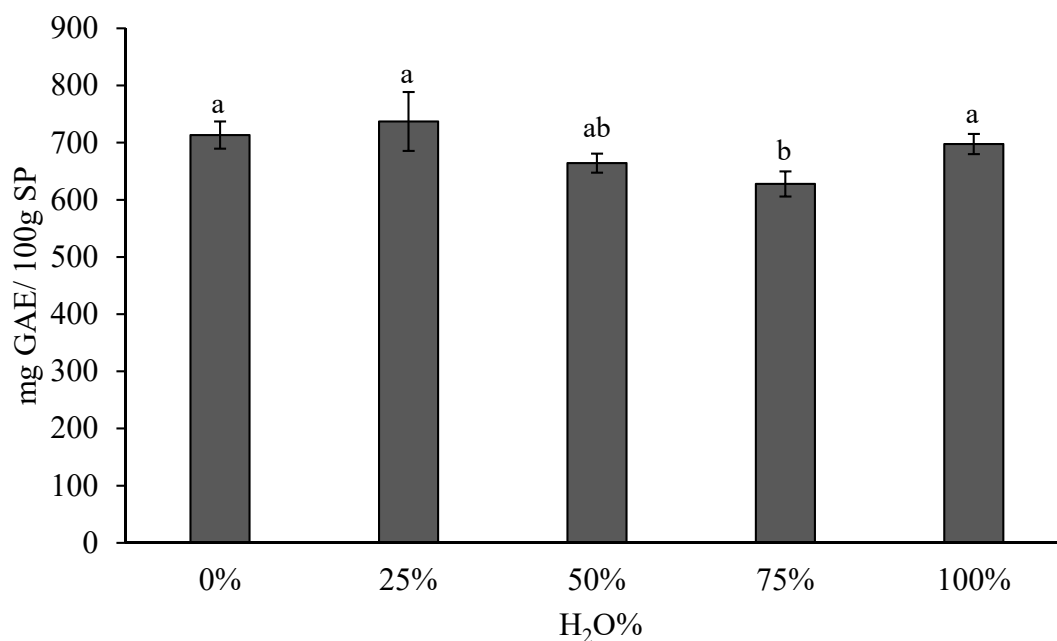


Figura II.III.8 Fenoles totales (mg ácido gálico equivalente/100 g solutos propios del pomelo) de las muestras formuladas con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI y atomizadas a 148°C, sin diluir (0%) y diluidas con un 25, 50, 75 y 100% de agua. Distintas letra (a y b) indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Observando los resultados, y aunque se hayan encontrado diferencias significativas entre las muestras ($p < 0.05$), debido probablemente a la alta reproducibilidad de los resultados, no parece que este parámetro se vea afectado por la dilución. Lo mismo ocurrió con el contenido de vitamina C (Fig. II.III.9).

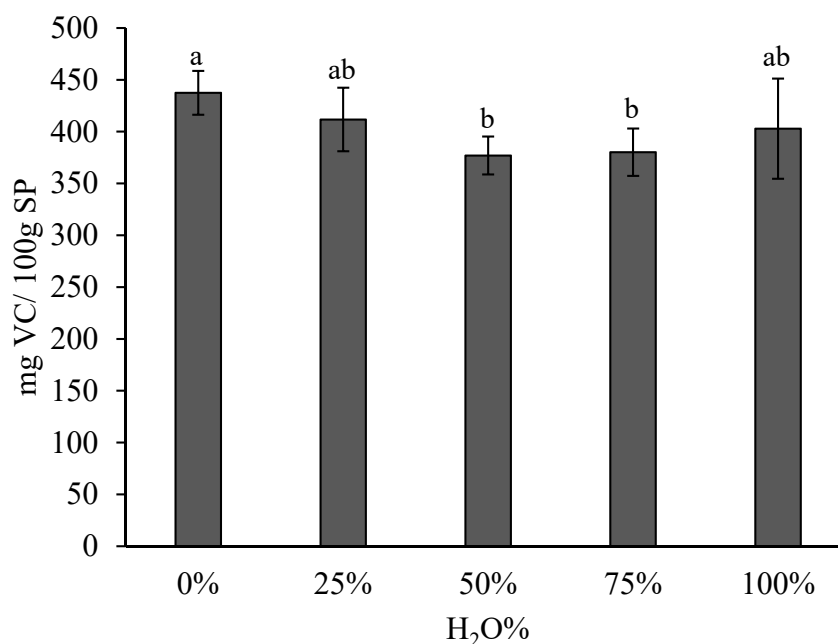


Figura II.III.9 Contenido de vitamina C (VC) de las muestras formuladas con 9.4 % de GA, 1.25 % MD, 0% CMC y 1.4 % WPI y atomizadas a 148°C, sin diluir (0%) y diluidas con un 25, 50, 75 y 100% de agua. Distintas letra (a y b) indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Con todos los resultados obtenidos, se puede concluir que se puede llevar a cabo el proceso de atomización sin la etapa previa de dilución, ya que, aunque se obtienen productos de menor porosidad, estos no se ven afectados en cuanto a su humedad final, ni al contenido en compuestos bioactivos, además de que el rendimiento del proceso es mayor. Por otra parte, al introducir menos cantidad de producto en el atomizador, el tiempo del proceso se redujo de 2 a 1.2 h.

II.IV. Conclusiones

De los biopolímeros ensayados como carriers del proceso de atomización del licuado de pomelo, la goma arábica es la que permite obtener un mayor rendimiento del proceso y atomizar a temperatura más baja. No obstante, es posible disminuir la cantidad de GA a costa de aumentar la de MD, WPI y CMC, en orden decreciente, respectivamente. Si bien esto disminuye ligeramente el rendimiento, repercute en la obtención de un polvo con menor humedad y mejor color aunque algo menos poroso. En este caso aumenta la temperatura recomendada para la atomización. Así, la formulación propuesta aunando todas las propiedades estudiadas maximiza la cantidad de GA, proponiendo añadir un 9.4%, e incorpora 1.25 % de MD y 1.4% de WPI y se propone para su atomización una temperatura de 148 °C. La CMC no resulta recomendable para este producto, especialmente porque disminuye mucho el rendimiento. Además se recomienda añadir los biopolímeros directamente al licuado, a fin de no diluirlo y alargar el tiempo de proceso y su rendimiento. La hidratación previa de los biopolímeros no comporta un mayor poder encapsulante de los mismos. Respecto a la incorporación de OSA en sustitución de alguno(s) de los biopolímeros anteriores, especialmente GA, su uso permite obtener productos más porosos, más secos y con un mayor contenido en vitamina C, pero menor en compuestos fenólicos, además de que disminuye un poco el rendimiento. En este sentido, con la información disponible, no se puede concluir que sea más recomendable para este producto.

II.V. Bibliografía

- Adhikari, B., Howes, T., Shrestha, A., & Bhandari, B. R. (2007). Effect of surface tension and viscosity on the surface stickiness of carbohydrate and protein solutions. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1136–1143. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.04.002
- Altuna, L., Herrera, M. L., & Foresti, M. L. (2018). Synthesis and characterization of octenyl succinic anhydride modified starches for food applications. A review of recent literature. *Food Hydrocolloids*, 80, 97–110. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.01.032
- Bakar, J., Ee, S. C., Muhammad, K., Hashim, D. M., & Adzahan, N. (2013). Spray-Drying Optimization for Red Pitaya Peel (*Hylocereus polyrhizus*). *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1332–1342. doi:10.1007/s11947-012-0842-5
- Bazaria, B., & Kumar, P. (2017). Effect of dextrose equivalency of maltodextrin together with Arabic gum on properties of encapsulated beetroot juice. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(1), 156–163. doi:10.1007/s11694-016-9382-4
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27. doi:10.1016/S0076-6879(99)99005-5
- Bhusari, S. N., Muzaffar, K., & Kumar, P. (2014). Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. *Powder Technology*, 266, 354–364. doi:10.1016/j.powtec.2014.06.038
- Bodart, M., de Peñaranda, R., Deneyer, A., & Flamant, G. (2008). Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment*, 43(12), 2046–2058. doi:10.1016/J.BUILDENV.2007.12.006
- Borrmann, D., Pierucci, A. P. T. R., Leite, S. G. F., & Leão, M. H. M. D. R. (2013). Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. *Food and Bioprocess Processing*, 91(1), 23–27. doi:10.1016/j.fbp.2012.08.001
- Bouquerand, P. E., Maio, S., Meyer, F., & Normand, V. (2008). Moisture stability of maltodextrin-based delivery systems. *Food Biophysics*, 3(2), 182–185. doi:10.1007/s11483-008-9067-6

- Çakir-Fuller, E. (2015). Enhanced heat stability of high protein emulsion systems provided by microparticulated whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 47, 41–50. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.01.003
- Celli, G. B., Ghanem, A., & Brooks, M. S. L. (2015). Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods—a Review of Methods and Current Limitations. *Food and Bioprocess Technology*, 8(9), 1825–1837. doi:10.1007/s11947-015-1559-z
- Dokić, L., Krstonošić, V., & Nikolić, I. (2012). Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 185–192. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.02.008
- Dwyer, D. M. (2008). Microstructural analysis of conditioned and unconditioned responses to maltodextrin. *Learning & Behavior*, 36(2), 149–158. doi:10.3758/LB.36.2.149
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2012). Comparing the efficiency of protein and maltodextrin on spray drying of bayberry juice. *Food Research International*, 48(2), 478–483. doi:10.1016/j.foodres.2012.05.025
- Fazaeli, M., Emam-Djomeh, Z., Kalbasi Ashtari, A., & Omid, M. (2012). Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4), 667–675. doi:10.1016/j.fbp.2012.04.006
- Fontes, C. P. M. L., Silva, J. L. A., Sampaio-Neta, N. A., da Costa, J. M. C., & Rodrigues, S. (2014). Dehydration of Prebiotic Fruit Drinks by Spray Drying: Operating Conditions and Powder Characterization. *Food and Bioprocess Technology*, 7(10), 2942–2950. doi:10.1007/s11947-014-1343-5
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107–1121. doi:10.1016/j.foodres.2007.07.004
- Gonçalves, A., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2016). Microencapsulation of vitamin A: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 76–87. doi:10.1016/j.tifs.2016.03.001
- He, H., Hong, Y., Gu, Z., Liu, G., Cheng, L., & Li, Z. (2016). Improved stability and controlled release of CLA with spray-dried microcapsules of OSA-modified starch and xanthan gum. *Carbohydrate Polymers*, 147, 243–250. doi:10.1016/j.carbpol.2016.03.078

- Igual, M., Ramires, S., Mosquera, L. H., & Martínez-navarrete, N. (2014). Optimization of spray drying conditions for lulo (*Solanum quitoense* L .) pulp. *Powder Technology*, 256, 233–238. doi:10.1016/j.powtec.2014.02.003
- Janiszewska-Turak, E. (2017). Carotenoids microencapsulation by spray drying method and supercritical micronization. *Food Research International*, 99, 891–901. doi:10.1016/j.foodres.2017.02.001
- Joardder, M. U. H., Karim, A., Kumar, C., & Brown, R. J. (2016). Factors Affecting Porosity. In *Porosity: Establishing the Relationship between Drying Parameters and Dried Food Quality* (pp. 25–46). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-23045-0_4
- Kaur, M., Sandhu, K. S., & Kaur, J. (2013). Pasting properties of Tamarind (*Tamarindus indica*) kernel powder in the presence of Xanthan, Carboxymethylcellulose and Locust bean gum in comparison to Rice and Potato flour. *Journal of Food Science and Technology*, 50(4), 809–814. doi:10.1007/s13197-011-0402-4
- Klein, T., Longhini, R., Bruschi, M. L., & De Mello, J. C. P. (2015). Microparticles containing Guaraná extract obtained by spray-drying technique: Development and characterization. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25(3), 292–300. doi:10.1016/j.bjp.2015.03.010
- Lee, K. C., Eun, J. B., & Hwang, S. J. (2016). Physicochemical properties and sensory evaluation of mandarin (*Citrus unshiu*) beverage powder spray-dried at different inlet air temperatures with different amounts of a mixture of maltodextrin and corn syrup. *Food Science and Biotechnology*, 25(5), 1345–1351. doi:10.1007/s10068-016-0211-7
- Li, J. Z. (2014). *The Use of Starch-Based Materials for Microencapsulation. Microencapsulation in the Food Industry*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-404568-2.00018-2
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1–21. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x
- Mosquera, L. H., Moraga, G., & Martínez-Navarrete, N. (2012). Critical water activity and critical water content of freeze-dried strawberry powder as affected by maltodextrin and arabic gum. *Food Research International*, 47(2), 201–206. doi:10.1016/j.foodres.2011.05.019

- Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., & Martínez-Bustos, F. (2009). Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 91(3), 380–386. doi:10.1016/j.jfoodeng.2008.09.035
- Muzaffar, K., Dar, B. N., & Kumar, P. (2016). Assessment of nutritional, physicochemical, antioxidant, structural and rheological properties of spray dried tamarind pulp powder. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1–12. doi:10.1007/s11694-016-9444-7
- Osorio, J., Monjes, J., Pinto, M., Ramírez, C., Simpson, R., & Vega, O. (2014). Effects of spray drying conditions and the addition of surfactants on the foaming properties of a whey protein concentrate. *LWT - Food Science and Technology*, 58(1), 109–115. doi:10.1016/j.lwt.2014.02.016
- Paim, D. R. S. F., Costa, S. D. O., Walter, E. H. M., & Tonon, R. V. (2016). Microencapsulation of probiotic jussara (*Euterpe edulis* M.) juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 74, 21–25. doi:10.1016/j.lwt.2016.07.022
- Pereira, A. L. F., Almeida, F. D. L., Lima, M. A., da Costa, J. M. C., & Rodrigues, S. (2014). Spray-Drying of Probiotic Cashew Apple Juice. *Food and Bioprocess Technology*, 7(9), 2492–2499. doi:10.1007/s11947-013-1236-z
- Puupponen-pimiä, R., Häkkinen, S., Aarni, M., Suortti, T., Lampi, A.-M., Euroala, M., et al. (2003). Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(February), 1389–1402. doi:10.1002/jsfa.1589
- Ramakrishnan, Y., Adzahan, N. M., Yusof, Y. A., & Muhammad, K. (2018). Effect of wall materials on the spray drying efficiency, powder properties and stability of bioactive compounds in tamarillo juice microencapsulation. *Powder Technology*, 328, 406–414. doi:10.1016/j.powtec.2017.12.018
- Roos, Y. H., & Silalai, N. (2011). Glass Transitions: Opportunities and Challenges. In J. M. Aguilera, R. Simpson, J. Welti-Chanes, D. Bermudez-Aguirre, & G. Barbosa-Canovas (Eds.), *Food Engineering Interfaces* (pp. 473–490). New York, NY: Springer New York.
- Sánchez-Mata, M. C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., & Torija-Isasa, M. E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for

- vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research and Technology*, 210(3), 220–225. doi:10.1007/PL00005516
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. . (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices †. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 439(August 2002), 430–439. doi:10.1002/jsfa.1392
- Selvendran, R. R., & Ryden, P. (1990). Isolation and Analysis of Plant Cell Walls. *Methods in Plant Biochemistry*, 2, 549–579. doi:10.1016/B978-0-12-461012-5.50022-7
- Shavakhi, F., Boo, H. C., Osman, A., & Ghazali, H. M. (2012). Effects of Enzymatic Liquefaction, Maltodextrin Concentration, and Spray-Dryer Air Inlet Temperature on Pumpkin Powder Characteristics. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2837–2847. doi:10.1007/s11947-011-0686-4
- Shishir Islam, M. R., Taip, F. S., Aziz, N. A., Talib, R. A., & Hossain Sarker, M. S. (2016). Optimization of spray drying parameters for pink guava powder using RSM. *Food Science and Biotechnology*, 25(2), 461–468. doi:10.1007/s10068-016-0064-0
- Sweedman, M. C., Tizzotti, M. J., Schäfer, C., & Gilbert, R. G. (2013). Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 905–920. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.040
- Telis, V. R. N., & Martínez-Navarrete, N. (2009). Collapse and color changes in grapefruit juice powder as affected by water activity, glass transition, and addition of carbohydrate polymers. *Food Biophysics*, 4(2), 83–93. doi:10.1007/s11483-009-9104-0
- Tengse, D. D., Priya, B., & Kumar, P. A. R. (2017). Optimization for encapsulation of green tea (*Camellia sinensis* L.) extract by spray drying technology. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(1), 85–92. doi:10.1007/s11694-016-9374-4
- Wolf, B. W., Wolever, T. M. S., Bolognesi, C., Zinker, B. A., Garleb, K. A., & Firkins, J. L. (2001). Glycemic response to a food starch esterified by 1-octenyl succinic anhydride in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2674–2678. doi:10.1021/jf0015017
- Yousefi, S., Emam-Djomeh, Z., & Mousavi, S. M. (2011). Effect of carrier type and spray drying on the physicochemical properties of powdered and reconstituted pomegranate juice (*Punica Granatum* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 48(6), 677–684.

doi:10.1007/s13197-010-0195-x

Zotarelli, M. F., da Silva, V. M., Durigon, A., Hubinger, M. D., & Laurindo, J. B. (2017). Production of mango powder by spray drying and cast-tape drying. *Powder Technology*, 305, 447–454. doi:10.1016/j.powtec.2016.10.027

CAPÍTULO III

Estabilidad de las propiedades físicas, los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del polvo de pomelo obtenido por atomización.

***Publicación asociada:** Stability of the physical properties, bioactive compounds and antioxidant capacity of spray dried grapefruit powder. F. González, E. García-Martínez, M.M. Camacho, N. Martínez-Navarrete. Food Bioscience (En prensa)*

III. Stability of the physical properties, bioactive compounds and antioxidant capacity of spray dried grapefruit powder

Freddy González, Eva García-Martínez,* María del Mar Camacho Vidal and Nuria Martínez-Navarrete

Universitat Politècnica de València, Departamento de Tecnología de Alimentos, Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria. 46022 Valencia, Spain.

*Correspondence to: Eva García-Martínez, Departamento de Tecnología de Alimentos, Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria, Universitat Politècnica de València. 46022 Valencia, Spain. Phone: +34 963877000. Phone: +34 963877916. E-mail: evgarmar@tal.upv.es

Abstract

Spray drying may be an interesting alternative means of offering consumers high quality, stable, and easy-to-handle fruit. The stability of the grapefruit powder formulated with gum Arabic, maltodextrin and whey protein isolate was studied. The changes during powder storage at 20°C of the vitamin C (VC), total phenolic (TP) compounds, lycopene (Lp), antioxidant activity (AOA), color and mechanical properties was studied at different relative humidities (RH), from 0 to 56% for up to 9 month, either exposed to light or in darkness. Results showed that TP were the most stable compounds and Lp the most unstable. The properties studied with grapefruit powder were relatively stable when stored at 20°C, in darkness or light, at RH \leq 23.1% and for no more than 6 months. With these conditions, losses of 32, 3, 23-68 and 90% were observed for TP, VC, AOA and Lp, respectively, and the powder maintained its flowability and color.

Keywords: Vitamin C, total phenolics, lycopene, CIE L*a*b*, mechanical compression test, grapefruit (*Citrus paradise*).

