UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Influencia de la matriz alimentaria y el procesado en la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos naturales en un modelo dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Fernández Jalao

Directores

Begoña de Ancos Siguero
Concepción Sánchez-Moreno González

Madrid

© Irene Fernández Jalao, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Influencia de la matriz alimentaria y el procesado en la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos naturales en un modelo dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

IRENE FERNÁNDEZ JALAO

DIRECTORAS:
BEGOÑA DE ANCOS SIGUERO
CONCEPCIÓN SÁNCHEZ-MORENO GONZÁLEZ

Madrid, 2020

© Irene Fernández Jalao, 2020

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

TESIS DOCTORAL

Influencia de la matriz alimentaria y el procesado en la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos naturales en un modelo dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR:

IRENE FERNÁNDEZ JALAO

DIRECTORAS:

BEGOÑA DE ANCOS SIGUERO

CONCEPCIÓN SÁNCHEZ-MORENO GONZÁLEZ

Madrid, 2020

CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición

Las Dras. Begoña De Ancos Siguero y Concepción Sánchez-Moreno González, ambas Investigadores Científicos del Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación titulado: "**Influencia de la matriz alimentaria y el procesado en la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos naturales en un modelo dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica**", realizado por Dña. Irene Fernández Jalao para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM), ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Caracterización, Calidad y Seguridad del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Y para que así conste y dar cumplimiento a lo acordado por la Comisión de Doctorado de la Universidad Complutense de Madrid, firman el presente certificado:

Fdo.:

Dra. Begoña De Ancos Siguero

Fdo.:

Dra. Concepción Sánchez-Moreno González

Madrid, 31 de agosto de 2020

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:
C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA CIERVA:
C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 562 29 00
FAX: 91 564 48 53

AENOR ER Empresa Registrada UNE-EN ISO 9001
ER-0366/2008
IQNet CERTIFIED MANAGEMENT SYSTEM
ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.

Para la realización del presente trabajo se ha contado con la financiación obtenida del Ministerio de Economía y Competitividad de España a través del proyecto: "*Influencia de la matriz y el procesado en el metabolismo y efecto prebiótico de compuestos fenólicos naturales en un modelo gastrointestina*l dinámico" (**AGL2013-46326-R**).

Parte de la investigación de la sección 3 ha sido realizada durante una estancia de la doctoranda en el Grupo de Biomarcadores Lipídicos en Alimentación y Salud del Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-UAM-CSIC) bajo la dirección del Dr. Francisco Javier Fontecha Alonso.

La presente Tesis Doctoral ha dado lugar a la publicación de varios artículos en revistas científicas y comunicaciones a congresos:

Publicaciones:

- **Fernández Jalao I.**, Balderas C., Calvo M., Fontecha J., Sánchez-Moreno C., De Ancos B. Effect of high-pressure processed apple and onion on human gut microbiota, phenolic metabolites and short chain fatty acids during a dynamic *in vitro* colonic fermentation. Preparado para enviar a *Metabolites*.
- **Fernández Jalao I.**, Balderas C., Sánchez-Moreno C., De Ancos B. Impact of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant capacity of apple treated by high-pressure processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 102486 (2020), https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102486.
- **Fernández-Jalao I.,** Sánchez-Moreno C., De Ancos B. Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple 'Golden Delicious' from different geographical origin. *Innovative Food Science and Emerging Technologie*s 51 (2019) 20–31
- Herranz B., Alvarez M. D., **Fernández-Jalao I.**, Quiles A., Sánchez-Moreno C., Hernando I., de Ancos B. Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 51 (2019) 114–125
- **Fernández-Jalao I.**, Sánchez-Moreno C., De Ancos B. Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonoids and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. *Journal of Food Engineering*, 2017, 213, 60-80.

Comunicaciones a congresos:

- **Fernández-Jalao I.**, Sánchez-Moreno C., Giménez L., De Ancos B. High-pressure processing effect on 'Golden' apple polyphenols and antioxidant capacity modulated by growing region. Presentación póster y manuscrito. VIII International Postharvest Symposium 2016. Cartagena (Murcia, España), (21-24 junio 2016).
- De Ancos B., **Fernández Jalao I**., Sánchez-Moreno C. Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonoids and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. Presentación oral y póster. 4th InternationaI Iseki Food Conference, Viena (Austria), (6-8 julio 2016).
- Alvarez M.D., Herranz B., **Fernández-Jalao I.**, Sánchez-Moreno C., De Ancos B. Release of flavonols in simulated *in vitro* gastrointestinal digestion and its relationship with viscosity in onion and apple products and commercial quercetin supplement. Presentación póster. Iberian Meeting on Rheology (IBEREO 2017), Valencia (España), (6-8 septiembre 2017).
- **Fernández-Jalao I.**, Sánchez-Moreno C., de Ancos B. Flavonols and antioxidant activity of apples treated by high pressure processing subjected to a gastrointestinal

digestion. Presentación póster. IX Congreso CYTA-CESIA, Madrid (España), (16-19 mayo 2017).

- **Fernández-Jalao I.**, Luzuriaga E., Sánchez-Moreno C., De Ancos B. Determination of phenolic compounds and bioaccessibility in different apples varieties. Presentación póster. I Jornada PhDay Facultad de Farmacia UCM (19 diciembre 2017).
- Álvarez M. D., Herranz H., **Fernández-Jalao I.**, Sánchez-Moreno C., de Ancos B. Effect of blanching, freezing and thawing on olive fruits quality. Presentación póster. CRYO2018: Scientific Challenges of Cryobiology. Madrid (España), (10-16 julio 2017).
- **Fernández-Jalao I.**, Sánchez-Moreno C., de Ancos B. Efecto de la cebolla APH sobre la microbiota y ácidos grasos de cadena corta. Presentación póster. 1er Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Almería (España), (20 diciembre 2018).

A mi Fransi

A mi madre

Agradecimientos

Y llegó el momento de escribir las últimas líneas de esta Tesis Doctoral, y no encuentro una mejor manera que mostrando mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna forma me han acompañado durante esta etapa de mi vida, una etapa cargada de buenos momentos y otros menos buenos, pero que sin ninguna duda la han convertido en algo inolvidable.

En primer lugar, debo expresar mi agradecimiento a mis directoras de Tesis, la Dra. Begoña de Ancos y la Dra. Concepción Sánchez-Moreno por confiar en mí y brindarme la oportunidad de comenzar mi camino en la investigación, por todo lo que me habéis enseñado, por vuestra paciencia y consejos. Por todo, ¡gracias!.

A mi tutora de Tesis, Dra. M. Cortes Sánchez, por su ayuda y consejos durante estos años.

Gracias a la Dra. Begoña Olmedilla por abrirme las puertas del ICTAN, por enseñarme lo que era el mundo de la investigación, gracias a lo que aprendí tuve claro que quería dedicarme a ello. Y como no, a la Dra. Rocío Estévez, a mi amiga Rocío, una de las personas más maravillosas que he conocido en Madrid, gracias por todo lo que me has enseñado. Me siento muy afortunada de haberos conocido.

A mis compañeras, Diana, Claudia y Lucía, gracias por estar ahí, por vuestra gran ayuda, consejos, por las risas y los momentos compartidos. Sois una parte fundamental de esta etapa de mi vida. Muchas gracias a todas las personas que he conocido en el ICTAN (Paquita, Eva, Marisa, Mila, Fer, Marta…), con las que he compartido buenos ratos en el laboratorio, cafés y charlas. Gracias a los compañeros de la USTA, USMI, UCC por vuestra ayuda. Gracias también al grupo REOTEXTAL, Dra. Mª Dolores y Dr. Wenceslao, por confiar en mí para continuar mi trayectoria laboral en este maravilloso instituto. A todas las personas que forman o han formado parte de este instituto y que me han brindado su apoyo y cariño durante esta etapa, gracias.

Así mismo agradecer al Dr. F. Javier Fontecha y a la Dra. Mariví Calvo por su gran disposición, ayuda y generosidad durante mi estancia en el CIAL. Gracias también Javi, por integrarme y por hacerme tan ameno el tiempo que estuve con vosotros, eres un gran compañero.

Y gracias a todas las personas que durante esta etapa me han animado y aconsejado, aún sin apenas conocerme. Es un gusto encontrarse con personas que dan sin recibir nada a cambio.

Por último, quiero dedicar unas palabras a mi familia y amigos, las personas que me han aportado la fuerza y el apoyo necesario para realizar esta Tesis.

Gracias mamá, tus consejos sobre que carrera elegir y tú apoyo incondicional en cada una de las decisiones de mi vida me han traído hasta aquí, y por ello, hoy soy quién soy gracias a ti. Te quiero. Gracias a ti también papá, como tú dices, en lo cabezota me parezco a ti y gracias a eso, cuando me propongo algo lucho por conseguirlo. Gracias a mis hermanos, Mary y Rafa, aunque la vida nos ha colocado en una ciudad diferente, siempre estáis cuando os necesito. Os quiero.

También le dedico esta Tesis a dos maravillosas personitas, mis sobrinos, Víctor y Carolina, espero que la vida os devuelva toda la felicidad que vosotros me dais a mí y cumpláis cada uno de vuestros sueños. Os quiero con locura.

A la persona que más lágrimas ha derramado con cada uno de mis logros, gracias abuelo, seguro que estarías muy orgulloso de mi, te echo tanto de menos.

A mis amigas, Gloria, Carmen, Sandra, Paqui y Sonia, por aguantar mis bajones, por vuestros consejos, por confiar en mí más que yo misma y gracias también por la mejor de las terapias, los días de risas y diversión. Gracias Rafa por tu enorme ayuda con el diseño de la portada.

Y a todos y cada uno de los que forman parte de mi familia y amigos, porque en esta vida no hay nada más importante que las personas que te hacen feliz.

Dedico esta Tesis a la persona que siempre ha estado a mi lado, en los mejores, en los buenos y en los malos momentos, a mi compañero de vida, mi Fransi. Contigo he aprendido a ver siempre el vaso medio lleno, que en la vida hay que apuntar a lo más alto y que lo único que es imposible es aquello que no intentas. Y que ya sea en Moriles o Madrid, mi casa está donde estás tú. Te quiero.

Si has perdido el rumbo escúchame,
llegar a la meta no es vencer,
lo importante es el camino y en él,
caer, levantarse, insistir y aprender.
Mago de Oz.