III.1. Introduction

The production of powdered food and food ingredients is an increasingly important industrial activity, given the high stability and ease of handling they provide (Fitzpatrick and Ahrné, 2005). The consumption of fresh fruit is declining in part due to its short lifespan and/or the sometimes special handling needed, which decreases their convenience, barely compatible with the current lifestyle. Fruit powder may be an interesting alternative means of promoting fruit consumption among consumers, easy to store and use. Nevertheless, the process used to obtain the powder should ensure the maximum quality of the product obtained. Despite the stability of the healthy components, it is important to know more about the powders' physical properties. High quality powder products can be obtained in terms of their sensory, nutritional and functional properties using spray-drying (Nandiyanto and Okuyama, 2011). In addition, these powders are very fine, with a homogeneous particle size, low water activity and, in the case of fruit powders, with good reconstitution properties. Furthermore, this technique is easy to industrialize and permits continuous production (Igual et al. 2014).

As regards the physical properties of the fruit powder obtained, color is of great importance when choosing a food and the flowability is important in handling and processing operations (Teunou et al. 1999). Both the color and, to a greater extent, the mechanical properties, will be influenced by the water content of the powder, depending on the relative humidity (RH) of the surrounding environment (Roos, 1995). If the water activity (a_w) of the food is lower than the $RH/100$, the food will gain water and if it is higher, it will lose it. On the other hand, with rapid dehydration processes, such as spray-drying, it is very common to obtain an amorphous matrix, glassy or rubbery, depending on the final water content of the product and the temperature at which it is stored (Roos, 1995). The matrix in the glassy state is much more viscous than in the rubbery state, which affects the diffusional and mechanical properties of the product.

Powdered food in the rubbery state can undergo structural collapse and show stickiness and caking problems (Roos, 1995). In dehydrated fruits, with a high content of organic acids and low molecular weight sugars, the rubbery state prevails with the usual storage conditions (Telis and Martínez-Navarrete, 2009). To promote the easy handling and stability of the glassy state, some compounds can be added to the product before drying. The use of high molecular weight biopolymers capable of increasing the glass transition temperature such as maltodextrins, modified starches or gums, for instance, or biopolymers with a steric role, such as fibers, proteins or some inorganic compounds, has been reported (Telis and Martínez-Navarrete, 2009;

Ghosal et al. 2010). These biopolymers prevent the adhesion of powder particles, not only to each other but also to the equipment itself, increasing the yield and avoiding operational problems. In addition, at the same time they may act as encapsulating agents, helping to prevent the degradation of some bioactive compounds (Rascón et al. 2011).

Grapefruit has been reported to be a rich source of bioactive phytochemical constituents with antioxidant properties that, independently or jointly, could be responsible for the health-protective effects of this fruit (Iguar et al. 2010; La Cava and Sgroppo, 2015; Cristóbal-Luna et al. 2017; Zou et al. 2015). Ascorbic acid (AA) is the main citrus fruit compound with antioxidant capacity and may prevent oxidative stress mediated diseases (Gardner et al. 2000). Flavonoids are phenolic compounds associated with a reduced risk of coronary heart disease, anti-inflammatory and anti-tumor effects (Fujita et al. 2008; Kim et al. 2008; García-Martínez et al. 2018). Naringin is the main flavonoid in grapefruit juice and it is responsible for its bitter taste. In pink grapefruit varieties, β -carotene and lycopene, the latter being the most abundant, are responsible for the color and contribute to the health benefits by decreasing the risk of some cancers and eye diseases (Jomova and Valko, 2013).

The objective of this study was to learn more about the effects of spray-drying on some of the bioactive compounds of the liquidized grapefruit (L), formulated with gum Arabic (GA), maltodextrin (MD) and whey protein isolate (WPI), and the powder stability with storage. Different storage conditions were tested by varying RH, exposure to light and time. The changes of vitamin C (VC), total phenolics (TP), lycopene (Lp), antioxidant activity (AOA), color and mechanical properties were measured.

III.2. Material and methods

III.2.1 Raw material

Pink grapefruit (*Citrus paradisi* var. Star Ruby) from Murcia (Spain) was purchased from a local supermarket in Valencia (Spain). The selection of the fruit pieces was made by visual appearance on the basis of a similar size (80-90 mm diameter), color and the absence of any physical damage on the surface. The samples were formulated by incorporating GA (Scharlau SL, Barcelona, Spain), MD (Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany) and WPI Lacprodan® DI-

9213, with both fat and lactose <0.2 and protein around 90% (d.m.) (Arla, Viby, Denmark), as carriers for the drying process and to stabilize the products.

III.2.2 Sample preparation

Grapefruits were washed with tap water, manually peeled with the careful removal of the albedo and liquidized at speed 1 in an electrical food processor of 180 W and 500 g capacity (DeLonghi, Barcelona, Spain). The liquid was sieved through 0.7 mm mesh (CISA, 200/50, Barcelona, Spain), to ensure the absence of any pulp. To 100 g of L, 9.4 g of GA, 1.44 g of WPI and 1.25 g of MD were added, according to a formulation optimized in a previous study (Egas et al. 2015). The solutes were incorporated slowly using a stirrer (Heidolph, RZR2020, Schwabach, Germany), working at between 800-1200 rpm, until visual homogeneity was achieved. To obtain the fruit powder, this sample (LS) was spray-dried in a Büchi mini spray-dryer (B-290, Flawil, Switzerland) with the following operating conditions: aspirator rate 35 m³/h, feed rate 9 ml/min, atomization air rotameter 473 l/h with co-current flow, drying air inlet temperature 148°C and pressure 5·10⁵ Pa. The powder sample obtained (P₀) was collected from the product collection vessel, weighed, analyzed and stored as described below.

The powder was conditioned in different environments using hermetic bisphenol A free polypropylene containers (EMSA, Emsdetten, Germany), with a capacity of 3.7 l, acquired in a department store in Valencia (Spain). In each vessel, a glass with a saturated salt solution was arranged to ensure a controlled and constant RH. The salts used (Scharlab SL, Barcelona, Spain) and the RH obtained, at 20°C, were: lithium chloride (RH = 11.3%), potassium acetate (RH = 23.1%), magnesium chloride (RH = 33.1%), potassium carbonate (RH = 43.2%) and magnesium nitrate (RH=55.9%) (Greenspan, 1977). A series with each of these 5 containers was placed in a Binder chamber (KBF720, Hechingen, Germany) to ensure darkness and another series was placed in a Nüve Test Cabinet chamber (TK120, Istanbul, Turkey) with artificial 6500K daylight emitted by 6000 Lx fluorescent tubes (Feilo Sylvania Europe LTD, Newhaven, UK), both at 20°C. In each hermetic container, 6 aluminum plates (55 mm diameter, 1 mm height) were placed with approximately 10 g of P₀. In addition, another plate with 10 g of P₀ that was vacuum packaged (Edesa machine vac-20 SL, Guipúzcoa, Spain) with a transparent polyethylene bag (Productos Pilarica SA, Paterna, Spain), was included in both the dark and light series.

All of the samples of each series were analyzed at 30, 90, 180 and 270 days for TP, VC, Lp and AOA, as well as their mechanical properties and color, as described below.

III.2.3 Analytical determinations

The water content of L and P₀ was determined, in triplicate, using the gravimetric method in a vacuum oven (Vaciotem, JP Selecta, Barcelona, Spain) at 60°C, p <100 mm Hg until constant weight. Six replicates were made (bioactive extractions in triplicate, analyses in duplicate) for the chemical analyses described below. They were carried out on L, LS, P₀ and on the powders stored using the different conditions. As these samples have a different composition as regards water and added solutes, they were standardized to the grapefruit's own solutes, GS (Equations 1 and 2) to make the results comparable (Agudelo et al. 2016).

$$m_i = \frac{m_i^P}{(1-x_w^P) \cdot x_{GS/TS}} \quad (1)$$

$$x_{SP/ST} = \frac{m_L \cdot (1-x_w^L)}{(m_{GA} + m_{MD} + m_{WPI} + m_L) \cdot (1-x_w^L)} \quad (2)$$

where m_i is the mass of each analyzed compound referred to grapefruit solutes (mg/g_{GS}), m_i^P is the mass of each compound analyzed in the powder (mg/g), following sections 2.3.1 to 2.3.4, x_w^P is the water content of the powder (g_{water}/g_{powder}) analyzed as previously described, $x_{GS/TS}$ is the mass fraction of GS to TS (total solids), m_L , m_{GA} , m_{MD} and m_{WPI} are the mass of L, GA, MD and WPI, respectively, in the sample and x_w^L is the water content of L (g_{water}/g_{liquidized}) analyzed as previously described.

The losses of each analyzed compound due to the addition of solutes (comparing sample L with LS), spray-drying process (comparing sample LS with P₀) or storage (comparing sample P₀ with the powder stored at each condition) were calculated and expressed as % loss (Equation 3).

$$\% \text{ loss} = 100 \frac{(m_i^B - m_i^A)}{m_i^B} \quad (3)$$

where m_i^B is the mass of each analyzed compound referred to grapefruit solutes (mg/gGS) before the corresponding process, m_i^A is the mass of each compound referred to grapefruit solutes (mg/gGS) analyzed after the corresponding process.

III.2.3.1 Total phenolic

Extracts for TP were prepared by mixing 1 g of sample with 9 ml of methanol:water (70:30) using a magnetic multistirrer at 400 rpm (Velp Scientifica, Usmate Velate, Italy) in the dark at 20°C for 30 min. The homogenates were centrifuged at 5870 x g at 4°C for 10 min (Eppendorf 5804 R, Wesseling-Berzdorf, Germany). The supernatants were collected and TP was analyzed using the Folin–Ciocalteu colorimetric method (Benzie and Strain, 1999). An aliquot of 250 μ l extract was mixed with 15 ml of distilled water and 1.25 ml of Folin–Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich). After 8 min, 3.75 ml of 7.5% anhydrous Na₂CO₃ (Scharlab SL) aqueous solution were added and water was added to adjust the final volume to 25 ml. Absorbance was measured at 765 nm (UV-visible V-1200 VWR International Eurolab S.L, Barcelona, Spain) after 2 h of incubation at room temperature in the dark. The TP content was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/100 gGS (Equations 1 and 2) using a standard curve range of 0–1000 ppm of gallic acid (Sigma-Aldrich).

III.2.3.2 Vitamin C

VC was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Jasco, Cremella, Italy). To quantify the total VC content, dehydroascorbic acid was reduced to ascorbic acid (AA) by mixing 0.5 g powder with 2 ml of a 20 g/l DL-dithiothreitol solution (Scharlab SL) for 2 h at room temperature and in the dark (Sánchez-Mata et al., 2000; Sánchez-Moreno et al., 2003). Afterwards, 1 g of this mixture was extracted with 9 ml 0.1% oxalic acid (Scharlab SL) with manual stirring for 3 min and filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter (VWR, Radnor, PA, USA) before injection (Xu and Chang, 2007). The HPLC conditions were: Kromaphase100-C18, 5 mm (4.6 x 250 mm) column (Scharlab SL); mobile phase 0.1% oxalic acid, volume injected 20 μ L, flow rate 1 ml/min, detection at 243 nm (detector UV-visible MD-1510) at 25°C. A standard solution of L(+) ascorbic acid (Scharlab SL) in the range of 10-530 ppm was prepared. The VC content was calculated as mg AA/100 gGS (Equations 1 and 2).

III.2.3.3 Lycopene

Lp was extracted using the methodology recommended by Olives et al. (2006) with some modifications. Briefly, 1 g of the powder was mixed with 9 ml of hexane/acetone/ethanol (50:25:25, v/v/v) for 30 min with magnetic stirring (400 rpm) in the dark. The homogenates were centrifuged at 5870 x g at 4°C for 10 min and the supernatants were collected. Distilled water was added (15 ml/10 ml of supernatant) and mixed with manual stirring for 2 min in the dark. An upper layer aliquot was taken for spectrophotometric analysis (AOAC, 1990), at 501 nm. The Lp content was expressed as mg Lp/100 g_{GS}) (Equations 1 and 2). A standard solution of Lp (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) in the range of 0.5-10 ppm was prepared.

III.2.3.4 Antioxidant capacity determinations

The AOA of the methanolic extract obtained for the quantification of TP was determined with the DPPH and FRAP tests. AOA was measured using the free radical scavenging activity with the stable radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH) (Puupponen-pimiä et al. 2003). Briefly, the absorbance at 515 nm of 3.9 ml of the DPPH reagent (0.030 g/L, Sharlau S.L, Barcelona, Spain) (absorbance at initial time, A_{Control}) was measured. Then 0.1 ml of the extract was added and the absorbance was measured again at 5 min, when the reaction had reached the steady state (A_{Sample}).

The percentage of DPPH was calculated using Equation 4. The final results were converted to mmol trolox equivalents (TE)/100 g_{GS} (Equations 1 and 2) using a trolox (Sigma-Aldrich) calibration curve in the range of 8-125 ppm.

$$\%DPPH = \frac{(A_{Control} - A_{Sample})}{A_{Control}} \times 100 \quad (4)$$

For the ferric reducing ability of samples, the FRAP assay was used (Benzie and Strain, 1999). The FRAP solution was prepared by mixing 2.5 ml 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) solution (in 40 mM HCl), 2.5 ml 20 mM FeCl₃·6H₂O and 25 ml 0.3M acetate buffer (pH 3.6). For the analysis 30 µL extract, 30 µL water and 900 µL of the FRAP solution (kept at 37°C throughout the whole analysis) were mixed and allowed to react for 30 min at 37°C in the dark. Absorbance of the colored product (ferrous tripyridyltriazine complex) was then measured at 593 nm. Results were expressed as mmol TE/100 g_{GS} (Equations 1 and 2), using a trolox (Sigma-Aldrich) calibration curve in the range of 8-125 ppm.

III.2.3.5 Mechanical properties

Each of the samples conditioned at the different RH and the vacuum-packed sample were placed, at established times, in a circular aluminum sample holder of 11 mm in diameter and 5.5 mm in height, which was completely filled. Mechanical compression tests were done using a universal texture analyzer TA- TXT2 (Stable Micro Systems, Ltd., Godalming, UK). A cylindrical probe of 10 mm in diameter at a deformation rate of 0.1 mm/s for 3 mm was used for this purpose. The maximum force attained during the test (F_{max}) was selected as the characteristic mechanical parameter. This assay was done in quintuplicate.

III.2.3.6 Color

The sample holder containing the compressed sample was then used to measure the color by placing a low reflectance glass plate CR-A51 (Konica Minolta, Valencia, Spain) in between the sample and the spectrophotometer CM 3600-D (Konica Minolta) and providing a measurement window of 5 mm in diameter. CIE $L^*a^*b^*$ color coordinates were obtained by using the D65 illuminant and a 10° observer. In this color space, L^* indicates the sample light/darkness, a^* and b^* being the chromatic coordinates on a green (-) to red (+) and blue (-) to yellow (+) axis, respectively. These coordinates allowed for the calculation of the color attributes, hue angle (h^*_{ab} , Equation 5) and the chrome or color purity (C^*_{ab} , equation 6). The global color difference (ΔE , Equation 7) of the samples stored under the different conditions commented on above and the newly-obtained one was also calculated. This assay was done in triplicate.

$$h^*_{ab} = \arctg \frac{b^*}{a^*} \quad (4)$$

$$C^*_{ab} = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (6)$$

III.2.3.7 Statistical analysis

Data are expressed as the mean value and standard deviation of the different replicates. Multifactor analyses of variance (MANOVA) were carried out at 0.05 significance level to evaluate the differences between the samples brought about by storage conditions: RH, time and presence or absence of light. Furthermore, a Pearson's correlation analysis between the bioactive compounds, AOA and ΔE was carried out at a 95% significance level. All of the statistical analyses were done using Statgraphics Centurion XVI.II (© 2010 StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

III.3. Results and discussion

III.3.1 Bioactives and antioxidant activity of grapefruit samples

The water content of L batch was $x_w 91 \pm 1$ g/100 g and that of P₀ 1.5 ± 0.7 g/100 g. The concentration of each bioactive compound analyzed and the AOA of L, LS and P₀ are shown in Table 1. The TP, VC and Lp content of the L are consistent with those reported in other grapefruit studies (Toh et al. 2013; Igual et al. 2015). The addition of solutes produced a significant reduction ($p < 0.05$) in Lp (10% loss). The instability of carotenoids is due to the fact that they are highly unsaturated compounds, whose degradation is fundamentally due to oxidative processes. Other factors, such as temperature, light or pH, can also produce important qualitative changes in these compounds as a consequence of isomerization reactions (Meléndez-Martínez et al. 2010). In the case of citrus juices, some studies stated that isomerization is favored by the loss of compartmentation brought about by the squeezing of the citrus, which brings together organic acids and carotenoids (Vanamala et al. 2005; Meléndez-Martínez et al. 2009). It has been shown that oxidation processes are more pronounced when the cellular integrity is lost, so that in crushed plant foods, the loss of cellular compartmentation brings into contact substances that can structurally modify and even destroy the pigments (Meléndez-Martínez et al. 2010). During the stirring process for the purposes of blending the carriers, the incorporation of oxygen into the samples and the additional cellular breakage may have caused the direct exposure of carotenoids to oxygen and other substances that may accelerate their loss. The addition of solutes did not affect TP and VC content even though it produced a significant reduction ($p < 0.05$) in the AOA of LS, regardless of the measurement method used.

Table 1. Mean values (with standard deviation) of total phenolic content (TP), vitamin C (VC), lycopene (Lp) and antioxidant capacity (DPPH, FRAP) of liquidized grapefruit (L), liquidized grapefruit with solutes mixture (LS) and spray-dried powder (P₀).

Sample	L	LS	P ₀
TP ⁽¹⁾	590 (70) ^a	590 (50) ^a	570 (10) ^a
VC ⁽²⁾	740 (40) ^a	750 (10) ^a	710 (30) ^a
Lp ⁽³⁾	32 (1) ^a	28.8 (0.8) ^b	8.3 (0.2) ^c
DPPH ⁽⁴⁾	1.8 (0.1) ^a	1.51 (0.05) ^b	1.09 (0.07) ^c
FRAP ⁽⁴⁾	5.0 (0.4) ^a	4.0 (0.4) ^b	1.33 (0.04) ^c

Different letters within each row indicate significant differences ($p < 0.05$).

⁽¹⁾ mg of gallic acid equivalents /100g grapefruit's own solutes, ⁽²⁾ mg ascorbic acid /100g grapefruit's own solutes, ⁽³⁾ mg lycopene /100g grapefruit's own solutes, ⁽⁴⁾ mmol trolox equivalents /100g grapefruit's own solutes.

With respect to the spray-drying process, neither VC nor TP were significantly affected (>90% retention). Different authors concluded that one disadvantage of spray-drying is the high operation temperature, as many bioactive compounds are sensitive to heating (Đorđević et al. 2016). However, it may be possible to increase the stability of sensitive compounds during processing and to improve the quality of the finished product by adding carriers or drying excipients like those selected in this study (Murugesan and Orsat, 2012). Nevertheless, obtaining the powder product caused a significant ($p < 0.05$) drop in the Lp content to 71%. A significant ($p < 0.05$) loss in the AOA of the powder was also observed.