ÍNDICE

ÍNDICE

Agradecimientos 11

Resumen 20

Summary 24

Abreviaturas 28

Índice de tablas 32

Índice de figuras 34

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL 38

1. INTRODUCCIÓN 39

1.1. Importancia del consumo de frutas y hortalizas 41

1.2. Compuestos fenólicos 45

1.2.1. Clasificación 45

1.2.2. Principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta y consumo diario. Quercetina y sus derivados 53

1.2.3. Propiedades beneficiosas para la salud de los compuestos fenólicos. Quercetina y sus derivados 56

1.3. Manzana y cebolla. Fuentes naturales de compuestos bioactivos 59

1.4. Nuevas perspectivas en nutrición. Alimentos funcionales 63

2. PROCESADO DE ALIMENTOS POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS 65

2.1. Definición y principios básicos 66

2.2. Antecedentes 67

2.3. Aspectos tecnológicos 68

2.4. Efectos de las altas presiones hidrostáticas 71

2.5. Aplicaciones de las altas presiones hidrostáticas 75

3. DIGESTIÓN Y BIOACCESIBILIDAD 77

3.1. Conceptos: digestión, bioaccesibilidad, biodisponibilidad y bioactividad 77

3.2. Digestión, absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos 80

3.3. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos 82

3.4. Modelos de digestión gastrointestinal 84

3.5. Obtención de la fracción bioaccesible 89

4. FERMENTACIÓN COLÓNICA 89

4.1. La microbiota intestinal 89

4.2. Microbiota y compuestos fenólicos 92

4.3. Modelos de fermentación colónica 96

CAPÍTULO II: OBJETIVOS 101

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS 104

1. OBTENCIÓN DE LOS INGREDIENTES DE MANZANA Y CEBOLLA PROCESADAS POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS 105
1.1. Material vegetal y suplemento dietético 105
1.2. Procesado por Altas Presiones Hidrostáticas 105
1.2.1. Preparación de las muestras 105
1.2.2. Condiciones del procesado por APH 108
1.3. Liofilización, molienda y tamizado de las muestras 109
2. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO* 110
3. FERMENTACIÓN COLÓNICA *IN VITRO* 112
4. METODOLOGÍA 115
4.1. Análisis físicos 115
4.1.1. Estudio de la microestructura 115
4.1.2. Estudio de las propiedades reológicas 116
4.2. Análisis físico-químicos 117
4.2.1. pH y acidez titulable 117
4.2.2. Contenido en agua 118
4.2.3. Sólidos solubles 118
4.3. Análisis microbiológicos 118
4.3.1. Ingredientes de manzana y cebolla 118
4.3.2. Muestras de fermentación colónica 119
4.4. Análisis bioquímicos 120
4.4.1. Actividad polifenoloxidasa y peroxidasa 120
4.4.2. Proteínas solubles totales 122
4.5. Análisis químicos 123
4.5.1. Vitamina C y ácido ascórbico 123
4.5.2. Fibra soluble, insoluble y total 124
4.5.3. Pectinas 125
4.5.4. Azúcares y ácidos orgánicos 126
4.6. Análisis de compuestos fenólicos 127
4.6.1. Extracción de los compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla 127
4.6.2. Extracción de compuestos fenólicos a partir de los digeridos de la digestión gastrointestinal dinámica *in vitro* 128
4.6.3. Análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS 128
4.6.4. Análisis por HPLC-DAD 130
4.6.5. Determinación espectrofotométrica de flavonoles totales 133
4.7. Análisis de los productos de la fermentación colónica 133

4.7.1. Extracción y análisis de metabolitos fenólicos 133
4.7.2. Extracción y análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) 136
4.8. Actividad antioxidante 139
4.8.1. Determinación mediante los ensayos DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$, FRAP y Folin-Ciocalteu 139
4.8.1.1. Capacidad secuestrante del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidracil (DPPH$^{\bullet}$) 139
4.8.1.2. Capacidad secuestrante del radical catión 2,2´-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato (ABTS$^{\bullet+}$) 140
4.8.1.3. Capacidad reductora del ion férrico (FRAP) 141
4.8.1.4. Fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (TP-FC) 142
4.8.2. Modulación de la actividad lipoxigenasa, xantina-oxidasa y catalasa 143
4.8.2.1. Inhibición de la actividad lipoxigenasa 143
4.8.2.2. Inhibición de la actividad xantina oxidasa 144
4.8.2.3. Efecto sobre la actividad catalasa 145
5. ESTADÍSTICA 146
CAPÍTULO IV: RESULTADOS 148
Artículo 1 149
Artículo 2 190
Artículo 3 222
Artículo 4 267
Artículo 5 307
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL 382
SECCIÓN 1: Obtención de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por altas presiones hidrostáticas 383
1.1. Caracterización de los compuestos fenólicos solubles de los ingredientes de manzana 'Golden Delicious' y cebolla 'Recas' sin procesar por APH 384
1.2. Caracterización de los compuestos fenólicos solubles de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH. Influencia de la matriz vegetal y del procesado 387
1.3. Caracterización de la actividad antioxidante de los ingredientes de manzana y cebolla. Influencia de la matriz vegetal y del procesado por APH 389
1.4. Caracterización físico-química, química, bioquímica y microbiológica de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH 391
SECCIÓN 2: Efecto de la digestión gastrointestinal dinámica *in vitro* sobre la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por altas presiones hidrostáticas 393
2.1. Influencia de la matriz vegetal (manzana y cebolla) y del procesado por APH sobre la bioaccesibilidad de flavonoles. Comparación con un suplemento dietético de quercetina 394

2.3. Influencia del proceso de digestión gastrointestinal sobre la microestructura y propiedades reológicas de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH y de un suplemento dietético de quercetina. Efecto sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos 399

2.3. Influencia del procesado por APH sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de manzana (flavonoles, ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles y dihidrochalconas) 403

2.4. Influencia de la matriz vegetal (manzana y cebolla) y del procesado por APH sobre las características antioxidantes 406

SECCIÓN 3: Fermentación colónica *in vitro* de ingredientes de manzana 'Golden Delicious' y cebolla 'Recas' procesadas por altas presiones hidrostáticas y su efecto sobre la microbiota humana y su metabolismo: producción de metabolitos de compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta 411

3.1. Evaluación del impacto de un proceso dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica (DGI-FC) de ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH mediante un estudio metabolómico 412

3.2. Efecto del proceso dinámico de DGI-FC sobre los compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH 415

3.3. Impacto del proceso dinámico de DGI-FC en la formación de metabolitos de compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH 417

3.4. Evaluación del proceso dinámico de DGI-FC de ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH sobre la microbiota colónica humana 425

3.5. Evaluación del proceso dinámico de DGI-FC de ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta 426

DISCUSIÓN INTEGRADORA 428

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES 435

SECCIÓN 1: Obtención de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por altas presiones hidrostáticas 436

SECCIÓN 2: Efecto de la digestión gastrointestinal dinámica *in vitro* sobre la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por altas presiones hidrostáticas 437

SECCIÓN 3: Fermentación colónica *in vitro* de ingredientes de manzana 'Golden Delicious' y cebolla 'Recas' procesadas por altas presiones hidrostáticas y su efecto sobre la microbiota humana y su metabolismo: producción de metabolitos de compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta 438

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 442

Resumen

Influencia de la matriz alimentaria y el procesado en la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo de compuestos fenólicos naturales en un modelo dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica.