III.3.2 Changes in phytochemical compounds and antioxidant capacity as a function of relative humidity, light condition and storage time

Figures 1 to 5 show the changes of each bioactive compound and AOA with different storage conditions. The MANOVAS carried out with each of the three factors considered determined a significant effect ($p < 0.05$) of RH, time and light condition in all the parameters studied, except for Lp which were not affected by this last factor. For each significant factor, the result of MANOVAS Multiple Range Tests, showing which means are significantly different from which others, is shown in Figures 1 to 5. Nevertheless, in all the cases the MANOVAS also showed significant interactions ($p < 0.05$) among the factors, which are discussed below. Interaction plots are not shown to not increase the number of figures shown.

The TP were better preserved in darkness. Except for the vacuum stored sample, the phenolic content decreased until 90 or 180 days, depending on the RH. After this time, the TP remained

constant at the lowest RH, while at RH >33.1% they seemed to increase until the end of the storage, regardless of light. Taking into account that phenolic compounds act as substrates in various types of reactions, their stability or degradation will depend on the molecular complexes that they can form. In this sense, autoxidation reactions caused by exposure to light or oxygen may result in the formation of phenol radicals that may subsequently react with other radicals, forming dimers or new structures, depending on the precise location of the electrons in the reaction over time (Fraga et al. 2010). The vacuum-packed grapefruit powder that was stored in darkness was the only sample that preserved its TP content the entire time.

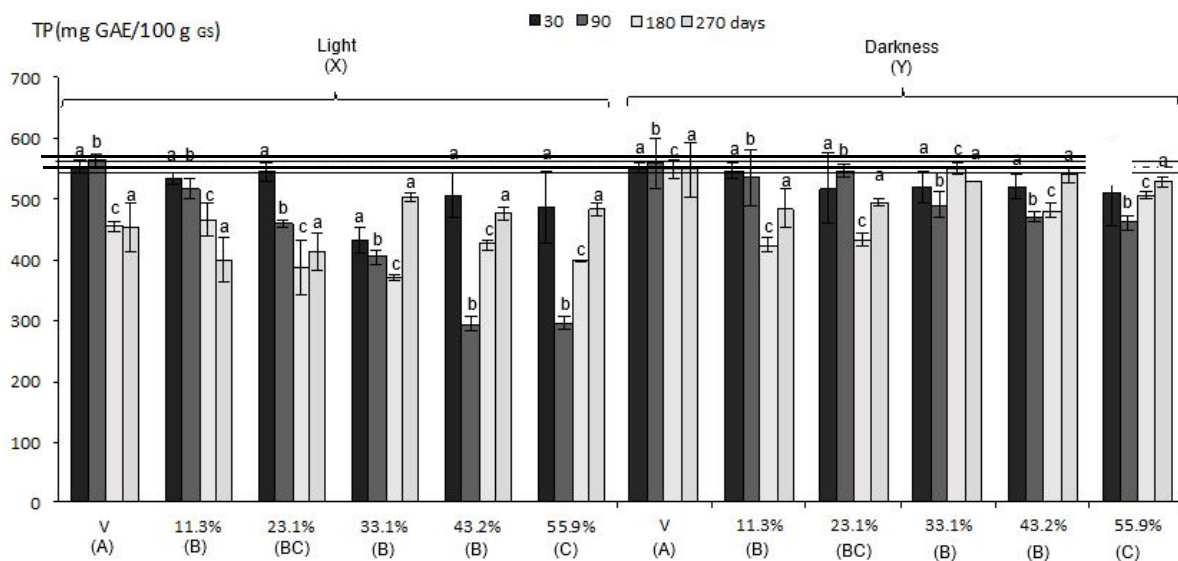


Fig. 1. Mean values and standard deviation of total phenolics of grapefruit powder, mg gallic acid equivalents/100 g grapefruit solutes (mg GAE/100 g_{GS}), as a function of storage conditions: 11.3, 23.1, 33.1, 43.2 and 55.9% relative humidity and vacuum packed (V) after 30, 90, 180 and 270 days of storage, with and without light. The dotted line marks the phenolic content of the newly spray-dried powder. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between relative humidity (A-F), time (a-d) and light condition (X-Y).

During storage and with increasing RH, the Lp showed a declining trend. Storage conditions have an essential role in preserving the carotenoid content of processed food (Nagarajan et al. 2017). In this case, losses occurred mostly during the first month of storage, regardless of light and RH (losses of 75-95%). Other studies showed that light exposure had minor effects on the loss of total Lp in tomato puree (Shi et al. 2008). After 30 days of storage, the Lp remained constant when stored under vacuum conditions and at 11.3% RH until 90 days. A certain Lp decrease was observed from 23.1% RH upwards and it became completely degraded at the highest RH (43.2 and 55.9%) after 6 months of storage. As commented on above, the degradation of carotenoids is mainly due to oxidation reactions. Water availability, which

increases as the RH rises, is also a parameter that greatly affects these compounds (Nagarajan et al. 2017). The influence of water content on the degradation of lipophilic compounds seems to be related to the availability of water, from a determined water content, to participate in degradative reactions or to act as a vehicle that allows the mobility of the different substrates involved, oxygen among others (Lavelli et al. 2007; Moraga et al. 2012).

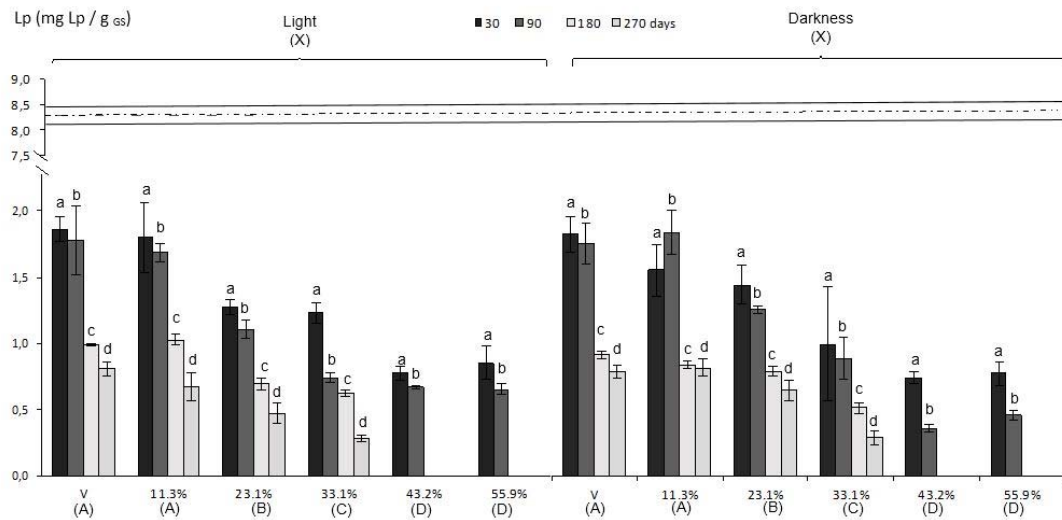


Fig. 2. Mean values and standard deviation of lycopene of grapefruit powder, mg lycopene/100 g grapefruit solutes (mg Lp/100 ggs), as a function of storage conditions: 11.3, 23.1, 33.1, 43.2 and 55.9% relative humidity and vacuum packed (V) after 30, 90, 180 and 270 days of storage, with and without light. The dotted line marks the Lp of the newly spray-dried powder. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between relative humidity (A-F), time (a-d) and light condition (X-Y).

As regards VC, regardless of the light condition and at a RH <33.1%, its content remained stable throughout the 180 days of storage, but decreased over the range of RH from this value up to 55.9%. The greatest losses of this bioactive component occurred in environments with the higher RH. The water content of the grapefruit powder with this level of a_w could be considered high enough to provoke an increase in the degradation reactions of AA at the storage time studied. The various reactions involved in the final phases of ascorbate degradation are important in the formation of flavor compounds and as precursors of non-enzymatic browning (Belitz et al. 2009). In this case, as with carotenoids, light does not seem to affect the degradation of this vitamin. AA is easily oxidized, especially in aqueous solutions, and greatly favored by the presence of oxygen, heavy metal ions, especially Cu^{2+} , Ag^+ , and Fe^{3+} , and by alkaline pH and high temperatures (Du et al. 2012).

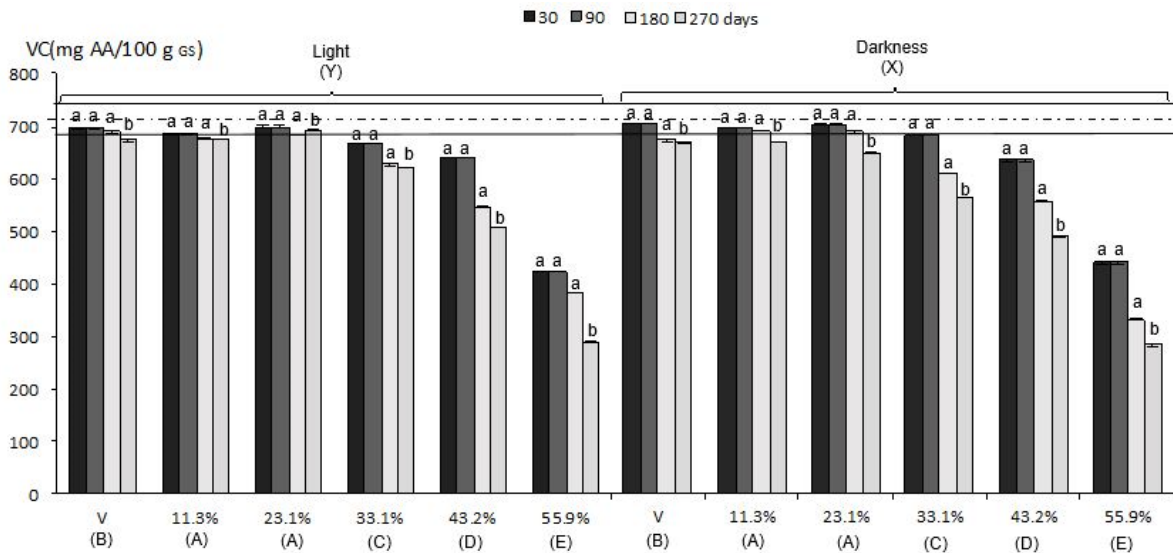


Figure 3 Mean values and standard deviation of vitamin C of grapefruit powder, mg ascorbic acid/100 g grapefruit solutes (mg AA/100 ggs), as a function of storage conditions: 11.3, 23.1, 33.1, 43.2 and 55.9% relative humidity and vacuum packed (V) after 30, 90, 180 and 270 days of storage, with and without light. The dotted line marks the vitamin C of the newly spray-dried powder. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between relative humidity (A-F), time (a-d) and light condition (X-Y).

The grapefruit maintained its AOA measured using the DPPH assay until 90 days of storage at RH < 33.1% and V, regardless of light. From that moment on, the AOA decreased until the end of storage. Similar results were observed from the FRAP analysis, but in this case, the AOA values were stable only during the first month and in darkness.

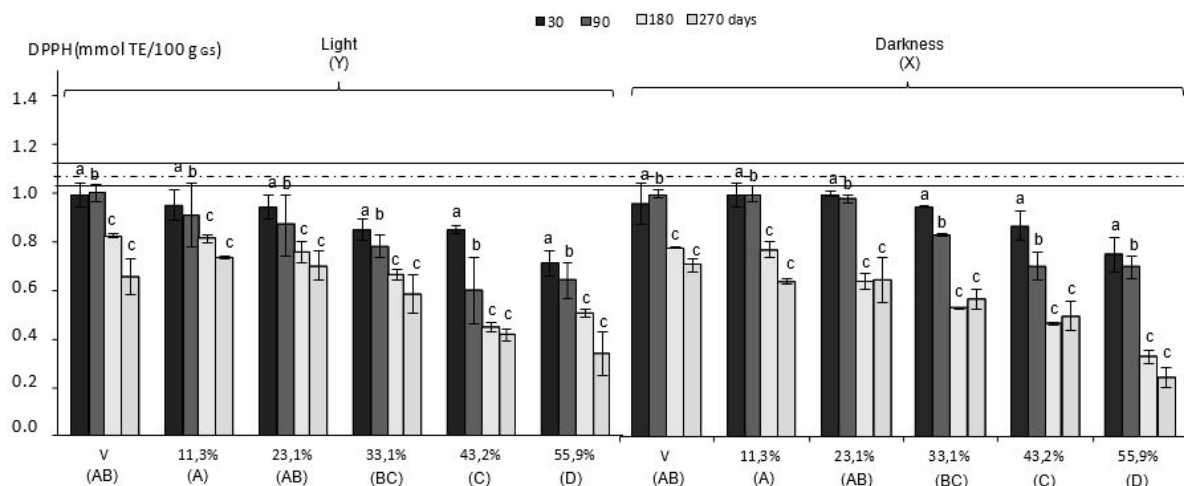


Figure 4 Mean values and standard deviation of antioxidant capacity of grapefruit powder measured by DPPH assay, mmol trolox equivalents (TE)/100 g grapefruit solutes (mmol TE/100 ggs), as a function of storage conditions: 11.3, 23.1, 33.1, 43.2 and 55.9% relative humidity and vacuum packed (V) after 30, 90, 180 and 270 days of storage, with and without light. The dotted line marks the antioxidant capacity of the newly spray-dried powder. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between relative humidity (A-F), time (a-d) and light condition (X-Y).

There is some controversy about the influence of the phytochemicals present in fruits and vegetables with their AOA (Guo et al. 2003). Polyphenols have been reported as responsible for the antioxidant activity of citrus fruits due to their redox characteristics, which allow them to act as reducing agents, hydrogen donors, singlet oxygen quenchers, and even metal chelators (Carocho and Ferreira, 2012). On the other hand, carotenoids show antioxidant characteristics through quenching 1O_2 and eliminating harmful free radicals, while VC can effectively scavenge a variety of reactive oxygen species (ROS) and give off semi dehydroascorbic acid, removing 1O_2 and reducing sulfur radicals (Zou et al. 2016). Chemical interactions affecting free radical scavenging properties between hydrophilic and lipophilic compounds have not been extensively reported in fruits and vegetables, yet both synergistic and antagonistic interactions may affect antioxidant capacity (Talcott et al. 2003). In this study a statistical correlation was carried out to determine the relationship among the bioactive compounds quantified in the samples and with AOA (Table 2). The results showed that all the bioactive compounds analyzed in the grapefruit powder, both the hydrophilic and the lipophilic ones, showed a positive significant ($p < 0.05$) correlation among them and with the AOA measured both by using the DPPH and FRAP assays, indicating a complementary and synergistic antioxidant behavior (Zou et al. 2016). The greatest contribution to the AOA was provided by the Lp and TP, followed by VC. The results obtained in this work are consistent with other studies (Igual et al. 2015).

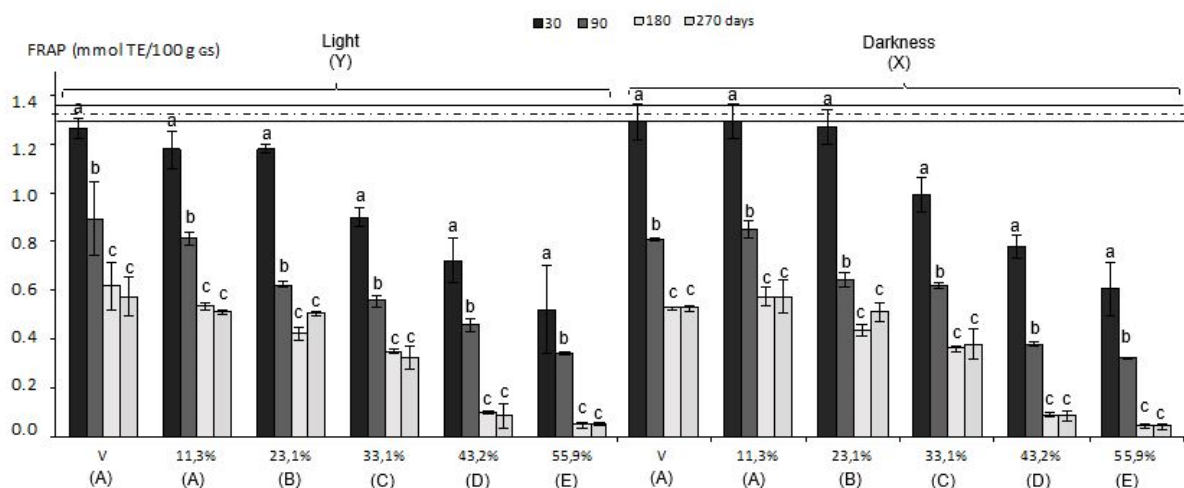


Figure 5 Mean values and standard deviation of antioxidant capacity of grapefruit powder measured by FRAP assay, mmol trolox equivalents (TE) /100 g grapefruit solutes (mmol TE/100 ggs), as a function of storage conditions: 11.3, 23.1, 33.1, 43.2 and 55.9% relative humidity and vacuum packed (V) after 30, 90, 180 and 270 days of storage, with and without light. The dotted line marks the antioxidant capacity of the newly spray-dried powder. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between relative humidity (A-F), time (a-d) and light condition (X-Y).

Table 2. Pearson’s correlation coefficients among total phenols (TP), lycopene (Lp), vitamin C (VC), antioxidant capacity (DPPH and FRAP analysis) and color differences (ΔE) of the powder samples with respect to the initial powder P_0 .

	DPPH	FRAP	TP	VC	ΔE
TP	0.7728*	0.7813*	-	0.5514*	-0.2223
Lp	0.9251*	0.9729*	0.8382*	0.5967*	-0.7642*
VC	0.5990*	0.5737*	-	-	-0.6222*

*Correlation is significant at a significance level of $p < 0.05$

III.3.3 Changes in mechanical properties and color as a function of relative humidity, light condition and storage time

The mechanical properties of a powdered product are related to its ability to be compacted and its negative influence on flow capacity. Compression tests have been widely used in the field of food powders as a simple and convenient method to measure some physical properties such as powder compressibility and flowability (Barbosa-Cánovas et al. 2005). In powder technology, great attention has been paid to the general behavior of powders under compressive stress. The force–distance relationship obtained from the compression test carried out on the different samples was similar to that shown in Figure 6. The compression process of a food powder takes place in two stages: filling voids with particles equal in size or smaller than the voids brought about by particle movement, and filling smaller voids with the particle’s elastic and/or plastic deformation, or fragmentation. If the free flow of the particles predominates during compression, it will be necessary to apply greater force to achieve their compaction, as it occurs in samples stored at RH 11.3 and 23.1% (Figure 6). However, when the deformation of the particles predominates (samples stored at RH 55.9%, Figure 6), the force observed during compression will be weaker.