Los **compuestos fenólicos** son compuestos bioactivos presentes de forma habitual en nuestra dieta a través de la ingesta de productos de origen vegetal. Entre las distintas familias de compuestos fenólicos destacan los flavonoides como el flavonol quercetina y sus derivados glicosilados por sus importantes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antivirales, encontrándose además en vegetales muy consumidos a diario en todo el mundo como la cebolla y la manzana. Los efectos saludables de la ingesta de productos derivados de manzana pueden estar relacionados con otros grupos de compuestos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles y dihidrochalconas. Los beneficios para la salud derivados de la ingesta de alimentos vegetales no sólo dependen de la presencia y concentración de los compuestos fenólicos en el alimento, sino también de su bioaccesibilidad y de la biotransformación por la microbiota del colon de aquellos compuestos fenólicos no bioaccesibles. En la actualidad, la industria alimentaria centra su atención en el desarrollo de nuevos alimentos o ingredientes funcionales con un alto contenido en compuestos fenólicos que aporten propiedades beneficiosas para la salud y prevención de enfermedades más allá del propio valor nutricional. Por tanto, es de gran interés profundizar en el conocimiento de la bioaccesibilidad y metabolismo en el colon de los compuestos fenólicos presentes en un alimento vegetal y determinar realmente la cantidad de los mismos que van a ser absorbidos por el organismo o transformados en metabolitos fisiológicamente activos. Esta información es fundamental para desarrollar alimentos o ingredientes funcionales y aportar información a los consumidores sobre una ingesta recomendada real para conseguir los beneficios saludables esperados.

Por tanto, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el efecto de la matriz vegetal y el procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) sobre la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo de los compuestos fenólicos de manzana y cebolla. Estos estudios se han realizado con un modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal y

fermentación colónica que simula mejor las condiciones reales que tienen lugar en cada una de las fases de la digestión humana que un modelo estático.

En primer lugar, se comprobó que los tratamientos por APH sobre manzana y cebolla fueron capaces de incrementar la extracción de los compuestos fenólicos, si bien este efecto fue más dependiente de la matriz vegetal (manzana o cebolla) que de la intensidad del tratamiento aplicado. Además, se constató que, para una misma variedad de manzana, 'Golden Delicious', la zona geográfica de cultivo con diferentes condiciones medioambientales, influyó significativamente sobre el incremento (o mantenimiento) de la extracción de compuestos fenólicos y de su actividad antioxidante por el procesado por altas presiones. Una vez seleccionados los tratamientos por APH que mejores resultados dieron en términos de extracción de compuestos fenólicos, se obtuvieron los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por APH), liofilizados y pulverizados, que iban a ser sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* empleando un modelo dinámico. En general, la concentración de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por APH) disminuyeron progresivamente durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal. El efecto positivo de los tratamientos por APH incrementando la extracción de flavonoles en los ingredientes iniciales, se reflejó en una mayor estabilidad de los mismos durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal pero no en su bioaccesibilidad. También se encontraron diferencias en la bioaccesibilidad en función de la naturaleza química de los compuestos fenólicos. Así, los ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico) presentaron la bioaccesibilidad más alta, seguidos de las dihidrochalconas (florizina) y los flavonoles mientras que los flavan-3-oles (procianidina B2 y epicatequina) no fueron bioaccesibles.

El modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal y de fermentación colónica mostró la acumulación de compuestos fenólicos no bioaccesibles, fundamentalmente en colon ascendente, durante una ingesta de 14 días de los ingredientes de manzana y cebolla tratadas por APH. Estos compuestos no bioaccesibles fueron metabolizados por la microbiota intestinal dando lugar a distintos tipos de metabolitos fenólicos (derivados de los ácidos benzoico, fenilacético, fenilpropiónico y fenilvalérico), algunos con importantes actividades antiinflamatorias y cardioprotectoras. Las tres regiones del colon mostraron una composición específica de metabolitos para cada ingrediente según el análisis metabolómico.

A su vez, el efecto beneficioso de los compuestos fenólicos contenidos en ambos ingredientes, así como los diferentes metabolitos formados, sobre la microbiota se reflejó en el incremento de los niveles de bacterias lácticas beneficiosas de los géneros *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., y la disminución de microorganismos coliformes totales y del género *Clostridium* spp., siendo estos efectos más significativos con el ingrediente de cebolla-APH que con el de manzana-APH. Además, la fermentación colónica de ambos ingredientes dio lugar a la formación y acumulación de ácidos grasos de cadena corta, ácido butírico, acético y propiónico, con importantes efectos beneficiosos para la salud.

Este modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal y fermentación colónica ha demostrado ser una herramienta útil para evaluar el efecto de distintos factores, como la matriz alimentaria y el procesado por altas presiones, que pueden influir sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos en cada fase de la digestión gastrointestinal, su bioaccesibilidad y metabolismo por la acción de la microbiota intestinal.

Además, los resultados obtenidos nos indican que para el diseño de nuevos alimentos e ingredientes potencialmente funcionales es importante seleccionar la matriz alimentaria inicial y las variables del procesado más adecuadas para potenciar la liberación de los compuestos fenólicos durante el proceso de digestión gastrointestinal y su bioaccesibilidad, así como la bioconversión de los compuestos no bioaccesibles en el colon con el fin de incrementar la formación selectiva de determinados metabolitos en función de los efectos biológicos que se quieren potenciar.