The F_{max} values of the powder, stored as previously described, are shown in Figure 6. A significant effect ($p < 0.05$) of both RH and time was observed, although, as expected, there were no differences between samples whether stored in the presence or absence of light. The F_{max} value of the sample stored for 30 days at RH 33.1% is in the order of that shown by the newly spray-dried powder, which means that $P_0 a_w$ may be ~ 0.331 . In general terms, F_{max} was greater at each storage time in the samples stored under vacuum and at $RH \leq 23.1\%$, and decreased at higher RH. The increase may be related to a certain water loss at the lower RH, which increases the powder flowability. The decrease in the F_{max} value may be related to the

transition of the amorphous matrix from the glassy to the rubbery state, this being responsible for the structural collapse of the powder associated with the development of stickiness and a softening of the product (Telis and Martínez-Navarrete, 2010). In this way, the a_w of the powder has to be equal to or lower than 0.231 to ensure the flowability of the powder. Despite this, as the glass transition is a time dependent phenomenon (Roos, 1995), the F_{max} decreases over storage time at any RH so that no more than 6 months of storage are recommended for the purposes of maintaining the initial mechanical properties of the powder.

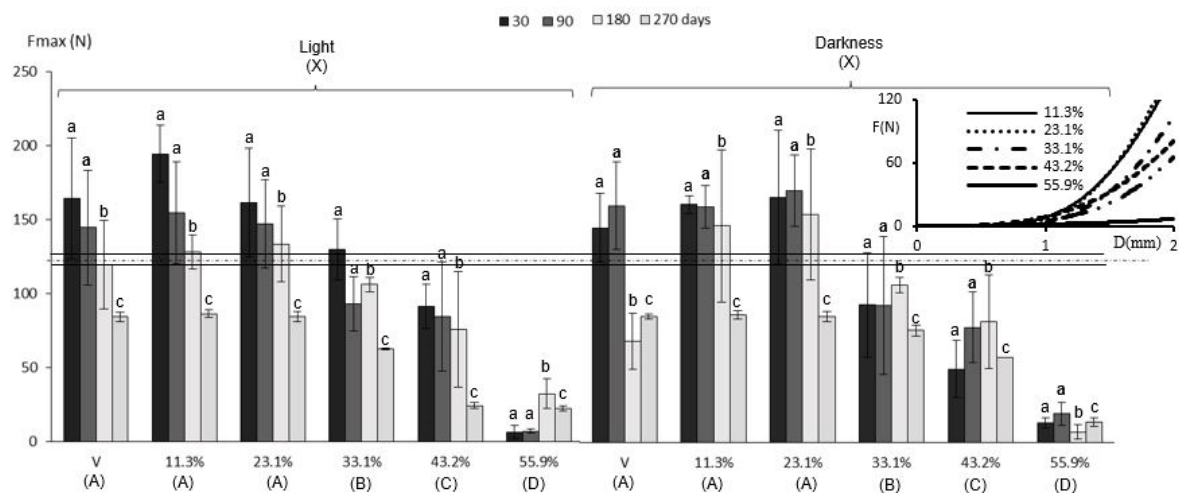


Figure 6 Mean values and standard deviation of the maximum force attained during the grapefruit powder compression test (F_{max}) as a function of storage conditions: 11.3, 23.1, 33.1, 43.2 and 55.9% relative humidity and vacuum packed (V) after 30, 90, 180 and 270 days of storage, with and without light. The dotted line marks the newly spray dried powder value. The inner graph shows an example of the force–distance relationship obtained from the compression test carried out on the samples stored for 180 days, in darkness, at the different relative humidities and vacuum packed. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between relative humidity (A-F), time (a-d) and light condition (X-Y).

As regards the color of the grapefruit powder (Table 3), on the whole it was affected more by the storage time and the RH than by the presence or absence of light. In every case, a darkening of the powder (decrease in L^*) was measured after 3 months of storage, especially at the highest RH, as was an evolution towards more yellowish tones (increase in hue angle) from the first 30 days onwards when RH was higher than 22.1%. The chrome, or color purity, was the only color attribute that was dependent on the presence or absence of light, the samples stored in the absence of light being purer. The chrome of the samples also increased at the highest RH, as much as the storage time increases. An increase in chrome above powder collapse has also been described by Telis and Martínez-Navarrete (2009); as related to porosity loss.

Table 3. Luminosity (L*), hue angle (h*) and chroma (C*) of grapefruit powder stored for different time periods (t, days) at different relative humidities (RH).

		t \ RH	V ⁽²⁾	11.3%	23.1%	33.1%	43.2%	55.9%	
L* ⁽¹⁾		30	79 ^{b,A}	79 ^{b,A}	78 ^{c,A}	80 ^{b,AB}	81 ^{c,B}	79 ^{c,AB}	
		90	78 ^{b,A}	79 ^{b,A}	78 ^{c,A}	80 ^{b,A}	79 ^{c,A}	81 ^{c,A}	
		180	71 ^{a,C}	71 ^{a,C}	73 ^{b,C}	69 ^{a,B}	68 ^{b,B}	66 ^{b,A}	
		270	72 ^{a,C}	73 ^{a,C}	67 ^{a,B}	71 ^{a,C}	72 ^{a,C}	62 ^{a,A}	
h* ⁽¹⁾		30	72.3 ^{a,A}	72.4 ^{a,A}	73 ^{a,A}	75.1 ^{b,A}	80.5 ^{c,A}	74.3 ^{b,A}	
		90	74 ^{a,A}	73.2 ^{a,A}	74.4 ^{a,A}	80 ^{b,B}	85 ^{c,B}	78 ^{b,B}	
		180	79 ^{b,B}	76 ^{a,B}	77.3 ^{a,B}	83 ^{b,C}	85 ^{c,B}	80 ^{a,C}	
		270	79 ^{c,B}	76.3 ^{b,B}	78 ^{b,B}	85 ^{d,D}	84 ^{d,B}	75 ^{a,A}	
C* (light)		30	10.4 ^{b,A}	11 ^{b,A}	11.2 ^{c,A}	11 ^{b,A}	11.5 ^{b,A}	17 ^{a,B}	
		90	10 ^{b,AB}	9.4 ^{a,A}	10 ^{b,A}	9.4 ^{ab,A}	11.2 ^{ab,BC}	13 ^{a,C}	
		180	8.5 ^{a,A}	9 ^{a,A}	9 ^{ab,A}	9.2 ^{ab,A}	11 ^{a,A}	15 ^{a,B}	
		270	10 ^{ab,AB}	9.3 ^{a,AB}	8.0 ^{a,A}	8.1 ^{a,A}	11.4 ^{b,B}	16 ^{a,C}	
C* (darkness)		30	11 ^{b,A}	12 ^{c,AB}	12 ^{c,AB}	12 ^{b,AB}	13 ^{b,B}	15.4 ^{b,C}	
		90	11.0 ^{b,A}	11.0 ^{bc,A}	11 ^{b,A}	11.5 ^{b,A}	14.1 ^{c,B}	18.1 ^{c,C}	
		180	9.1 ^{a,A}	9.1 ^{a,A}	9.3 ^{a,A}	10.2 ^{ab,A}	11 ^{a,A}	13.4 ^{a,B}	
		270	8.3 ^{a,A}	9.4 ^{ab,A}	9 ^{a,A}	9.4 ^{a,A}	14 ^{bc,B}	18 ^{c,C}	
		t	RH	V ⁽²⁾	11.3%	23.1%	33.1%	43.2%	55.9%
L* ⁽¹⁾		30		78.6 ^{b,A}	79.0 ^{b,A}	78.3 ^{c,A}	80.2 ^{b,AB}	81.4 ^{c,B}	79 ^{c,AB}
		90		77.5 ^{b,A}	79 ^{b,A}	78 ^{c,A}	80 ^{b,A}	79.3 ^{c,A}	81 ^{c,A}
		180		71 ^{a,C}	70.8 ^{a,C}	72.5 ^{b,C}	69 ^{a,B}	68 ^{b,B}	66 ^{b,A}
		270		72 ^{a,C}	73 ^{a,C}	67 ^{a,B}	71 ^{a,C}	72.3 ^{a,C}	62 ^{a,A}
h* ⁽¹⁾		30		72.3 ^{a,A}	72.4 ^{a,A}	72.8 ^{a,A}	75.1 ^{b,A}	80.5 ^{c,A}	74.3 ^{b,A}
		90		73.6 ^{a,A}	73.2 ^{a,A}	74.4 ^{a,A}	79.9 ^{b,B}	84.8 ^{c,B}	78 ^{b,B}
		180		79 ^{b,B}	75.7 ^{a,B}	77.3 ^{a,B}	82.8 ^{b,C}	84.7 ^{c,B}	80 ^{a,C}
		270		79 ^{c,B}	76.3 ^{b,B}	78 ^{b,B}	85.3 ^{d,D}	83.7 ^{d,B}	75 ^{a,A}
C* (light)		30		10.4 ^{b,A}	10.8 ^{b,A}	11.2 ^{c,A}	10.6 ^{b,A}	11.5 ^{b,A}	16.9 ^{a,B}
		90		9.9 ^{b,AB}	9.4 ^{a,A}	9.7 ^{b,A}	9.4 ^{ab,A}	11.2 ^{ab,BC}	12.6 ^{a,C}
		180		8.5 ^{a,A}	8.8 ^{a,A}	8.7 ^{ab,A}	9.2 ^{ab,A}	10.74 ^{a,A}	15 ^{a,B}
		270		9.6 ^{ab,AB}	9.3 ^{a,AB}	8.0 ^{a,A}	8.1 ^{a,A}	11.4 ^{b,B}	16 ^{a,C}
C* (darkness)		30		11 ^{b,A}	11.7 ^{c,AB}	11.8 ^{c,AB}	11.6 ^{b,AB}	12.6 ^{b,B}	15.4 ^{b,C}
		90		11.0 ^{b,A}	11.0 ^{bc,A}	10.7 ^{b,A}	11.5 ^{b,A}	14.1 ^{c,B}	18.1 ^{c,C}
		180		9.1 ^{a,A}	9.1 ^{a,A}	9.3 ^{a,A}	10.2 ^{ab,A}	10.6 ^{a,A}	13.4 ^{a,B}
		270		8.3 ^{a,A}	9.4 ^{ab,A}	8.7 ^{a,A}	9.4 ^{a,A}	13.9 ^{bc,B}	17.7 ^{c,C}

Standard deviations: L* between 0.9 and 6; h* 0.4-5; C*+light: 0.2-4; C*-light: 0.3-6. ⁽¹⁾No significant differences were observed between samples exposed to light or in darkness. Mean values appear in the table. ⁽²⁾Vacuum storage. Different superscripts within the same row indicate significant differences (p<0.05) between RH (A-C) and within the same column indicate significant differences (p<0.05) between time (a-d).

The aforementioned color evolution resulted in a global color change of the powder with respect to the newly obtained one (Figure 7), which is evident ($\Delta E \geq 3$, Bodart et al. 2008), before 90 days only if the RH of the sample environment is $\geq 43.2\%$ and, from 6 months of

storage onwards, at any other RH. All of this takes place regardless of the presence or absence of light. The color stability at low a_w and the increase in color changes at intermediate a_w values have been related to the enzymatic browning of the samples, maximum at a_w of around 0.5 at which level the conditions of diffusion and concentration of oxidized phenols are optimal (Venir et al. 2007; Telis and Martínez-Navarrete, 2009). Nevertheless, the diffusion of reactants requires a certain time before they coincide and the reaction occurs.

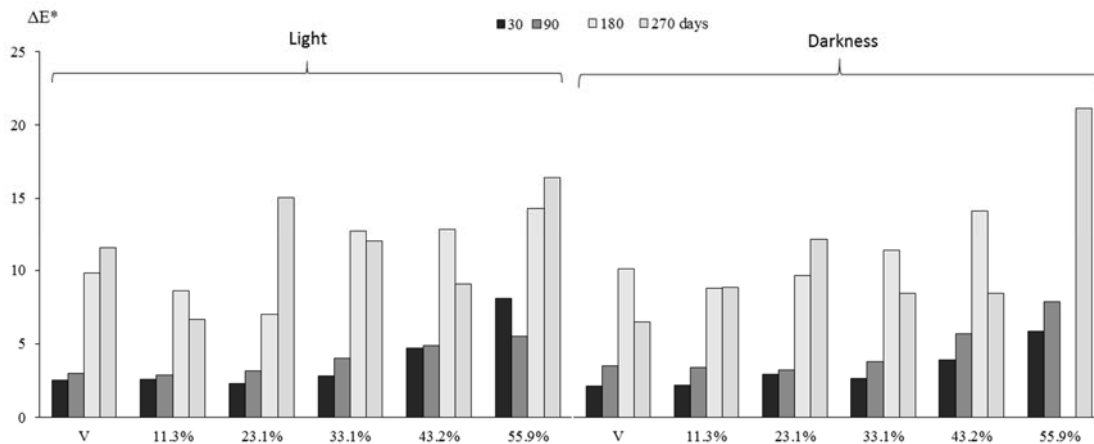


Figure 7. Evolution of the color change of grapefruit powder with respect to the newly obtained one, as a function of storage conditions: 11.3, 23.1, 33.1, 43.2 and 55.9% relative humidity and vacuum packed (V), after 30, 90, 180 and 270 days of storage, with and without light.

The color change was related to the bioactive compound content by means of the Pearson's correlation (Table 2). A significant correlation was found with VC and Lp, but not with TP. The carotenoid structure, the length of the chromophore, the arrangement of conjugated double bonds in the end ring and the geometrical (cis/trans) isomers of carotenoids all influence its perceived color (Meléndez-Martínez et al. 2010). Carotenoids show yellowish to reddish colors, with Lp contributing more to the yellow hue and carotene more to the red. The increase in hue could be justified by assuming not only the observed Lp loss but also the β -carotene loss (Agudelo, 2017). The storage time related to the presence of oxygen, especially in combination with light and temperature, can lead to oxidative degradation (Rodríguez-Amaya and Kimura, 2004). As the vacuum-stored grapefruit also showed Lp loss, both with light and in darkness, storage temperature can be assumed to exert a great influence. Agudelo (2017) observed that the β -carotene loss at 4°C was half of that at 20°C. On the other hand, both carotenoid isomerization and oxidation reactions, together with AA oxidation products, lead to color change (Du et al. 2012; Sant'Anna et al. 2013).

III.4. Conclusions

The TP, VC and Lp content of grapefruit contributed to its antioxidant capacity. Spray-drying operations, when used with the same conditions as in this study, together with the added solutes led to an overall preservation of TP and VC, while Lp was found to be very unstable both during processing and storage. Bioactive compounds, together with the mechanical properties and color of the spray-dried grapefruit powder achieved a high degree of stability when stored at 20°C, being the recommended choice using a surrounding RH equal to or lower than 23.1% and for no more than 6 months. In these conditions, the global color change of the powder will not be evident to the human eye, the powder flowability will be ensured, none of the VC would be lost, despite more than 68% of the TP and only 10% of Lp would remain.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Ministerio de Economía y Competitividad and FEDER for the financial support given through the Project AGL 2012-39103.

III.5. References

- AOAC. (1990). *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, VA, USA.
- Agudelo, C., Igual, M., Camacho, M.M., & Martínez-Navarrete, N. (2016). Effect of process technology on the nutritional, functional, and physical quality of grapefruit powder. *Food Science and Technology International*, 23, 61–74.
- Agudelo, C. (2017). Selección del mejor proceso para la obtención de pomelo en polvo (*Citrus paradisi*) de alta calidad nutritiva, funcional y sensorial. PhD Thesis, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Ortega-Rivas, E., Juliano, P., & Yan, H. (2005). *Food Powders. Physical Properties, Processing, and Functionality*. New York, NY, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Belitz, H.D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. Berlin, Germany:

Springer-Verlag.

Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.

Bodart, M., de Peñaranda, R., Deneyer, A., & Flamant, G. (2008). Photometry and colorimetry characterisation of materials in daylighting evaluation tools. *Building and Environment*, 43, 2046–2058.

Carocho, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2012). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15–25

Cristóbal-Luna, J. M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., & Chamorro Cevallos, G. (2017). Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 224–234.

Dorđević, V., Paraskevopoulou, A., Mantzouridou, F., Lalou, S., Pantić, M., Bugarski, B., & Nedović, V. (2016). Encapsulation Technologies for Food Industry. In V. Nedović, P. Raspor, J. Lević, V. Tumbas Šaponjac, & G. V Barbosa-Cánovas (Eds.), *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*. Cham, Germany: Springer International Publishing. pp. 329–382.

Du, J., Cullen, J.J., & Buettner, G.R. (2012). Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826, 443–457.

Egas, L., González, F., & Camacho, M.M. (2015). Optimización del proceso de atomización de pomelo. Influencia de la temperatura y de la adición de diferentes solutos de alto peso molecular. Master Thesis, Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, Spain.

Fitzpatrick, J.J., & Ahrné, L. (2005). Food powder handling and processing: Industry problems, knowledge barriers and research opportunities. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44, 209–214.

Fraga, C.G., Galleano, M., Verstraeten, S.V., & Oteiza; P.I. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, 31, 435–445.

Fujita, T., Kawase, A., Niwa, T., Tomohiro, N., Masuda, M., Matsuda, H., & Iwaki, M. (2008). Comparative evaluation of 12 immature citrus fruit extracts for the inhibition of cytochrome P450 isoform activities. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(5), 925–930.

García-Martínez, E., Andújar, I., Yuste del Carmen, A., Prohens, J., & Martínez-Navarrete, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of freeze-dried grapefruit phenolics as affected by gum arabic and bamboo fibre addition and microwave pretreatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, <https://doi.org/10.1002/jsfa.8807>.

Gardner, P.T., White, T.A.C., McPhail, D.B., & Duthie, G.G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68, 471–474.

Ghosal, S., Indira, T.N., & Bhattacharya, S. (2010). Agglomeration of a model food powder: Effect of maltodextrin and gum Arabic dispersions on flow behavior and compacted mass. *Journal of Food Engineering*, 96, 222–228.

Greenspan, L. (1977). Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards -A. Physics and Chemistry*, 81, 89-96.

Guo, A., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., & Jaing, Y. (2003). Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruit as determined by FRAP assay. *Nutrition Research*, 23, 1719–1726.

Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M., & Martínez-Navarrete, N. (2010). Effect of thermal treatment and storage on the stability of organic acids and the functional value of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 118, 291–299.

Igual, M., Ramires, S., Mosquera, L. H., & Martínez-navarrete, N. (2014). Optimization of spray drying conditions for lulo pulp. *Powder Technology*, 256, 233–238.

Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M., & Martínez-Navarrete, N. (2015). Stability of micronutrients and phytochemicals of grapefruit jam as affected by the obtention process. *Food*

Science and Technology International, 22, 203–212.

Jomova, K., & Valko, M. (2013). Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 70, 102–110.

Kim, D.I., Lee, S.J., Lee, S.B., Park, K., Kim, W.J., & Moon, S.K. (2008). Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression. *Carcinogenesis*, 29, 1701–1709.

La Cava, E.L.M., & Sgroppo, S.C. (2015). Evolution during refrigerated storage of bioactive compounds and quality characteristics of grapefruit [*Citrus paradisi* (Macf.)] juice treated with UV-C light. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 1325–1333.

Lavelli, V., Zanoni, B., & Zaniboni, A. (2007). Effect of water activity on carotenoid degradation in dehydrated carrots. *Food Chemistry*, 104, 1705–1711.

Lee, S.K., & Kader, A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biology and Technology*, 20, 207–220.

Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., & Heredia, F.J. (2009). Effect of ascorbic acid on deterioration of carotenoids and colour in ultrafrozen orange juice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 295–302.

Meléndez-Martínez, A.J., Escudero-Gilete, M.L., Vicario, I.M., & Heredia, F.J. (2010). Study of the influence of carotenoid structure and individual carotenoids in the qualitative and quantitative attributes of orange juice colour. *Food Research International*, 43, 1289–1296.

Moraga, G., Igual, M., García-Martínez, E., Mosquera, L.H., & Martínez-Navarrete, N. (2012). Effect of relative humidity and storage time on the bioactive compounds and functional properties of grapefruit powder. *Journal of Food Engineering*, 112, 191–199.

Murugesan, R., & Orsat, V. (2012). Spray drying for the production of nutraceutical ingredients-A review. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 3–14.

Nagarajan, J., Ramanan, R.N., Raghunandan, M.E., Galanakis, C.M., & Krishnamurthy, N. P. (2017). Carotenoids. In C.M. Galanakis (Eds.) *Nutraceutical and Functional Food Components* Amsterdam, Netherland: Elsevier. pp. 259–296.

Nandiyanto, A.B.D., & Okuyama, K. (2011). Progress in developing spray-drying methods for the production of controlled morphology particles: From the nanometer to submicrometer size ranges. *Advanced Powder Technology*, 22, 1–19.

Olives, A.I., Hurtado, M.C., Mata, M.C.S., Ruiz, V.F., & Tejada, M.L.S. (2006). Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95, 328–336.

Puupponen-Pimiä, R., Häkkinen, S., Aarni, M., Suortti, T., Lampi, A.M., Euroola, M., Piironen, V., Nuutila, A.M., & Oksman-Caldentey, K. (2003). Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1389–1402.

Rascón, M.P., Beristain, C.I., García, H.S., & Salgado, M.A. (2011). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 549–557.

Rodríguez-Amaya, D.B., & Kimura, M. (2004). *Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus Technical Monographs. Washington, D.C., WA, USA: International Food Policy Research Institute Ed.

Roos, Y.H. (1995). *Phase Transitions in Foods*. San Diego, CA, USA: Academic Press, Inc.

Sánchez-Mata, M.C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., & Torija-Isasa, M.E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research and Technology*, 210, 220–225.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B., & Cano, M. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 439, 430–439.

Sant'Anna, V., Gurak, P.D., Ferreira Marczak, L.D., & Tessaro, I.C. (2013). Tracking bioactive compounds with colour changes in foods – A review. *Dyes and Pigments*, 98, 601–608.

Shi, J., Dai, Y., Kakuda, Y., Mittal, G., & Xue, S.J. (2008). Effect of heating and exposure to light on the stability of lycopene in tomato purée. *Food Control*, 19, 514–520.

- Talcott, S.T., Percival, S., Pittet-Moore, J., & Celoria, C. (2003). Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 935–941.
- Telis, V.R.N., & Martínez-Navarrete, N. (2009). Collapse and color changes in grapefruit juice powder as affected by water activity, glass transition, and addition of carbohydrate polymers. *Food Biophysics*, 4, 83–93.
- Telis, V.R.N., & Martínez-Navarrete, N. (2010). Application of compression test in analysis of mechanical and color changes in grapefruit juice powder as related to glass transition and water activity. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 744–751.
- Teunou, E., Fitzpatrick, J., & Synnott, E. (1999). Characterisation of food powder flowability. *Journal of Food Engineering*, 39, 31–37.
- Toh, J.J., Khoo, H.E., & Azrina, A. (2013). Comparison of antioxidant properties of pomelo [*Citrus Grandis* (L) Osbeck] varieties. *International Food Research Journal*, 20, 1661–1668.
- Vanamala, J., Cobb, G., Turner, N.D., Lupton, J.R., Yoo, K.S., Pike, L.M., & Patil, B.S. (2005). Bioactive compounds of grapefruit (*Citrus paradisi* Cv. Rio Red) respond differently to postharvest irradiation, storage, and freeze drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3980–3985.
- Venir, E., Munari, M., Tonizzo, A., & Maltini, E. (2007). Structure related changes during moistening of freeze dried apple tissue. *Journal of Food Engineering*, 81, 27–32.
- Xu, B.J., & Chang, S.K.C. (2007). A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72, 159-166.
- Zou, Z., Xi, W., Hu, Y., Nie, C., & Zhou, Z. (2016). Antioxidant activity of citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885–896.

CAPÍTULO IV

Desarrollo de un nutracéutico de pomelo obtenido mediante atomización.
Caracterización física, composición química y permeabilidad intestinal 3D.

***Publicación asociada:** Insights into the development of grapefruit nutraceutical powder by spray drying. Physical characterization, chemical composition and 3D intestinal permeability. Freddy González, Eva García-Martínez, María del Mar Camacho, Nuria Martínez-Navarrete, Iva Fernandes, Vitor Freitas, Bruno Sarmiento, Francisca Rodrigues, M. Beatriz P.P. Oliveira, Journal of the Science of Food and Agriculture, Manuscript Number: JSFA-18-3505 (En revision).*

IV. Insights into the development of grapefruit nutraceutical powder by spray drying: Physical characterization, chemical composition and 3D intestinal permeability

Freddy González^a, Eva García-Martínez^a, María del Mar Camacho^a, Nuria Martínez-Navarrete^a, Bruno Sarmiento^{b,c,d}, Iva Fernandes^e, Vitor Freitas^e, Francisca Rodrigues^f,
M. Beatriz P.P. Oliveira^f

^a Universitat Politècnica de València, Food Technology Department, Food Investigation and Innovation Group, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

^b i3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, University of Porto, Portugal

^c iNEB – Instituto de Engenharia Biomédica, University of Porto, Portugal

^d CESPU, Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde & Instituto Universitário de Ciências da Saúde, Gandra, Portugal

^e LAQV/REQUIMTE, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Porto, Porto, Portugal

^f LAQV/REQUIMTE, Department of Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Porto, Portugal

*Corresponding Authors: Francisca Rodrigues, LAQV/REQUIMTE, Department of Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua Jorge Viterbo Ferreira n. ° 280, 4050-313 Porto, Portugal. Tel.: + 351 220428500; Fax: + 351 226093390; Email address: franciscapintolisboa@gmail.com

Abstract

The development of functional and nutraceutical foods comes from a greater awareness of the relationship between food and health by consumers. In the last years, the idea of purify and encapsulate bioactive compounds through techniques such as spray drying is well received by food industry in order to improve bioactivity. The development and characterization of a grapefruit nutraceutical powder obtained by spray drying adding biopolymers as encapsulating factors is of great interest. *Citrus paradise* (grapefruit) is a source of different bioactive compounds. In the present study, physical properties (water content, porosity and color) as well as the composition in total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC) and antioxidant activity (by radical scavenging activity (DPPH) and ferric reducing antioxidant power (FRAP)) were evaluated in grapefruit powder. Besides, the bioavailability of the bioactive compounds was analyzed through a 3D intestinal model that used the combination of Caco-2 and HT29-MTX cell lines. The bioactive compounds theoretically assimilated by the digestive system were identified by LC-ESI-MS. Delphinidin-3-glucoside and hesperitin-7-O-glucoside presented a permeation higher than 50%, followed by hesperidin that was close to 30%. This work allows to establish that the formulation of grapefruit powder has a great potential as nutraceutical food.

Keywords: Grapefruit powder; bioactive compounds; LC-ESI-MS; 3D intestinal model; permeability.

IV.1. Introduction

Citrus fruits are well known for their richness in ascorbic acid, also presenting considerable amounts of sugar, calcium, phenols, phosphorus and vitamin B6 [1]. Within the family of citrus products, *Citrus paradise*, commonly known as grapefruit, is largely underestimated by consumers due to its bitter flavour. However, food and beverage industry as well as cosmetic and pharmaceutical products use grapefruit on a large variety of formulations due to the valuable compounds present in their skin, seed, pulp and juice [1, 2]. *C. paradisi* has a characteristic taste, color and long shelf life, being of huge popularity in some European countries as well as in Asia and United States. The varieties of this citrus could be grouped in white and pigmented. Within the pigmented variety, the Star Ruby is remarkable, presenting an intense coloration, with scarce seeds and high yield in juice and bioactive compounds [3]. A recent review stated that the bioactive compounds of grapefruit juice are distributed in nine general groups of which flavonoids are the most relevant, being naringin and eriocitrin the major ones, followed by carotenes and different types of acids, such as ascorbic or malic [4]. The flavonoids mainly appear in the glycosidated form, that takes place in position 7, in compounds such as rutinose or neohesperidose [5]. Other glucoside groups identified in grapefruit are neohesperidine, didymin and poncirin [6]. Recently, different studies focus on understanding the interactions of grapefruit bioactive compounds with the positive reduction of chronic diseases and the health benefits [7].

The formulation of a nutraceutical product in powdered form is of huge interest for consumers. For this reason, it is important to ensure (i) the selection and development of an appropriate matrix and technological process able to maintain the active compound structure from production until consumer consumption and (ii) to guaranty the bioactive compounds delivery to the physiological target within the organism. Nevertheless, despite the richness in bioactive compounds that Star Ruby variety can offer, it is important to identify the main bioactives compounds present as well as to understand their interaction with the digestive system. *In vitro* models are essential tools to evaluate the possible permeation of bioactive compounds in intestine and their possible health effects [8]. The most commonly lineage used for the cell culture models is Caco-2, representing the intestinal line. However, this lineage has some limitations such as the lack of mucins production that have a great influence on absorption. Therefore, this cell line is normally complemented with HT29-MTX cell line, responsible for this property in order to

improve the paracellular permeability of hydrophilic compounds in intestinal 3D models [9, 10].

The main aim of this paper was to characterize a grapefruit nutraceutical powder at the level of physical properties as well as its phenolic and antioxidant capacity. Indeed, the bioavailability of the bioactive compounds of grapefruit nutraceutical was assessed through a 3D intestinal model, identifying by LC-ESI-MS the bioactive compounds that could be assimilated by the digestive system.

IV.2. Materials and methods

IV.2.1. Preparation of feed mixture and spray drying conditions

The grapefruit powder was obtained by spray drying of grapefruit liquidized through addition of high molecular weight biopolymers as encapsulating factor. The powder formulation was composed of 9.4% of gum arabic (GA), 1.44% of whey protein isolate (WPI), 1.25% of maltodextrin (MD) and 87.95% of liquefied grapefruit (DeLonghi Ròbodiet Compact, Barcelona, Spain), based on the design of optimized response surface experiments (data not show). The fruits (*C. paradisi* variety Star Ruby) were obtained in a local supermarket in Valencia, Spain. The biopolymers GA and MD were supplied by Alfa Aesar[®] (Karlsruhe, Germany) and WPI Lacprodan[®] DI-9212 was from Arla Foods Ingredients (Viby, Denmark). Once the mixture with all ingredients was prepared, the sample was spray dried in a Büchi-mini equipment (B-290, Flawil, Switzerland) under conditions of aspiration speed of 35 m³/h, feed flow of 9 mL/min and an atomizer flow of 473 L/h at a maximum temperature of 148 °C and a pressure of 5·10⁵ Pa. The powder was vacuum-packed (Edesa vac-20 SL, Guipúzcoa, Spain) for further characterization steps.

IV.2.2. Physical properties of the powder

The water content was determined in triplicate by a gravimetric method [11] in a vacuum oven (VACIOTEM, JP Selecta, Barcelona, Spain) at 60 °C until constant weight and expressed as g water/100 g powder.

The bulk density (ρ_a) was determined, in triplicate, based on the measure of the volume occupied by a known amount of sample (≈ 1 g) after being subjected to a stage of vibration at 1600 rpm for 10 s (Infrared Vortex Mixer, F202A0175, Spain) and applying Eq. (1).

$$\rho_a = m/v_f \quad (1)$$

where ρ_a (g/mL) is the bulk density, m is the mass (g) of powder and v_f is the volume after vibration (mL).

The Eq. (2) was used to obtain the porosity (ε). The true density (ρ) was calculated from the composition in water and carbohydrate of the samples, applying Eq. (3).

$$\varepsilon = \frac{\rho - \rho_a}{\rho} \quad (2)$$

$$\rho = \frac{1}{\frac{x_w^p}{\rho_w} + \frac{(1-x_w^p)}{\rho_{CH}}} \quad (3)$$

where ε is the porosity, ρ is the true density and ρ_a is bulk density (Eq. 1), ρ_w is the water density at 20 °C (0.9976 g/mL) and ρ_{CH} is the carbohydrate density at 20 °C (1.4246 g/mL) and x_w^p water content of the powder expressed as g water/ g powder.

The color of the samples was measured in triplicate by using a spectrophotometer (MINOLTA, CM3600-D, Spain, reference illuminant D65 and 10 ° observer). The CIE $L^*a^*b^*$ coordinates were obtained from which the hue angle (h_{ab}^* , Eq. 4) and the chroma (C_{ab}^* , Eq. 5) were calculated.

$$h_{ab}^* = \arctg\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (4)$$

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (5)$$

IV.2.3. Preparation of the Freeze-dried extracts

In order to find the maximal information from the bioactive composition of the grapefruit powdered product, two extraction solvents were used: (1) Oxalic Acid (Scharlab S.L, Barcelona, Spain) with a concentration of 0.1% (w/v) in distilled water and (2) Methanol-Water (Scharlab S.L, Barcelona, Spain) in a proportion of 70:30 (v/v). 1 g of the powder was mixed with 9 mL of each extraction solvent. The extraction was carried out with magnetic stirring of the mixture for 20 min, in darkness at room temperature and after being centrifuged (EppendorfTm 5810R, Wesseling-Berzdorf, Germany) at 10000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant was evaporated in a rotavapor (Büchi R-200, Postfach, Switzerland) and retained in a plastic container to be subsequently freeze-dried (Telstar® CRYODOS-80, Terrassa, Spain). During freeze-drying (72 hours), the temperature was kept at -55 °C in the condenser. Two extractions which each solvent was carried out. The extraction yields were quantified by the weight of the freeze-dried Oxalic Acid extract (FDOA) or freeze-dried Methanol-Water extract (FDMW).

IV.2.4. Determination of the Total Phenolic Content

The Total Phenolic Content (TPC) was spectrophotometrically determined according to the Folin-Ciocalteu [12] procedure with minor modifications [13]. Briefly, 30 µL of reconstituted sample in its respective extractor solvent (till the initial volume before dehydration) was mixed with 150 µL of Folin-Ciocalteu reagent (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and mixed with distilled water (1:10) and 120 µL of 7.5% Na₂CO₃ solution (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and incubated at 40 °C during 15 min. The mixture was then allowed 30 min at room temperature protected from light before the absorbance being determined at 765 nm using a Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winoosli, VT, USA). Gallic acid (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was used as standard and a calibration curve was prepared (5-100 mg/L, $R^2 > 0.999$). The TPC of samples was expressed as mg of Gallic Acid Equivalents (GAE) per 100 g dry basis (mg GAE/100 g db).

IV.2.5. Determination of the Total Flavonoid Content

The Total Flavonoid Content (TFC) was determined by a colorimetric assay [14] with minor modifications. Briefly, 30 μL of reconstituted sample in its respective extractor solvent was mixed with 75 μL of distilled water and 45 μL of NaNO_2 (1%). After 5 minutes, 45 μL of AlCl_3 (5%) was added as well as 60 μL NaOH (1M) and 45 μL of distilled water. The absorbance was determined at 510 nm using a Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winoosli, VT, USA). A calibration curve was prepared with Quercetin (5-300 mg/mL, $R^2 > 0.999$). The TFC of samples was expressed as mg of Quercetin Equivalents (QE) per 100 g dry basis (mg QE/100 g db).

IV.2.6. Determination of antioxidant activity

Two different assays were used to screen the antioxidant properties: scavenging activity on DPPH radical (measuring the decrease in DPPH radical absorption after exposure to radical scavengers) and reducing power (measuring the conversion of a Fe^{3+} /ferricyanide complex to the ferrous form (Fe^{2+})).

IV.2.6.1. DPPH free radical scavenging assay

Different sample concentrations were prepared to determine the effective concentration of the antioxidant necessary to decrease the DPPH \cdot (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) concentration by 50% (IC_{50}) [15]. The value IC_{50} was calculated from the graph of radical scavenging activity (RSA) percentage against extract concentration. Briefly, 30 μL of reconstituted sample in its respective extractor solvent was mixed with 270 μL of DPPH (Sigma-Aldrich, Germany) radicals (6×10^{-5} M) dissolved in methanol. The DPPH radical reduction was determined by measuring the absorption at 525 nm in Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winoosli, VT, USA). A calibration curve for the standard Trolox (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) was prepared (5-175 mg/mL, $R^2 > 0.999$). The results were expressed as milligram per milliliter (mg/mL) of DPPH radical reduce.

IV.2.6.2. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

This analysis was carried out according to Benzie and Strain [16] procedure, with minor modifications. Briefly, an aliquot of 35 μL of reconstituted sample in its respective extractor solvent was added to 265 μL of FRAP reagent (10 parts of 300 millimol sodium acetate buffer at pH 3.6, 1 part of 10 millimol TPTZ (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) solution and 1 part of 20 millimol $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solution) and the reaction mixture was incubated at 37 °C for 30 min. The absorbance was measured at 595 nm in a Synergy HT Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Winoosli, VT, USA). A calibration curve was prepared with Trolox (25-500 μM , $R^2 > 0.999$). The results were expressed as millimol Trolox Equivalents (TE) per 100 g dry basis (mg TE/100 g db).

IV.2.7. Cell viability assay

IV.2.7.1. Cell lines and culture conditions

Caco-2 (ATCC HTB-37, passage 31-34) was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, USA). Dr. T. Lesuffleur (INSERM U178, Villejuif, France) kindly provided HT29-MTX (passage 40-41) cell line. Cells were grown separately in tissue culture of 75 cm² flasks (Orange Scientific) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) of inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% (v/v) of non-essential aminoacids (NEAA) and 1% (v/v) of antibiotic/antimitotic mixture (100 U/mL penicillin and 100 U/mL of Streptomycin). Cells were preserved in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ / 95% air at 37 °C (MCO-18ACUV-PE IncuSafe, Panasonic, Kadoma, Japan), and supplied with fresh medium and washing with Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) every 48 hours. The cells were harvested at 90-95% confluence using trypsin. DMEM, FBS, NEAA, antibiotic/antimitotic, HBSS and trypsin were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All the cell related procedures were done in a Thermo Scientific™ MSC-Advantage™ Class II Biological Safety Cabinets (Darmstadt, Germany).

IV.2.7.2. MTT assay

Cells were cultured in 96-well micro titer plates at a density of 25×10^3 cells per mL culture medium for 24 h. Then, cells were washed with HBSS and incubated with different extracts (FDOA, FDMW) concentrations (0.1, 1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) previously

dissolved in DMEM. A positive (cell plus DMEM) and a negative (Triton X-100, 1% w/v) control were used. After this period the extracts were removed and the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added and incubated for 4 h. Dimethylsulfoxide (DMSO) was used to dissolve the MTT crystals and the absorbance was measured at 590 nm with a background subtraction at 630 nm. MTT and DMSO were purchased from Promega (Madison, WI, USA), Triton X-100 was purchased from Boehringer (Mannheim, Germany). The different concentrations were carried out in triplicates in three diverse experiences.