Summary

Influence of food matrix and proccesing on the stability, bioaccessibility and metabolism of natural phenolic compounds in a dynamic model of gastrointestinal digestion and colon fermentation.

Phenolic compounds are bioactive compounds commonly present in our diet through the intake of plant derived products. Among the different families of phenolic compounds, flavonoids such as the flavonol quercetin and its glycosylated derivatives stand out by their antiinflammatory, anticarcinogenic and antiviral properties, and also found in vegetables widely consumed daily around the world such as apple and onion. The beneficial effects of apple-derived products consumption may be related with other phenolic compounds groups such as hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols and dihydrochalcones. The health-protecting effects of plant foods not only depends on the presence and concentration of phenolic compounds, but also on their bioaccessibility and the biotransformation by the colon microbiota of non-bioaccessibles phenolic compounds. Nowadays, the food industry focuses on the development of novel foods or functional ingredients with a high phenolic compounds content that provide beneficial health properties beyond their own nutritional value and prevent disease development. Therefore, it is important to improve the knowledge on the bioaccessibility and colonic metabolism of the phenolic compounds present in plant foods and to determine the real amount of them that are going to be absorbed in the organism or transformed to bioactive metabolites. This information is essential for the development of novel foods or functional ingredients and to provide information to consumers on a real recommended intake to achieve the expected healthy benefits.

Therefore, the main objective of this PhD Thesis was to evaluate the effect of plant matrix and high-pressure processing (HPP) on the stability, bioaccessibility and metabolism of apple and onion phenolic compounds. A dynamic *in vitro* gastrointestinal digestion model has been employed which simulate better the specific conditions of the different gastrointestinal human digestion phases than the static models.

Firstly, it was found that HPP treatments applied on apple and onion products were able to increase the extraction of phenolic compounds, although this effect was more dependent on the plant matrix (apple or onion) than on the intensity of the treatment applied. It was also found that for the same apple variety, 'Golden Delicious', the geographical origin, characterized by different environmental conditions, influenced significantly the increase (or maintenance) of the extraction of phenolic compounds and its antioxidant activity by the high-pressure processing. After the selection of the HPP treatment that showed the better results in terms of extraction of phenolic compounds, the apple and onion ingredients (untreated and HPP-treated), lyophilized and pulverized, were obtained, and subjected to a later *in vitro* gastrointestinal digestion using a dynamic model. In general, the concentration of phenolic compounds and antioxidant activity of apple and onion ingredients (untreated and HPP-treated) decreased progressively during the different phases of the gastrointestinal digestion. The influence of HPP on the increase of phenolic compounds extraction in the initial ingredients was reflected in a major stability during the different phases of gastrointestinal digestion but no in their bioaccessibility. Different bioaccessibilities were also found related to the chemical properties of phenolic compounds. Thus, hydroxycinnamic acids (chlorogenic acid) showed the highest bioaccessibility followed by dihydrochalcones (phloridzin) and flavonols, while flavan-3-ols (procyanidin B2 and epicatechin) were not bioaccessible.

The dynamic *in vitro* model of gastrointestinal digestion and colonic fermentation showed the accumulation of non-bioaccessible phenolic compounds, mainly in the ascending colon, during the 14 days of the intake period with the apple and onion ingredients (untreated and HPP-treated). These non-bioaccesible phenolic compounds were metabolized by the colon microbiota and transformed into different phenolic metabolites (benzoic acid, phenylacetic acid, phenylpropionic acid and phenylvaleric acids derivatives), some of them with important antiiflammatory and cardioprotective properties. The three colon regions showed a specific content of phenolic metabolites for each ingredient as indicated the metabolomics analysis.

In turn, the beneficial effect of the phenolic compounds presents in the initial apple and onion ingredients, as well as the different phenolic metabolites formed, was reflected in the increase in the levels of beneficial lactic bacteria such as *Biffidobacterium* spp. and *Lactobacillu*s spp., as well in the decrease of total coliforms and *Clostridium* spp., although these effects were more significant with the HPP-treated onion ingredient than

with the HPP-treated apple ingredient. Moreover, the colon fermentation of both ingredients resulted in the production and accumulation of short chain fatty acids such as butyric, acetic and propionic acids, for which several beneficial effects on health have been reported.

This dynamic *in vitro* model of gastrointestinal digestion and colonic fermentation has shown to be a useful tool to evaluate the influence of several factors, such as the food matrix and the high-pressure processing, in the stability of phenolic compounds in each gastrointestinal digestion phase, their bioaccessibility and their metabolism by the colon microbiota.

Therefore, the results obtained showed that, for the design of new foods and potentially functional ingredients it is important to select both the initial food matrix and the most suitable processing variables to enhance the release of phenolic compounds during the gastrointestinal digestion and their bioaccessibility, as well as the bioconversion of non-bioaccessible phenolic compounds in the colon in order to promote the selective formation of phenolic metabolites based on the biological effects that may be increased.