IV.2.8. 3D Intestinal permeability assay

The permeability study was carried out through a co-culture model with 90% of Caco-2 and 10% of HT29-MTX, according to Araújo and Sarmiento [17]. The experiments were performed 21 days after seeding the cells. During this period, the transepithelial electrical resistance (TEER) was monitored to evaluate the cell monolayer integrity. In the last day, cell monolayers were pre-equilibrated with fresh HBSS, pH 7.4 at 37 °C during 30 min. Afterwards, 0.5 mL of FDOA (100 mg/mL) concentration prepared in HBSS was added to the apical side of the co-culture monolayers and 1.5 mL of HBSS to the basolateral side. Samples were withdrawn from receptor side at 15, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes to determine the bioactive compounds transported across the monolayer. At the same times, the TEER was evaluated. After each sampling time, the basolateral side was replaced with the same HBSS volume. Samples were conserved at -20 °C for subsequent LC-ESI-MS analysis.

The permeability results were expressed in relative percentage of transport.

IV.2.9. LC-ESI-MS analysis

To analyze the flavones that potentially crossed the 3D intestinal model, the methodology developed by Teixeira *et al.* [18] was employed. Samples (FDOA) were analyzed by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass spectrometry (LC-ESI-MS) performed in a Finnigan Surveyor Plus HPLC fitted with a PDA Plus detector, an auto-sampler Plus and a LC quaternary pump plus coupled to a Finnigan LCQ Deca XP Plus mass detector equipped with an ESI source and an ion trap quadrupole. The stationary

phase was a Thermo Finnigan Hypersil Gold column (150 × 4.6 mm i.d., 5 μm) at 25 °C. The mass spectrometer was operated in the negative-ion mode with source, with a capillary temperature of 275 °C and capillary voltages of 4.5 kV. The mass spectra were recorded between 250 and 2000 m/z.

The mobile phase was composed by solvent A, 1% (v/v) formic acid, and solvent B, 100% (v/v) acetonitrile. The flow rate was 0.50 mL/min and the gradient method started with a linear gradient ranging from 90% A to 50% A in 50 min, then reaching 100% B in 10 min, a final isocratic gradient of 100% B during 5 min and a final re-equilibration isocratic gradient of 90% A for 5 min.

IV.2.10. Statistical analysis

All the results were expressed as mean ± standard deviation. To study the possible significant differences between the samples, analyzes of the unifactorial variance (ANOVA) and multifactorial (MANOVA) were performed, with a confidence level of 95% ($p < 0.05$). Pearson correlations were also obtained between the antioxidant activity and the bioactive compounds analyzed. The Statgraphics Centurion XVI program was used to perform the analysis.

IV.3. Results and discussion

IV.3.1 Nutraceutical product characterization

The spray drying process involves complex interactions that influence the final product quality. According to Murugesan and Orsat, spray drying has been frequently described as a harsh drying method due to its often high-temperature operation [19]. The physicochemical properties of the final product mainly depend on the feed flow rate, particle size, viscosity, food matrix, spray dryer inlet and outlet temperatures, pressure and type of equipment [20]. One of the properties influenced by the process of spray drying is the water content of the obtained powder. Water content influences other characteristics, such as porosity, compaction or flowability, also affecting the electrochemical and biological properties. Thus, food, pharmaceuticals and chemical

industries always take into account this characteristic [21]. The obtained grapefruit powder presented 1.5 ± 0.2 g water/100 g powder. The low water content of a nutraceutical product leads to a longer shelf life, minimizing the microbial growth and chemical deterioration [22]. Also, it is more convenient to use and cheaper to transport due to its reduced weight and volume [19]. The porosity is related with the free-flowing properties of the powder, the greater the ϵ value the better is flowability [23]. The porosity of the obtained powder was set in $75\% \pm 0.12$.

Colour is one of the principal attributes of foods. Although it does not necessarily reflects nutritional, flavour or functional values, the colour of powdered foods may be associated with the original food and determines the consumers' acceptability. The grapefruit powder showed an $L^*=80.0 \pm 1.8$, $h^*_{ab}= 61.7 \pm 0.4$ and a $C^*_{ab} =$ of 11.4 ± 0.6 . These colour values fall within the range of those reported by González *et al.* [22] and Telis and Martínez-Navarrete [24] in a similar grapefruit product obtained by spray-drying and freeze-drying, respectively .

In every process of product creation, not only the physical appearance is essential but most important, the benefits for consumer must be guarantee. In the case of a nutraceutical, the biodisponibility of the bioactive compounds should be assured. As almost all food products are complex mixtures of vitamins, sugar, lipids, fibers, and phytochemicals, the extraction of bioactive compounds from food matrix is a matter of interest [25]. Different extraction methodologies that use solvents in different proportions are available and each one has advantages and disadvantages, which can be exploited according to the interest of the bioactive compound studied. Trying to find the maximal information from the bioactive composition of the grapefruit powdered product, two extraction solvents were used in this study. Afterwards the corresponding liquid extracts were freeze-dried. The yield of this process was $85\% \pm 2$ and $51.0\% \pm 1.2$ for the FDOA and the FDMW extracts, respectively.

Table 1 summarizes the TPC, TFC and antioxidant activity of the freeze-dried extracts. In general terms, there were significant differences ($p<0.05$) between the antioxidant capacity of the extracts.

No statistical differences ($p>0.05$) were observed in the TPC of both freeze-dried extracts, while TFC was higher ($p<0.05$) in FDOA. Haminiuk *et al.* reported different methodologies of phenolic compounds extraction, being the values obtained in the present

study similar to those of strawberry, açai and fig [26]. Polyphenols have been reported as responsible for the antioxidant activity of citrus fruits due to their redox characteristics [27]. Therefore, the high values of TPC and TFC of the grapefruit product provide high expectations in its role of chemo preventive properties, as well as its antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial activity for human health. The greatest antioxidant capacity ($p < 0.05$) expressed as IC_{50} was obtained in the FDOA extract, while FDMW showed more ability to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} ($p < 0.05$). The antioxidant capacity of the nutraceutical product was similar to those found in other citrus fruits studied by Klimczak *et al.* [28], Chen *et al.* [29] and Álvarez *et al.* [30]. These results indicated that the powdered product, despite being exposed to changes in its structure, still has similar values to different fresh products [31, 32]. Although it is true that the main advantage of the methods established for the quantification of antioxidant activity is its simplicity, the biggest disadvantage is that the results can be influenced by many factors, such as the interaction of the antioxidants in the sample, reagents, pH, times or free radicals production [33].

Table 1 Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), radical scavenging activity (RSA) IC_{50} values and antioxidant activities based on their abilities to reduce ferric iron (Fe^{3+}) to ferrous iron (Fe^{2+}) in the extracts. Values are expressed as means \pm standard deviation ($n = 9$). Different letters (a, b) in the same column indicate significant differences between mean values ($p < 0.05$).

Sample	IC_{50} (mg/mL)	FRAP (mmol TE/ 100 g GS)	TPC (mg GAE/ 100 g GS)	TFC (mg QE/ 100 g GS)
FDOA	0.48 \pm 0.04 ^a	10.3 \pm 0.6 ^a	1274 \pm 48 ^a	6592 \pm 627 ^a
FDMW	0.72 \pm 0.16 ^b	12.7 \pm 0.6 ^b	1294 \pm 98 ^a	4314 \pm 519 ^b

GAE, gallic acid equivalents. QE, quercetin equivalents. TE, trolox equivalents. FDOA, freeze-dried oxalic acid extract. FDMW, freeze-dried methanol-water extract. db, dry basis..

There is some controversy about the influence of the bioactive compounds present in fruits and vegetables with their antioxidant capacity [34]. Chemical interactions affecting free radical scavenging properties between phytochemicals have not been extensively reported in fruits and vegetables, yet both synergistic and antagonistic interactions may affect antioxidant capacity [35]. In this sense, in order to better understand the interactions of TPC and TFC with the antioxidant capacity of the extracts, a Pearson correlation was

performed (Table 2). According to Table 2, the Pearson correlation coefficient between FRAP (-0.9830, oxalic acid solvent extract) and IC₅₀ (-0.9306, methanol and water solvent extract) is higher, validating that both techniques are complementary.

Table 2. Pearson correlation coefficients among total Phenolic Content (TPC), total Flavonoid Content (TFC), radical scavenging activity IC₅₀ values and antioxidant activities based on their abilities to reduce ferric iron (Fe³⁺) to ferrous iron (Fe²⁺) (FRAP analysis).

Interaction	Pearson coefficient	Pearson coefficient
	FDOA	FDMW
FRAP vs. TPC	0.5262	0.5392
FRAP vs. TFC	0.7449*	0.6739*
FRAP vs. IC ₅₀	-0.9830*	-0.9306*
TPC vs. TFC	0.4348	0.8003*
TPC vs. IC ₅₀	-0.8399*	-0.7352*
TFC vs. IC ₅₀	-0.4654	-0.8843*

Freeze-dried oxalic acid extract (FDOA), Freeze-dried methanol-water extract (FDMW), Total Phenolic Content (TPC), Total Flavonoid Content (TFC), radical scavenging activity IC₅₀ values and FRAP antioxidant activity. *p < 0.05 indicate statistically significant correlations at the 95% confidence level. These correlation coefficients range between -1 and +1 and measure the strength of the linear relationship between the variables.

A similar correlation was produced between TPC or TFC and antioxidant capacity (IC₅₀), but with a negative tendency according to Pearson. These results indicate that the phenolic capacity was linked to a high or low antioxidant capacity. Opposite results were found a correlation was evaluated between TPC or TFC and FRAP. However, it must be taken into account that the changes can be due to the extractor agent. The interactions that occur with oxalic acid can be explained based on its strong acidity, being soluble in water and alcoholic compounds and presenting a great power of interaction in the presence of strong oxidative agents (due to the presence of the carboxyl group in its composition). In addition, the antioxidant properties are conferred to flavonoids by the phenolic hydroxyl groups attached to ring structures as they can act as reducing agents, like hydrogen donors, singlet oxygen quenchers, superoxide radical scavengers and even as metal chelators [27]. These characteristics, together with the interactive power of the extract, generate the relations in a positive or negative way.

These results were expected, since grapefruit is mainly known for its richness in citric and ascorbic acid [36]. Both organic acids provide enzymatic browning and contribute to

the antioxidant capacity. Nevertheless, grapefruit also present high amounts of flavonoids, phytochemicals related to anti-inflammatory, antimicrobial and anticancer properties, already reported by different authors [2, 37, 38].

IV.3.2. Cell viability assay

In order to determine if the bioactive compounds of the nutraceutical product could lead to negative effects on cell proliferation or direct cytotoxic properties that lead to cell death, cell viability assays were performed. In this case, FDOA and FDMW were evaluated in different concentrations (0.1 – 1000 $\mu\text{g/mL}$). Figure 1 summarize the obtained results.

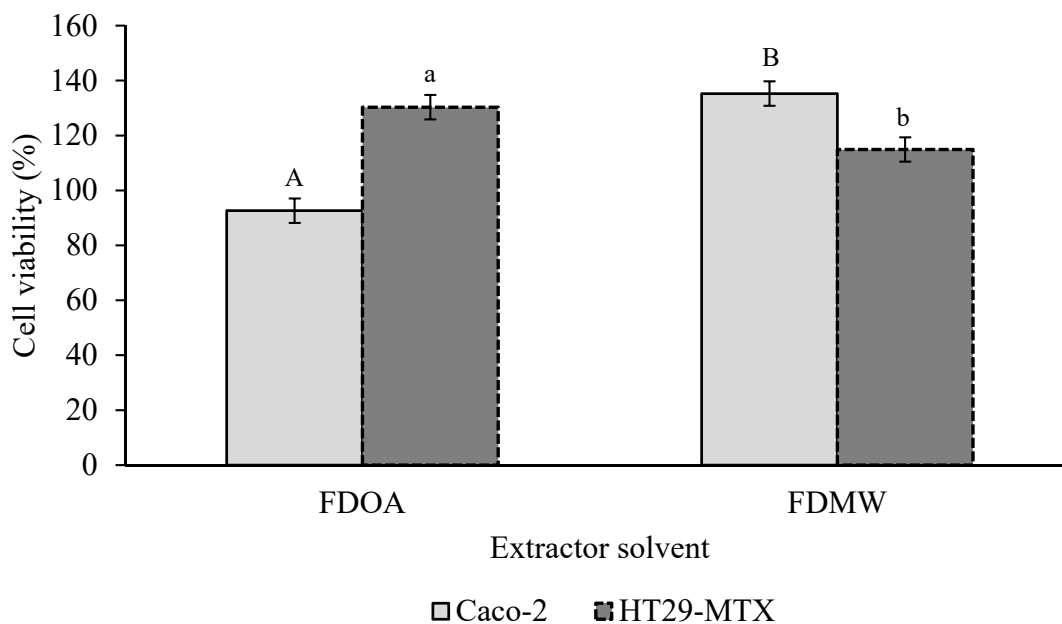


Figure 1. Interactions of cell line and extractor solvent. Freeze-dried acid oxalic extract (FDOA), freeze-dried Methanol-Water extract (FDMW). Different letters (A-B, a-b) indicate significant differences between mean values of extractor solvent and cell line ($p < 0.05$).

As it is possible to observe, initially there were significant differences ($p < 0.05$) between the different extraction solvents. The highest viability in HT29-MTX cells was obtained with FDOA (130%), while for Caco-2 the FDMW presented the best result (135%). However, in both extracts the cell viability was above 90%.

The MANOVA analysis indicated that the main effects that influence cell viability ($p < 0.05$) were the different solvent extractors and their respective concentrations. Analyzing the effect of concentrations (Figure 2), it is possible to observe that the cell viability remains above 90% in all extracts from 0.1 to 100 $\mu\text{g/mL}$.

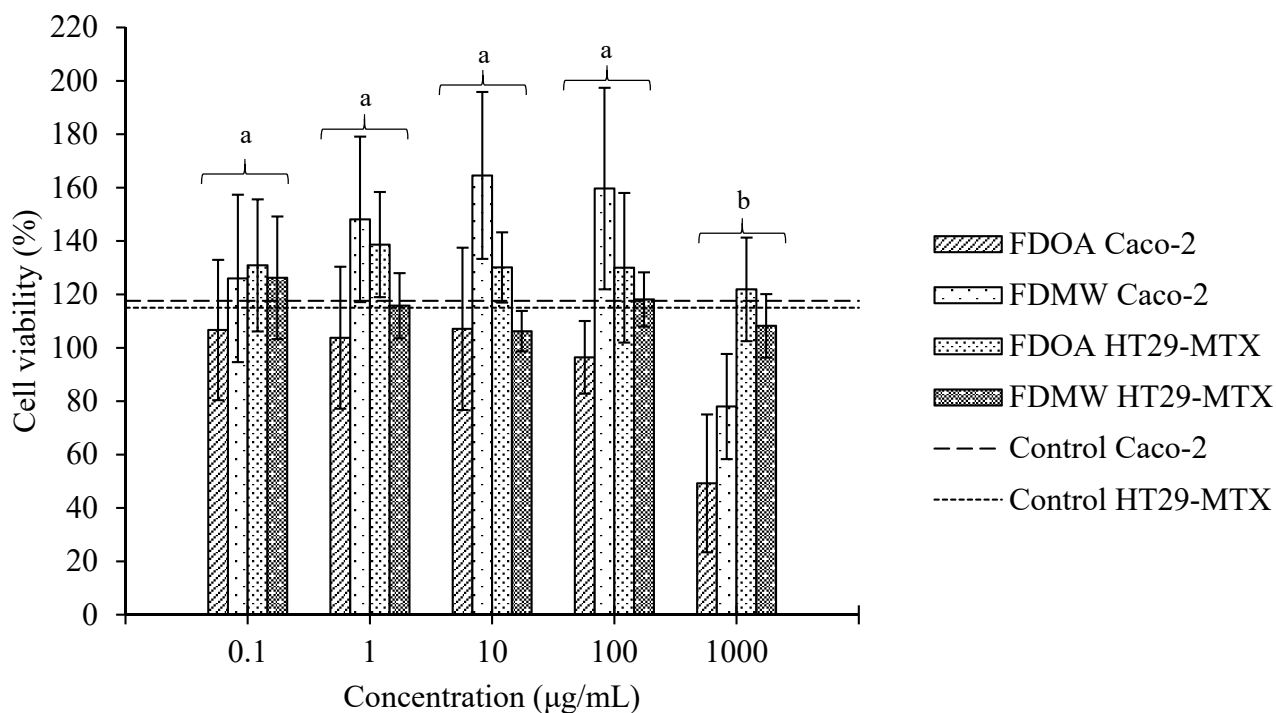


Fig. 2. Cell viability in different concentrations according to the extracts in Caco-2 and HT29-MTX cell lines. Freeze-dried acid oxalic extract (FDOA), freeze-dried Methanol-Water extract (FDMW) and positive Control (dashed lines). Different letters (a-b) indicate significant differences between mean values to concentrations ($p < 0.05$).

At high concentrations, the cell viability decreases, probably due to the extract composition. Nevertheless, in the maximum concentration tested (1000 $\mu\text{g/mL}$), Caco-2 cells showed a significant ($p < 0.05$) viability decrease, not exceeding 80% survival in FDMW and up to 50% survival in FDOA. Conversely, HT29-MTX cells in this concentration exceed 100%. However, within the same concentration in the different extractor solvent, significant differences ($p < 0.05$) were observed in Caco-2 and HT29-MTX cells. These results are in accordance with Laitinen *et al.* that evaluated the extracts effects of food supplements and food fractions in Caco-2 cells, obtaining a greater cell viability at lower concentrations (0.02 and 0.2 mg/mL) and finding a minimum viability of 77% in all samples [39]. Similar results were reported by Xu *et al.* in a study focused on citrus juices, in which grapefruit juice did not affect the viability of Caco-2 cells [40].

Equally, Chen and Kitts reported good results in orange peel in Caco-2 cells using 7.5% ethanol as extract solvent [41]. In fact, FDOA an FDMW did not lead to a toxic effect in both cell lines ($p < 0.05$). This could indicate a protective effect of these extracts (in concentrations between 0.1 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in both cell line, since instead of causing damage to the cell, it keeps it in good condition [42, 43]. Nevertheless, a more detailed study has to be performed to support this protective effect.

IV.3.3. 3D Intestinal permeability assay

IV.3.3.1. Identification of bioactive compounds

Citrus fruits are rich in bioactive compounds, especially the Star ruby variety [44]. Flavonoids are among these compounds, being characterized by a skeleton of 15 carbons, mostly linked to one or more sugar molecules. According to Theile *et al.* [45], grapefruit presents high flavonoid glycosides contents, being characterized by the presence of rutinoides (such as hesperidin and narirutin) and neohesperidoside flavonoids (namely naringin and neohesperidin). Figure 3 show the phenolic profile obtained for grapefruit in FDOA, indicating the presence of flavonoids, particularly between 20 and 35 minutes.

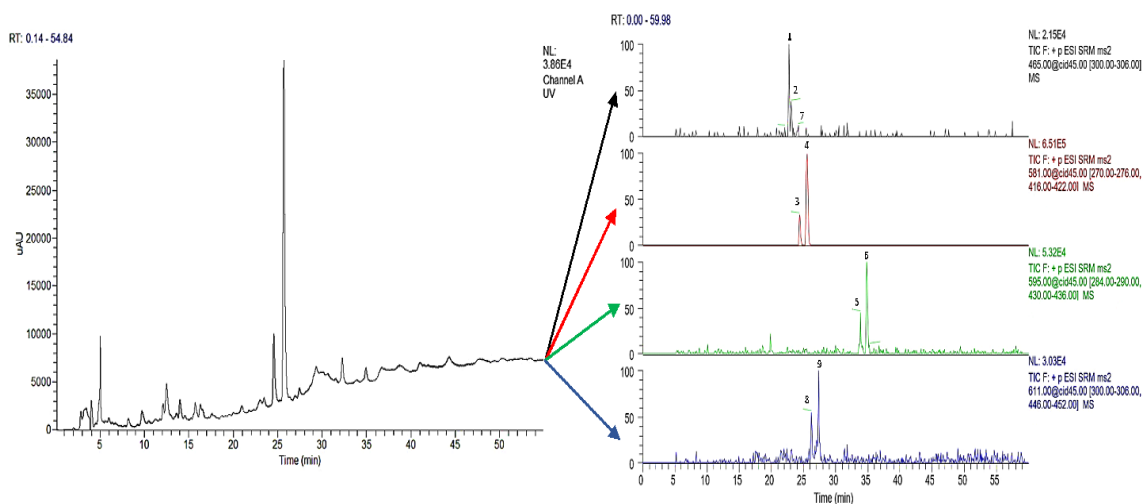


Figure 3. Example of the LC-ESI-MS analysis of the FDAO in its different wavelengths. 1: Delphinidin-3-glucoside or herperitin-7-*O*-glucodide; 2: Eriodictyol-7-*O*-neohesperidide; 3: Eriodictyol-7-*O*-rutinoside; 4: Hesperidin or neohesperidin; 5 and 6: Didymine, poncirin or saponarin; 7 and 8: Naringin or narirutin; 9: Hesperidin.

Table 3 summarize the different phenolic compounds identified.

Table 3. Tentative identification of grapefruit nutraceutical powder main compounds. Time retention (t_r), molecular ion with negative charge [MS] (m/z), fragments of ions [MS2] [MS3] (m/z), wavelength at maximum visible absorption (λ_{max}).

Compound	t_r (min)	[MS]	MS ²	MS ³	λ_{max} (nm)	Possible Compounds	References
1	22.79	465	303		247; 328	Delphinidin-3-glucoside/hesperitin-7-O-glucoside	12, 13, 19, 21
2	23.23	595	287		280	Neoeriocitrin (Eriodictyol-7-O-neohesperidide)	2, 3, 5,9, 19,21
3	24.15	595	287		283; 325	Eriocitrin (Eriodictyol-7-O-rutinoside)	1, 2, 4,5, 6, 9, 18
4	26.22	611	449	303	280; 320	Hesperidin/Neohesperidin	7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 20
5	33.88	595	433	287	280	Didymin/Poncirin/Saponarin	11, 17, 20
6	35.05	595	433	287	289; 320	Didymin/Poncirin/Saponarin	11, 17, 20
7	20-35	581	419	273	280; 320	Naringin/Narirutin	11, 15, 17, 19, 20
8	20-35	581	419	273	280; 320	Naringin/Narirutin	11, 15, 16, 17, 19, 20
9	20-35	611	449		280; 320	Hesperidin	15, 17, 20

In the analysis of the initial sample, different compounds were identified depending on the wavelength evaluated, the retention times and the maximum fragments that the mass spectrometer can detect. A possible identification was performed based on these characteristics. Compound 1 could be an anthocyanin (delphinidin-3-glucoside), according to the molecular weight and the fragments obtained (465, 303 m/z). However, taking into account its wavelength and retention time, it could also be a flavonone (hesperitin-7-O-glucoside). Compounds 2 and 3, due to their closeness in molecular weights (595 m/z) and fragments (287 m/z) with differences in retention time (23.23 and 24.25 min) and wavelengths, could be a flavonone of 7-O-glucoside group. In this case, compound 2 would be neoeriocitrin (eriodictyol-7-O-neohesperidide) and compound 3 eriocitrin (eriodictyol-7-O-rutinoside). According to the literature, compound 4 is probably a hesperidin or a neohesperidin [46-48]. In what concerns to compounds 5 and 6 that present similar molecular weight and fragments (595, 433 and 287 m/z) are probably didymin, poncirin or saponarin, while compounds 7, 8 and 9 were identified by their molecular weight and respective fragments. In the case of compounds 7 and 8 (581,

419 and 273 m/z) a naringin or a narirutin are probably present. Compound 9 could be more accurately hesperidin (611, 449 m/z), being similar to compound 4 and differing in the fragments obtained.

IV.3.3.2. 3D Intestinal permeability

In order to ensure the intestinal permeability, it is necessary to monitor the co-culture TEER. TEER is a very sensitive and reliable method to confirm the integrity and permeability of cells culture, being a non-invasive method that can be applied to monitor living cells during various stages of growth and differentiation [10]. Figure 4 shows the TEER measurements during the 21 days.

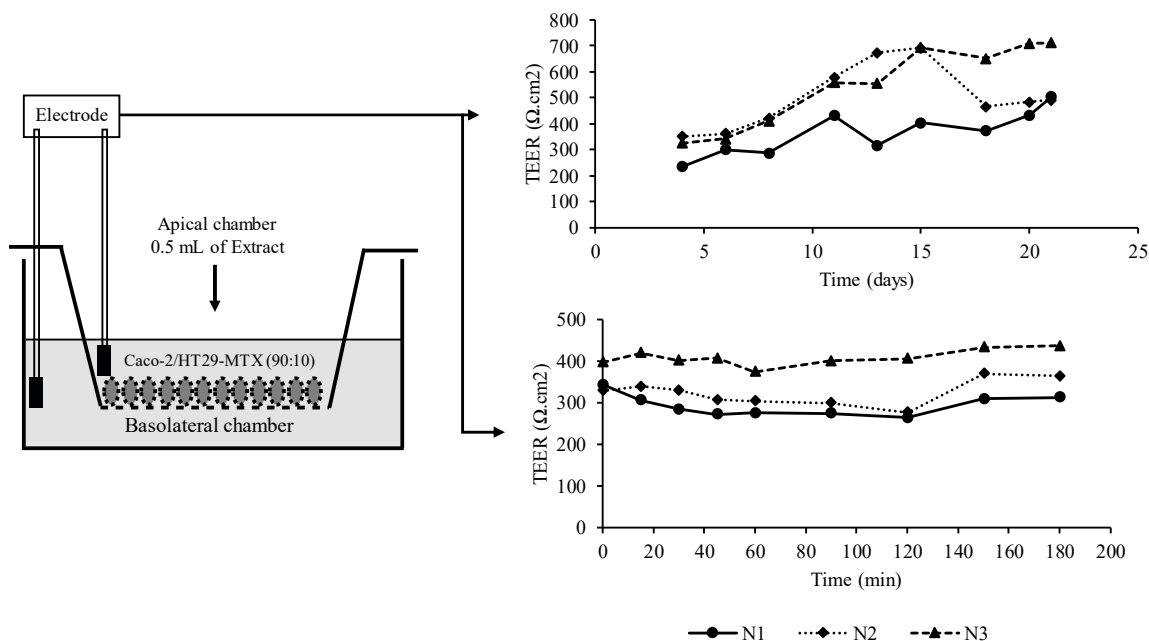


Figure 4. Transepithelial electrical resistance (TEER) measurements of coculture cells (90% Caco-2 and 10% HT29-MTX) during the 21 days and 180 minutes of permeability assay. N1, N2, N3: number of repetitions made.

Similar TEER measurements were made during the permeability experience to guarantee the viability process. The values confirm the integrity of the 3D model, presenting comparable TEER to the one reported by Pereira *et al.* [10].

Once the 180 minutes of permeation in the co-culture was finished, different results were obtained regarding permeability (Figure 5). Figure 5 shows the two working wavelengths and the compounds that were detected initially, at time zero of the experience. Also, the

permeation graph expressed in relative percentage of release, taking into account the apparent permeability that was calculated as the ratio of the original relative percentage permeated through the monolayer, between the apical chamber (time zero min) and the basolateral chamber (time 180 min).

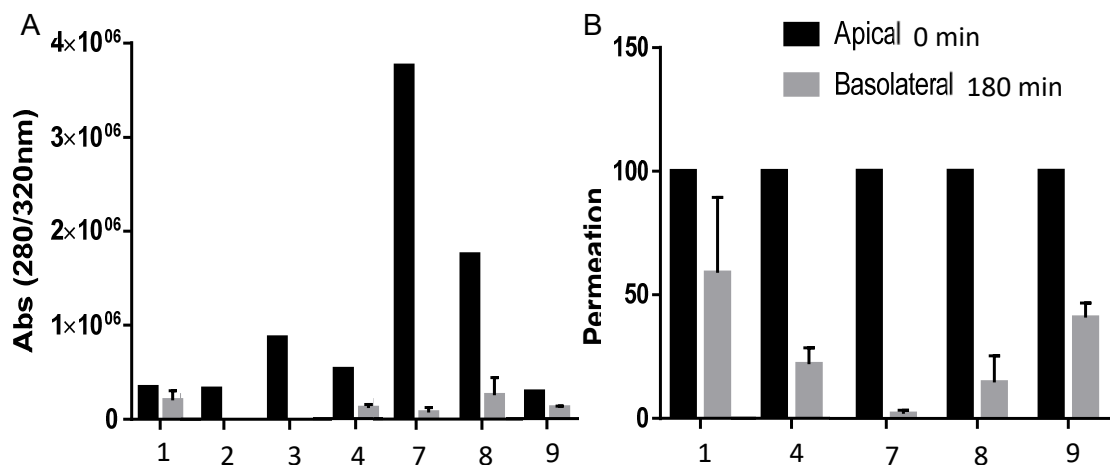


Figure 5. A: Work wavelengths. B: Permeability of bioactive compounds at time 0 and after 180 minutes. 1: Delphinidin-3-glucoside or herperitin-7-O-glucoside; 2: Eriodictyol-7-O-neohesperidide; 3: Eriodictyol-7-O-rutinoside; 4: Hesperidin or neohesperidin; 7 and 8: Naringin or narirutin; 9: Hesperidin.

Regarding all the bioactive compounds identified, only didymin, poncirin or saponarin (compounds 5 and 6) were not detected. Nevertheless, a high permeation was achieved for compound 1 (delphenidin-3-glucoside or hesperitin-7-O-glucoside) and compound 9 (hesperidin), with compound 1 presenting a permeation higher than 50%, followed by hesperidin that was close to 30%. Naringin or narirutin presented a permeability lower than 25% as well as the compound identified as neohesperidin or hesperidin. Tian *et al.* [49] found similar permeation result with flavonoid compounds, namely hesperetin, eriodictyol and naringenin, obtaining values not greater than 60% in Caco-2 cells.

A number of factors interfere with the transport of bioactive compounds present in nutraceutical products, such as the concentration used, the extraction form, the molecule size, the permeation time or even the TEER variability. In addition another factor to take into account is the matrix that protects the bioactive compounds, which refers to the biopolymers (GA, MD and WPI) added during the formulation of the grapefruit nutraceutical product, which can be barriers against permeability [50]. Oxidative stress

may be the main cause in the transference of bioactive compounds, since this mechanism is activated during cell permeation [51]. The compounds that were not transported in their entirety were probably retained within the cell model. This phenomena may be due to the fact that bioactive compounds of citrus origin can be used as elements of cell cytoprotection, reducing the oxidative stress, which is in accordance with Cilla *et al.* [52].

According to the obtained results, compound 1, 4 and 9 were easily transported. This may be due to the encapsulation process carried out by means of spray draying. Compounds 1 and 9 are the bioactive with the best results. Delphinidin-3-glucoside (compound 1) was extensively studied as a suppressive element in cancer cells [53]. However, it can also be hesperitin-7-O-glucoside and hesperidin (compound 9) that agree to be the main bioactive compounds of citrus fruits presenting various pharmacological activities, such as antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory or anticancer [54].

The nutraceutical product derived from the grapefruit and obtained by means of the spray drying process has a great potential as a nutraceutical. The results support that the bioactive compounds were able to be encapsulated and the behavior in cell viability and permeability test showed that there is a likelihood that compounds such as delphinidin-3-glucoside, hesperitin-7-O-glucoside, hesperidin, neohesperidin reach the body target, being a source of oxidative protection.

IV.4. Conclusion

In the last decade, functional and nutraceutical foods have obtained a great demand among consumers due to the potential health benefits that they can offer. In the present study, a grapefruit nutraceutical powder has been obtained by spray drying and characterized regarding different physical and chemical parameters as well as in its intestinal permeability. The obtained results support the good stability in what concerns to moisture and porosity, also presenting an attractive grapefruit color, as well as antioxidant capacity and high content of phenols and flavonoids. The main conclusion of this study is the bioavailability that this product offers to encapsulate the most important *C. paradise* bioactive compounds, such as delphinidin-3-glucoside, hesperitin-7-O-glucoside, hesperidin or neohesperidin, which showed a permeation up to 50% in the 3D intestinal model. Thus, spray-drying technique can be classified as a great alternative in food industry for these products as well as the biopolymers employed in this process.

Acknowledgments

Francisca Rodrigues is thankful for her postdoc research grant from the project Operação NORTE-01-0145-FEDER-000011. Iva Fernandes is grateful for the Post-Doctoral Grant SFRH/BPD/86173/2012 from Foundation for Science and Technology. This work received financial support from the European Union (FEDER funds through COMPETE), under the Partnership Agreement PT2020, and National Funds (FCT, Foundation for Science and Technology) through project LAQV/UID/QUI/50006/2013 and NORTE-07-0124-FEDER-000069 – Food Science. The authors wish also to thank the Ministerio de Economía y Competitividad and FEDER for the financial support given through the Project AGL 2012-39103.

IV.5. References

1. Lv, X., et al., *Citrus fruits as a treasure trove of active natural metabolites that potentially provide benefits for human health*. Chem Cent J, 2015. **9**: p. 68.
2. Uckoo, R.M., et al., *Grapefruit (Citrus paradisi Macfad) phytochemicals composition is modulated by household processing techniques*. J Food Sci, 2012. **77**(9): p. C921-6.
3. Berk, Z., *Chapter 2 - Morphology and chemical composition*, in *Citrus Fruit Processing*, Z. Berk, Editor. 2016, Academic Press: San Diego. p. 9-54.
4. Cristobal-Luna, J.M., et al., *Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties*. Food Chem Toxicol, 2018. **112**: p. 224-234.
5. Peterson, J.J., et al., *Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature*. Journal of Food Composition and Analysis, 2006. **19**: p. S74-S80.
6. Kelebek, H., *Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (Citrus paradisi) cultivars grown in Turkey*. Industrial Crops and Products, 2010. **32**(3): p. 269-274.
7. Hung, W.-L., J.H. Suh, and Y. Wang, *Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit*. Journal of Food and Drug Analysis, 2017. **25**(1): p. 71-83.

8. Huang, H., et al., *In vitro bioaccessibility and health risk assessment of heavy metals in atmospheric particulate matters from three different functional areas of Shanghai, China*. *Sci Total Environ*, 2018. **610-611**: p. 546-554.
9. Chen, X.M., I. Elisia, and D.D. Kitts, *Defining conditions for the co-culture of Caco-2 and HT29-MTX cells using Taguchi design*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2010. **61**(3): p. 334-42.
10. Pereira, C., et al., *Dissecting stromal-epithelial interactions in a 3D invitro cellularized intestinal model for permeability studies*. *Biomaterials*, 2015. **56**: p. 36-45.
11. AOAC, *Official methods of analysis of aoac international*. Official methods of analysis of AOAC International, 2012.
12. Singleton, V.L. and J.A.J. Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965. **16**: p. 144-158.
13. Alves, R., et al., *Antiradical Activity, Phenolics Profile, and Hydroxymethylfurfural in Espresso Coffee: Influence of Technological Factors*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. **58**(23): p. 12221-12229.
14. de Francisco, L., et al., *Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product*. *Food Research International*, 2018. **105**(Supplement C): p. 537-547.
15. Barros, L., P. Baptista, and I.C.F.R. Ferreira, *Effect of Lactarius piperatus fruiting body maturity stage on antioxidant activity measured by several biochemical assays*. *Food and Chemical Toxicology*, 2007. **45**(9): p. 1731-1737.
16. Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, *Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*, in *Methods in Enzymology*, P. Lester, Editor. 1999, Academic Press. p. 15-27.
17. Araujo, F. and B. Sarmiento, *Towards the characterization of an in vitro triple co-culture intestine cell model for permeability studies*. *Int J Pharm*, 2013. **458**(1): p. 128-34.
18. Teixeira, N., et al., *Wine industry by-product: Full polyphenolic characterization of grape stalks*. *Food Chemistry*, 2018. **268**: p. 110-117.

19. Murugesan, R. and V. Orsat, *Spray Drying for the Production of Nutraceutical Ingredients—A Review*. Food and Bioprocess Technology, 2012. **5**(1): p. 3-14.
20. Costa, R.G., et al., *Effect of operating conditions on the yield and quality of açai (Euterpe oleracea Mart.) powder produced in spouted bed*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **64**(2): p. 1196-1203.
21. Karam, M.C., et al., *Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review*. Journal of Food Engineering, 2016. **188**: p. 32-49.
22. González, F., et al., *Impact of Temperature, Gum Arabic and Carboxymethyl Cellulose on Some Physical Properties of Spray-Dried Grapefruit*, in *International Journal of Food Engineering*. 2018.
23. Agudelo, C., et al., *Phytochemical content and antioxidant activity of grapefruit (Star Ruby): A comparison between fresh freeze-dried fruits and different powder formulations*. LWT, 2017. **80**: p. 106-112.
24. Telis, V.R.N. and N. Martínez-Navarrete, *Application of compression test in analysis of mechanical and color changes in grapefruit juice powder as related to glass transition and water activity*. LWT - Food Science and Technology, 2010. **43**(5): p. 744-751.
25. Chemat, F., et al., *Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review*. Ultrasonics Sonochemistry, 2017. **34**: p. 540-560.
26. Haminiuk, C.W.I., et al., *Phenolic compounds in fruits – an overview*. International Journal of Food Science & Technology, 2012. **47**(10): p. 2023-2044.
27. Carocho, M. and I.C. Ferreira, *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives*. Food Chem Toxicol, 2013. **51**: p. 15-25.
28. Klimczak, I., et al., *Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices*. Journal of Food Composition and Analysis, 2007. **20**(3): p. 313-322.
29. Chen, G.-L., et al., *Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion*. Industrial Crops and Products, 2014. **57**: p. 150-157.