Abreviaturas

ΔDO: incremento de la densidad óptica
$\eta_{a,10}$: viscosidad aparente a una velocidad de corte de 10 s-1

A

AA: actividad antioxidante
$ABTS^{\bullet+}$: radical catión 2,2´-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat
ADN: ácido dexosirribonucleico
AGCC: ácidos grasos de cadena corta
AGM: ácidos grasos monoinsaturados
AGP: ácidos grasos poliinsaturados
AGS: ácidos grasos saturados
AMPK: proteína quinasa activada por AMP (adenina de monofosfato) (AMP-activated protein kinase)
ANOVA: análisis de varianza
APH: altas presiones hidrostáticas

C

C13:0: ácido tridecanoico
C2:0: ácido acético
C3:0: ácido propiónico
C4:0: ácido butírico
C5:0: ácido valérico
C7:0: ácido heptanoico (enántico)
C8:0: ácido octanoido (caprílico)
C9:0: ácido nonanoico (pelargónico)
CA: colon ascendente
$CaCl_2$: cloruro cálcico
CAT: catalasa
CBG: β-glucosidasa citosólica (cytosolic beta-glucosidase)
CD: colon descendente
CF: compuestos fenólicos
CIAL: Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación
CO_2: dióxido de carbono
COMT: catecol-O-metiltransferasas
$CoSO_4$: sulfato de cobalto
CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CT: colon transversal

D

DAD: detector de diodos
DGI: digestión gastrointestinal
DGI-FC: digestión gastrointestinal y fermentación colónica
DGM: modelo de digestión gástrica (digestion gastric model)
$DPPH^{\bullet}$: radical 2,2'-difenil-1-picrilhidracil
DTT: ditiotreitol

E

EAG: equivalentes de ácido gálico
EEUU: Estados Unidos
EIC: cromatograma de iones extraídos (Extracted Ion Chromatogram)
EQ: equivalentes de quercetina
ESI: fuente de ionización por electrospray
ET: equivalentes de trolox

F

FAMEs: esteres metílicos de los ácidos grasos
FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAOSTAT: base de datos estadísticos de la FAO
FB: fracción bioaccesible
FDA: Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drugs Administration)
FDG: fase de digestión gástrica
FDI: fase de digestión intestinal
FEPEX: Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas y Hortalizas
$FeSO_4$: sulfato de hierro
FID: detector de ionización por llama (flame ionization detector)
FKN: fractalkine
FO: fase oral
FRAP: capacidad reductora del ion férrico (Ferric Reducing Antioxidant Power)

G

GS-MS: cromatografía de gases unida a espectrometría de masas

H

H_2O_2: peróxido de hidrógeno
H_2SO_4: ácido sulfúrico
HCl: ácido clorhídrico
HDL: lipoproteína de alta densidad

HGS: simulador gástrico humano (human gastric simulator)
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (High performance liquid chromatography)
HPLC-DAD: cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos (High performance liquid chromatography-diodo array)
HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas-masas con detector de diodos, fuente de ionización por electrospray y espectrómetro de masas cuadrupolo tiempo de vuelo
HPP: High Pressure Processing

I

IC_{50}: concentración de la muestra necesaria para reducir un 50% la actividad de la enzima
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)
ICTAN: Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición
IL-6: interleuquina-6
IL-Iβ: interleuquina-1β
ILSI-Europe: Instituto Internacional de Ciencias de la Vida en Europa
INRA: Instituto Nacional para la Investigación Agronómica (National Institute for Agricultural Research)
IR: índice de recuperación

K

K: coeficiente de consistencia
K_2HPO_4: fosfato dipotásico
KH_2PO_4: fosfato monopotásico

L

LDL: lipoproteína de baja densidad
LOX: lipoxigenasa

M

manzana-E: manzana procedente de Aragón (España)
manzana-I: manzana procedente del norte de Italia
MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MAP-quinasa: proteínas quinasas activadas por mitógenos
MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos 1 (Monocyte chemoattractant protein-1)
meq: miliequivalentes
MetNa: metóxido sódico
$MgSO_4$: sulfato de magnesio
$MnSO_4$: sulfato de manganeso
MS: espectrometría de masas
MS/MS: espectrometría de masas en tándem

N

Na_2CO_3: carbonato de sodio
NaCl: cloruro sódico
$NaCO_3$: carbonato de sodio
NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
$NaHCO_3$: bicarbonato sódico
NAOS: Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad
ND: no digerida
NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

O

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible
OMS: Organización Mundial de la Salud
ONU: Organización de las naciones unidas

P

PAOS: Código de Autorregulación de la Publicidad de Alimentos
PBS: tampón fosfato salino
PCA: Análisis por componentes principales (Principal Component Analysis)
PEAI: pulsos eléctricos de alta intensidad
PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)
pf: peso fresco
POD: peroxidasa
PPARγ: receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma
PPO: polifenoloxidasa
PREDIMED: PREvención con DIeta MEDiterránea
Proyecto SUN: Seguimiento Universidad de Navarra
ps: peso seco

PTAP: Procesado Térmico Asistido por Presión (PTAP) (Pressure Assisted Thermal Processing)
PVPP: polivinilpolipirrolidona

Q

Q: Quercetina
QC: control de calidad (quality control)
QTOF: espectrómetro de masas cuádrupolo tiempo de vuelo

R

ROS: especies reactivas de oxígeno

S

SGLT1: transportador de glucosa dependiente de sodio (sodium-glucose linked transporter-1)
SHIME: simulador del ecosistema intestinal microbiano humano (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem)
simgi®: simulador gastrointestinal (SIMulator GastroIntestinal)
SIRT1: sirtuina 1
SULT: sulfotransferasas

T

TIC: cromatograma de iones totales (total ion chromatogram)
TIM-1: TNO gastro-Intestinal Model 1
TIM-2: TNO gastro-Intestinal Model 2
TNF-α: factor de necrosis tumoral
TNO: The Netherlands Organisation for applied scientific research
TP-FC: fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (Total Phenols by Folin Cioucalteu)
TPTZ: 2,4,6, tripiridil-s-triazina
trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

U

UFC: unidades formadoras de colonias
UGTs: uridin-5'-difosfato glucuronosiltransferasas
USDA: Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (United States Department of Agriculture)

W

WAPA: Asociación mundial de manzanas y peras (World Apple and Pear Association)
WHO: World Health Organization

X

XO: xantina oxidasa

Z

$ZnSO_4$: sulfato de cinc

Índice de tablas

CAPÍTULO I: Introducción general
Tabla 1: Contenido en ácidos fenólicos totales en frutas y hortalizas.
Tabla 2: Productos vegetales ricos en quercetina (mg/100 g).
Tabla 3: Composición nutricional de cebolla y manzana.
Tabla 4: Costes de producción del procesado por altas presiones hidrostáticas.
Tabla 5: Clasificación de las bacterias intestinales.