30. Alvarez, J., et al., *Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices*. Food Chem, 2014. **164**: p. 396-405.
31. İnan, Ö., M.M. Özcan, and F. Aljuhaimi, *Effect of location and Citrus species on total phenolic, antioxidant, and radical scavenging activities of some Citrus seed and oils*. Journal of Food Processing and Preservation, 2018. **42**(3): p. e13555.
32. Oboh, G. and A.O. Ademosun, *Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels*. J Food Sci Technol, 2012. **49**(6): p. 729-36.
33. Shahidi, F. and Y. Zhong, *Measurement of antioxidant activity*. Journal of Functional Foods, 2015. **18**: p. 757-781.
34. Guo, C., et al., *Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay*. Nutrition Research, 2003. **23**(12): p. 1719-1726.
35. Talcott, S.T., et al., *Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*)*. J Agric Food Chem, 2003. **51**(4): p. 935-41
36. La Cava, E.L.M. and S.C. Sgroppo, *Evolution during refrigerated storage of bioactive compounds and quality characteristics of grapefruit [*Citrus paradisi* (Macf.)] juice treated with UV-C light*. LWT - Food Science and Technology, 2015. **63**(2): p. 1325-1333.
37. Majo, D.D., et al., *Flavanones in Citrus fruit: Structure–antioxidant activity relationships*. Food Research International, 2005. **38**(10): p. 1161-1166.
38. Zou, Z., et al., *Antioxidant activity of Citrus fruits*. Food Chemistry, 2016. **196**: p. 885-896.
39. Laitinen, L.A., et al., *Effects of Extracts of Commonly Consumed Food Supplements and Food Fractions on the Permeability of Drugs Across Caco-2 Cell Monolayers*. Pharmaceutical Research, 2004. **21**(10): p. 1904-1916.
40. Xu, J., M.L. Go, and L.Y. Lim, *Modulation of digoxin transport across Caco-2 cell monolayers by citrus fruit juices: lime, lemon, grapefruit, and pummelo*. Pharm Res, 2003. **20**(2): p. 169-76.
41. Chen, X.M. and D.D. Kitts, *Flavonoid composition of orange peel extract ameliorates alcohol-induced tight junction dysfunction in Caco-2 monolayer*. Food Chem Toxicol, 2017. **105**: p. 398-406.

42. Groh, K.J. and J. Muncke, *In Vitro Toxicity Testing of Food Contact Materials: State-of-the-Art and Future Challenges*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2017. **16**(5): p. 1123-1150.
43. Kaindl, U., et al., *The dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage*. Food Chem Toxicol, 2008. **46**(4): p. 1320-6.
44. Garcia-Martinez, E., et al., *Antioxidant and anti-inflammatory activities of freeze-dried grapefruit phenolics as affected by gum arabic and bamboo fibre addition and microwave pretreatment*. J Sci Food Agric, 2018. **98**(8): p. 3076-3083.
45. Theile, D., et al., *Clementine juice has the potential for drug interactions - In vitro comparison with grapefruit and mandarin juice*. Eur J Pharm Sci, 2017. **97**: p. 247-256.
46. Cheigh, C.-I., E.-Y. Chung, and M.-S. Chung, *Enhanced extraction of flavanones hesperidin and narirutin from Citrus unshiu peel using subcritical water*. Journal of Food Engineering, 2012. **110**(3): p. 472-477.
47. Londoño-Londoño, J., et al., *Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method*. Food Chemistry, 2010. **119**(1): p. 81-87.
48. Yan, C., et al., *A study of isomeric diglycosyl flavonoids by SORI CID of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry in negative ion mode*. J Am Soc Mass Spectrom, 2007. **18**(12): p. 2127-36.
49. Tian, X.J., et al., *Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model*. Int J Pharm, 2009. **367**(1-2): p. 58-64.
50. Almingier, M., et al., *In Vitro Models for Studying Secondary Plant Metabolite Digestion and Bioaccessibility*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014. **13**(4): p. 413-436.
51. Chen, Z.T., et al., *Protective effects of sweet orange (Citrus sinensis) peel and their bioactive compounds on oxidative stress*. Food Chem, 2012. **135**(4): p. 2119-27.
52. Cilla, A., et al., *Protective effect of bioaccessible fractions of citrus fruit pulps against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells*. Food Res Int, 2018. **103**: p. 335-344.
53. Yang, X., et al., *Delphinidin-3-glucoside suppresses breast carcinogenesis by inactivating the Akt/HOTAIR signaling pathway*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 423.

54. Wang, Q.-Q., et al., *Hesperetin derivatives: Synthesis and anti-inflammatory activity*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016. **26**(5): p. 1460-1465.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Para el estudio del impacto de la incorporación de distintos biopolímeros en algunas propiedades de un polvo de pomelo obtenido por atomización, en una primera etapa, se trabajó con GA, CMC, MD y WPI. En esta parte del trabajo se ha ensayado la metodología de superficie de respuesta como herramienta con la que optimizar tanto la temperatura de entrada del aire en el atomizador como la formulación del licuado de pomelo. Para la optimización se buscó maximizar el rendimiento del proceso y obtener un polvo con la menor humedad, mayor porosidad, además de muy luminoso, bajo en croma y con un tono más amarillo que naranja-rojizo. Este color, aunque no es el más parecido al del licuado de pomelo, es el que corresponde a un polvo suelto, con baja pegajosidad, que es una característica esperable de cualquier producto en polvo. Éste sólo se obtiene si se añaden biopolímeros al licuado, los cuales actúan como *carriers* del proceso, pero también afectan al color del polvo obtenido. De hecho, al producto atomizado obtenido con un típico color de pomelo, ni si quiera se le pudo medir la porosidad por el método utilizado.

Con la metodología de superficie de respuesta se pudo establecer, además de una correlación entre las variables independientes y las variables respuesta, a través de ecuaciones polinómicas que explican más del 50% de la variabilidad de la respuesta, el nivel óptimo de las primeras. Como efectos más significativos se ha visto, por una parte, como GA y MD contribuyen a aumentar el rendimiento del proceso y la porosidad del producto, aunque con una interacción negativa entre ellas. Por su parte, GA también contribuye al aumento de la humedad del polvo obtenido, mientras que CMC disminuye el rendimiento, pero aumenta la porosidad del polvo. En cuanto a la temperatura de atomización, las interacciones observadas llevan a concluir que se consigue mejor calidad del polvo trabajando a temperaturas intermedias. Así, los resultados obtenidos permiten proponer, como condiciones para la obtención del mejor producto en polvo, preparar el licuado de pomelo añadiendo, bien 12.82 g de GA/100g licuado o bien (9.4 g GA+1.25 g MD+1.4 g WPI)/100 g licuado y atomizar a 141.9 °C o 148 °C, respectivamente. El uso moderado tanto de MD como de WPI permite disminuir el coste asociado al uso único de GA como materia prima, aunque a costa de obtener un rendimiento en materia seca ligeramente menor (64 % vs. 59 %). En cuanto a la calidad del producto en polvo obtenido, éste presenta propiedades muy similares en ambos casos. Por este motivo, se propone como producto en polvo optimizado para continuar con el estudio el obtenido añadiendo (9.4 g GA+1.25 g MD+1.4 g WPI)/100 g licuado y atomizando a 148 °C.

El trabajo realizado hasta el momento y los resultados obtenidos permiten proponer la metodología de superficie de respuesta como una herramienta útil en estudios de este tipo, en los que contemplar todas las combinaciones de todas las variables independientes, en diferentes niveles, supondría abordar un número de experiencias muy elevado. Es cierto que con esta metodología se minimiza el número de experiencias, pero no es menos cierto que, desde el punto de vista “científico” siempre hay algunas combinaciones de las variables que resulta interesante estudiar y quedan fuera del diseño, así como otras de las que se incluyen que, quizás, podrían obviarse. En este sentido, y desde la experiencia adquirida en este trabajo, esta metodología resulta muy interesante cuando ya se tiene algo de información de las variables independientes y su viabilidad, de manera que lo que se pretende es afinar en el nivel al que deben aplicarse.

Vista la formulación optimizada conseguida hasta el momento y continuando con el objetivo de disminuir los costes del proceso de atomización y/o para simplificar la formulación, en la siguiente etapa del trabajo se hicieron dos consideraciones a dicha formulación, en este caso planteando sólo una serie de experiencias que pusieran de manifiesto la viabilidad o no de ambas. En primer lugar, se diseñaron una serie de experiencias tratando de confirmar, por una parte, el interés de utilizar los 3 biopolímeros en las cantidades propuestas o si podrían combinarse entre ellos de otra forma y, por otra, la posibilidad de sustituir alguno(s) de ellos por OSA. Los resultados obtenidos confirman que la formulación optimizada es la que permite obtener el mayor rendimiento, además de un producto en polvo con la menor humedad y mayor porosidad. Por otra parte, no se desprende una ventaja clara del uso de OSA. En este caso, se obtienen productos más porosos, más secos y con un mayor contenido en vitamina C, aunque con menor contenido en compuestos fenólicos y menor rendimiento, además de que el color se ve más afectado. Como segunda consideración respecto a la formulación del licuado, se estudió la necesidad de diluirlo, al mezclarlo con los biopolímeros, con el fin de disminuir la viscosidad y favorecer el proceso de atomización. Los resultados obtenidos permiten concluir que no es necesaria esta etapa. De esta forma, se reduce considerablemente el tiempo del proceso y, aunque se obtienen productos de menor porosidad, estos no se ven afectados en cuanto a su humedad final, ni al contenido en compuestos bioactivos, además de que el rendimiento en producto en polvo es mayor.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se programó un estudio de almacenamiento del pomelo atomizado para comprobar su estabilidad. Para ello se trabajó con el polvo obtenido atomizando, a 148 °C, un licuado de pomelo al que se añadieron, sin dilución previa, 9.4 g

GA+1.25 g MD+1.4 g WPI/100 g licuado. Se estudió tanto el impacto de la atomización como la evolución, con el tiempo, de la vitamina C (VC), los fenoles (FT) y licopeno (Lp) totales, la actividad antioxidante (AOA), el color y las propiedades mecánicas del polvo, expuesto o no a la luz y a diferentes humedades relativas (HR). La adición de solutos produjo una reducción significativa ($p < 0.05$) de Lp (10% de pérdida), que puede justificarse por la incorporación de oxígeno en las muestras y la ruptura celular adicional durante el proceso de agitación para su mezclado, poniendo en contacto a los carotenoides con el oxígeno y con otras sustancias que pueden acelerar su pérdida. No obstante, este proceso no afectó al contenido de FT ni de VC, aunque sí que produjo una reducción significativa ($p < 0.05$) de AOA. De la misma forma, la atomización tampoco afectó significativamente a FT ni a VC (> 90% de retención) pero sí a Lp (pérdida del 71%) y también a AOA. Con respecto a la estabilidad durante el almacenamiento, en general, FT se conservaron mejor en oscuridad. Los fenoles son compuestos altamente reactivos, cuya estabilidad o degradación dependerá de los complejos moleculares que puedan formar. El polvo de pomelo envasado al vacío almacenado en oscuridad fue la única muestra que conservó su contenido de FT todo el tiempo. En general, durante el almacenamiento y al aumentar HR, Lp disminuyó. Las pérdidas ocurren principalmente durante el primer mes de almacenamiento, independientemente de la luz y de HR (pérdidas del 75-95%). Con respecto a la evolución de VC, independientemente de la presencia o no de luz, las mayores pérdidas ocurren en ambientes con mayor HR. Los resultados obtenidos mostraron que todos los compuestos bioactivos analizados en el polvo de pomelo, tanto los hidrófilos como los lipófilos, especialmente Lp y FT, presentaron una correlación positiva significativa ($p < 0.05$) entre ellos y con AOA.

La capacidad de compactación de un producto en polvo, relacionada negativamente con su flotabilidad o capacidad de fluir en aire, es consecuencia de sus propiedades mecánicas y pueden cuantificarse, por ejemplo, aplicando ensayos de compresión (Barbosa-Cánovas et al. 2005)^{III}. Los resultados obtenidos de aplicar este ensayo al producto en polvo atomizado pusieron de manifiesto un efecto significativo ($p < 0.05$) de HR y del tiempo de almacenamiento, aunque no de la presencia o ausencia de luz. Así, los mayores valores de fuerza de compresión se obtienen cuando el flujo libre de las partículas predomina durante la compresión, lo que ocurre en las muestras almacenadas a RH 11.3 y 23.1%. Sin embargo, cuando predomina la deformación de las partículas (muestras almacenadas a HR 55.9%), la fuerza registrada durante la compresión es más débil. Esto último se asocia al colapso estructural del polvo, que se da con el paso de la matriz amorfa de estado vítreo a gomoso (Telis y Martínez-Navarrete, 2010)^{III}.

De esta manera, la a_w del polvo debe ser igual o inferior a 0.231 para garantizar su fluidez. Pero además, como la transición vítrea es un fenómeno dependiente del tiempo (Roos, 1995)^{III}, se observó una disminución de la fuerza de compresión con el tiempo de almacenamiento, a cualquier HR. Por ello no se recomiendan más de 6 meses de almacenamiento para mantener las propiedades mecánicas iniciales del polvo.

Al igual que las propiedades mecánicas, el color se vio más afectado por HR y por el tiempo de almacenamiento que por la presencia o ausencia de luz. Al aumentar el tiempo y/o HR, las muestras se vuelven más oscuras y adquieren un tono más amarillento y más puro. Esta evolución del color supone una diferencia de color perceptible al ojo humano antes de los 90 días si la HR del entorno del polvo es $\geq 43,2\%$ y a partir de 6 meses de almacenamiento a menor HR (Bodart et al. 2008)^{III}. Los cambios de color observados se correlacionaron ($p < 0.05$) con la pérdida de VC y CT, en relación con su oxidación, promovida por temperaturas moderadas como los 20 °C utilizados en este estudio para el almacenamiento de los polvos (Agudelo 2017; Du et al. 2012; Sant'Anna et al. 2013)^{III}.

En resumen, los resultados obtenidos del estudio de almacenamiento ponen de manifiesto la gran inestabilidad del licopeno y recomiendan, para asegurar la flotabilidad del polvo y la estabilidad del color, de la vitamina C y de la capacidad antioxidante durante al menos 6 meses, almacenar el producto a una $HR \leq 23.1\%$ si la temperatura es de 20 °C.

Por último, con el fin de estudiar el potencial del polvo de pomelo optimizado como nutracéutico, se planteó un estudio de bioaccesibilidad de algunos compuestos bioactivos a través de un modelo intestinal 3D que utilizó la combinación de las líneas celulares Caco-2 y HT29-MTX. Los compuestos bioactivos teóricamente asimilados por el sistema digestivo fueron identificados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un Espectrómetro de Masas con Ionización por Electrospray. Para ello se trabajó con 2 medios disolventes de extracción: ácido oxálico:agua y metanol:agua y los extractos se liofilizaron para su análisis en cuanto al contenido en fenoles y flavonoides (totales y mayoritarios), así como en cuanto su actividad antioxidante. Los altos valores de compuestos fenólicos encontrados en el polvo de pomelo proporcionan altas expectativas para la salud humana, por su papel preventivo frente a la quimioterapia, así como su capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antimicrobiana (Gioxari et al. 2015)^{IV}. En términos generales, hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la capacidad antioxidante de los extractos obtenida tanto por IC_{50} como por FRAP. Los resultados mostraron que los flavonoides se extraen mejor

con el disolvente ácido oxálico:agua, por lo que se eligió este extracto para continuar con el trabajo.

Con respecto a la bioaccesibilidad del extracto reconstituido a diferente concentración, en primer lugar, se realizaron ensayos de viabilidad celular con el fin de determinar si los compuestos bioactivos del producto nutracéutico podrían producir efectos negativos en la proliferación celular o propiedades citotóxicas directas que eventualmente conducirían a la muerte celular. Una vez comprobada que la viabilidad celular del extracto fue superior al 90 %, en todos los casos, a concentraciones desde 0.1 a 100 µg/mL, se realizaron ensayos de permeabilidad intestinal, previa identificación tentativa de los compuestos bioactivos existentes según el espectro de masas obtenido, que parecen pertenecer al grupo de la *delfenidina o hesperitina; hesperidina o neohesperidina; neoeriocitina; eriocitrina; naringina o narirutina; didimina, poncirina o saponarina*. De todos estos compuestos, no se detectó permeabilidad del último grupo y los más permeables fueron los 2 primeros (50 % y 30 %, respectivamente), seguidos del resto (< 25%). Estos compuestos ven facilitado su transporte celular, probablemente debido al efecto encapsulante de los biopolímeros GA, MD y WPI, utilizados en la formulación del licuado. Los compuestos de los dos primeros grupos parecen ser los principales compuestos bioactivos de los cítricos que presentan diversas actividades farmacológicas, como antioxidantes, antibacterianos, antiinflamatorios o anticancerígenos (Yang *et al.* 2016, Wang *et al.* 2016)^{IV}. El transporte a través de las células es lo que les permite alcanzar los puntos diana del organismo en los que ejercen la protección oxidativa. En base a estos resultados, parece que los extractos del pomelo en polvo obtenido por atomización tienen un gran potencial como nutracéutico. Sin embargo, convendría hacer estudios de biodisponibilidad que permitieran confirmar las actividades biológicas *in vivo* de los compuestos identificados.

Bibliografía

La bibliografía citada en este apartado de la presente Tesis Doctoral puede consultarse en los Capítulos III (III) y IV (IV) de la misma.

GENERAL CONCLUSIONS

With the variables considered in this study, the response surface methodology may be proposed as an adequate tool to optimize the spray drying process.

Among the biopolymers tested as carriers for the spray drying of liquidized grapefruit, gum arabic is the one that allows to carry out the process at a lower temperature and to obtain the highest product yield.

It is possible to decrease the amount of GA at the expense of increasing the amount of MD and WPI, in decreasing order, respectively. Although this slightly reduces the yield, it affects obtaining a powder with lower humidity and better color, although somewhat less porous. In this case the temperature recommended for spray drying increases.

The process optimized in this study is the result of formulating the liquidized grapefruit by adding 9.4 g GA + 1.25 % de MD + 1.4% de WPI / 100 g liquidized and spray drying at 148 °C.

CMC is not recommended for this product, especially because the yield is greatly reduced.

It is recommended to add the biopolymers directly to the liquidized grapefruit, in order to not dilute it this lengthening the process time and decreasing its yield. The previous hydration of the biopolymers does not imply a greater encapsulating power.

The use of OSA to replace GA or MD allows obtaining more porous and drier powders, with a higher content of vitamin C, but with a lower content of phenolic compounds, in addition to slightly decreasing the yield.

Bioactive compounds, especially the FT and the VC, together with the mechanical properties and color of the spray-dried grapefruit powder achieved a high degree of stability when stored at 20°C, $RH \leq 23.1\%$ and for no more than 6 months. In these conditions, the color change of the powder is not appreciated, the powder flowability is ensured, and a product rich in VC and FT is obtained.

Spray drying seems an interesting alternative as to obtain a nutraceutical product from grapefruit powder, which shows a permeability of up to 50% of bioactive compounds such as delphinidin-3-glucoside, hesperitin-7-O-glucoside, hesperidin or neohesperidin, according to the 3D intestinal model used in this study.