CAPÍTULO III: Materiales y métodos
Tabla 6: Tiempo de recogida de los digeridos en los tres reactores del colon para las muestras de fermentación colónica de manzana-APH y cebolla-APH.
Tabla 7: Medios de cultivo utilizados para el aislamiento y recuento de los microorganismos de interés, así como, las condiciones de incubación de los mismos.
Tabla 8: Gradiente utilizado en los análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS y HPLC-DAD.
Tabla 9: Curvas patrones para la cuantificación de los compuestos fenólicos en muestras liofilizadas de manzana y cebolla sin procesar y procesadas por APH.
Tabla 10: Gradiente utilizado en los análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS de metabolitos fenólicos.
Tabla 11: Curvas patrones para el estudio de los compuestos fenólicos y sus metabolitos en muestras de fermentación colónica *in vitro*.
Tabla 12: Identificación ácidos grasos de cadena corta en muestras de fermentación colónica de manzana-APH.

CAPÍTULO V: Discusión general
Tabla 13: Metabolitos fenólicos más representativos en cada una de las regiones del colon durante el proceso de fermentación colónica *in vitro* del ingrediente de manzana-APH.
Tabla 14: Metabolitos fenólicos más representativos en cada una de las regiones del colon durante el proceso de fermentación colónica *in vitro* del ingrediente de cebolla-APH.

Índice de figuras

CAPÍTULO I: Introducción general
Figura 1: Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).
Figura 2: Ácidos fenólicos más abundantes en los productos vegetales.
Figura 3: Estructura básica de los flavonoides.
Figura 4: Estructura de la quercetina.
Figura 5: Estructura de la luteolina.
Figura 6: Estructura de la hesperetina.
Figura 7: Estructura de la daidzeína.
Figura 8: Flavan-3-oles: mónomeros, dímeros y polímeros.
Figura 9: Estructura química de las antocianinas.
Figura 10: Estructura química de las chalconas y dihidrochalconas.
Figura 11: Area (ha) dedicada a la producción de manzana en Europa en 2017.
Figura 12: Variedades de manzana.
Figura 13: Equipo de altas presiones desarrollado por Hite.
Figura 14: Esquema del funcionamiento de una unidad de altas presiones hidrostáticas.
Figura 15: (A) Equipo Avure AVS, (B) equipo Hiperbaric 300.
Figura 16: Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre los microorganismos.
Figura 17: Aplicación de las altas presiones hidrostáticas por sectores en la industria alimentaria.
Figura 18: Condiciones físico-químicas del proceso de digestión.
Figura 19: Características de la mucosa del intestino delgado.
Figura 20: Relación entre fracción bioaccesible y fracción biodisponible.
Figura 21: Metabolismo de los compuestos fenólicos.
Figura 22: Modelo HGS.
Figura 23: Modelo TIM-1.
Figura 24: Modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal del Centro Tecnológico AINIA.
Figura 25: Efecto en la salud intestinal y metabólica del hospeador de una microbiota intestinal saludable *vs*. disbiosis.
Figura 26: Posibles rotura del anillo C de los flavonoides por la microbiota.
Figura 27: Estructuras de compuestos fenólicos y de sus catabolitos microbianos representativos.
Figura 28: Modelos dinámicos de fermentación colónica. (A) Modelo SHIME; (B) Modelo simgi®.

CAPÍTULO III: Materiales y métodos
Figura 29: Suplemento dietético de quercetina.
Figura 30: Esquema de la obtención de los ingredientes de manzana 'Golden Delicious' de dos orígenes geográficos distintos, Aragón (España) e Italia.

Figura 31: Esquema de la obtención del ingrediente de Cebolla 'Recas' procedente de Carabaña (España).
Figura 32: Equipo de Altas Presiones disponible en el ICTAN-CSIC.
Figura 33: Esquema del proceso de digestión gastrointestinal dinámico *in vitro.*
Figura 34: Digestor *in vitro* de fermentación colónica desarrollado por AINIA.
Figura 35: Esquema del proceso de digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*.
Figura 36: Reómetro rotacional Kinexus Pro.
Figura 37: Esquema del proceso de oxidación durante el pardeamiento enzimático.
Figura 38: Esquema de la reducción del ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico.
Figura 39: Ácido poligalacturónico metoxilado.
Figura 40: EIC (Extract Ion Chromatogram) de los multipatrones.
Figura 41: HPLC-DAD cromatograma de manzana 'Golden Delicious' procedente de Aragón.
Figura 42: HPLC-DAD cromatograma de cebolla 'Recas'.
Figura 43: Agilent GC 6890 con detector FID.
Figura 44: Cromatograma de patrones para la identificación de los ácidos grasos de cadena corta en muestra de colon descendente de cebolla-APH por GS-MS.
Figura 45: Secuestro del radical DPPH$^{\bullet}$ por un compuesto antioxidante.
Figura 46: Espectrofotómetro con lector de microplacas (UV-vis) PowerWave XS BioTek.
Figura 47: Estabilización del radical ABTS$^{\bullet+}$ por un compuesto antioxidante.
Figura 48: Mecanismo de acción del método FRAP.
Figura 49: Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu.

CAPÍTULO V: Discusión general
Figura 50: Evolución del contenido de flavonoles totales (mg/g ps) durante las fases de la digestión gastrointestinal (DGI) de los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por APH) y de un suplemento dietético de quercetina.
Figura 51: Evolución de los flavonoles individuales del ingrediente de cebolla no tratada y cebolla-APH durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal (DGI).
Figura 52: Evolución de los flavonoles individuales del ingrediente de manzana no tratada y manzana-APH durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal (DGI).
Figura 53: Porcentaje de retención y bioaccesibilidad de quercetina inmersa en un ingrediente de manzana y de cebolla (no tratadas y tratadas por APH) y en un suplemento dietético.
Figura 54: Gráficos de interacciones de ANOVA de dos vías.
Figura 55: Evolución de la concentración de flavan-3-oles en los ingredientes de manzana no tratada y manzana-APH en las distintas fases de la DGI.
Figura 56: Evolución de la concentración de ácidos hidroxicinámicos en los ingredientes de manzana no tratada y manzana-APH en las distintas fases de la DGI.
Figura 57: Evolución de la concentración de dihidrochalconas en los ingredientes de manzana no tratada y manzana-APH en las distintas fases de la DGI.

Figura 58: Evolución de la actividad antioxidante (ABTS$^{\bullet+}$, DPPH$^{\bullet}$, TP-FC, FRAP) en las muestras no digeridas (ND) y en las diferentes fases de DGI.
Figura 59: A) Capacidad inhibitoria de la actividad xantina oxidasa (XO); B) Capacidad inhibitoria de la actividad lipoxigenasa (LOX); C) Capacidad protectora de la actividad catalasa (CAT) de los ingredientes de manzana (no tratada y APH) en las muestras no digeridas y en las diferentes fases de DGI.
Figura 60: Análisis de Componentes Principales (PCA) de las muestras de fermentación colónica de manzana-APH (A) y cebolla-APH (B) obtenidos en las tres regiones del colon (ascendente, transversal y descendente).
Figura 61: Esquema del metabolismo de los flavonoles (glicósidos de quercetina) por la microbiota intestinal humana.
Figura 62: Esquema del metabolismo del ácido clorogénico por la microbiota intestinal humana.
Figura 63: Esquema del metabolismo de los flavan-3-oles (proantocianidinas) por la microbiota intestinal humana.

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.

Los consumidores del siglo XXI conocen bien la relación que existe entre los alimentos que ingieren en la dieta y el efecto que tienen en su salud. También son conscientes de que la ingesta diaria de alimentos de origen vegetal está relacionada con una mejor salud y un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles (Aune *et al.*, 2017, Jiang *et al.*, 2017, Zhao *et al.*, 2017). Este efecto beneficioso para la salud que tiene el consumo de alimentos vegetales se ha relacionado con la presencia en su composición de distintos tipos de compuestos bioactivos siendo los **compuestos fenólicos** uno de los grupos más abundantes (Visioli *et al.*, 2011).

Entre las distintas familias de compuestos fenólicos destacan los flavonoides. La **quercetina**, que generalmente se encuentra unida a distintas unidades de azúcares principalmente glucosa, galactosa y xilosa (glicósidos de quercetina), es uno de los flavonoides más abundantes en la dieta ya que se encuentra en vegetales muy consumidos a diario en todo el mundo como son el tomate, la lechuga, **la manzana y la cebolla** (Slimestad *et al.*, 2007, Alarcón-Flores *et al.*, 2016, Bondonno *et al.*, 2017). La quercetina está siendo el centro de atención de numerosos estudios científicos debido a las importantes propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antivirales, entre otras características beneficiosas para la salud que se han relacionado con su consumo (Wang *et al.*, 2016). Debido a estas características saludables, la industria alimentaria ha contemplado el uso de la quercetina como ingrediente funcional. Sin embargo, la actividad biológica de los derivados de quercetina y de la quercetina aglicona puede ser modificada por distintos factores que afecten a su liberación de la matriz alimentaria y absorción a nivel de intestino delgado durante el proceso de digestión (bioaccesibilidad) y a la fracción de los mismos que una vez absorbida y metabolizada puede ser utilizada por el organismo (biodisponibilidad) (Fernández-García *et al.*, 2009).

La **bioaccesibilidad** de los derivados de quercetina puede ser modificada por distintos factores siendo el efecto matriz uno de los más importantes. Factores como el pH, la presencia de otros constituyentes como fibra, lípidos, carbohidratos o iones metálicos presentes en el vegetal o el tipo de procesado (tratamientos térmicos o no-térmicos) al que pueden haber sido sometidos los vegetales, pueden reducir o aumentar la bioaccesibilidad de los derivados de quercetina. Además, otros factores como el tipo de cultivar del vegetal inicial, la climatología, las condiciones de pre- y postcosecha, también pueden modificar

su bioaccesibilidad. Por tanto, la bioaccesibilidad de estos compuestos en matrices diferentes como la manzana y la cebolla puede ser distinta y a la vez modulada por otros factores como la variedad del vegetal utilizado y el tipo de procesado.

Los **modelos de digestión gastrointestinal *in vitro*** han sido ampliamente utilizados para determinar la bioaccesibilidad de un compuesto bioactivo ya que permiten controlar las distintas variables en cada fase del proceso (pH, temperatura, concentración de las soluciones enzimáticas, etc.). La industria alimentaria interesada en el desarrollo de alimentos funcionales se apoya cada día más en los modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* combinados con cultivos celulares para evaluar la biodisponibilidad de un compuesto bioactivo (cantidad que es realmente utilizada por nuestro organismo). Estas tecnologías realizadas *in vitro* son imprescindibles para conocer la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos presentes y/o incorporados en sus productos por su rapidez y bajo coste. Generalmente, los modelos de digestión gastrointestinal *in vitro* son modelos estáticos, si bien se están imponiendo los modelos dinámicos que simulan mejor los cambios fisiológicos que ocurren durante la digestión gastrointestinal (pH, temperatura, movimientos peristálticos, incorporación de enzimas, etc.).

Los compuestos fenólicos, y entre ellos los derivados de quercetina, presentan una baja bioaccesibilidad, por lo que los compuestos no bioaccesibles, es decir, aquellos que no han sido absorbidos a nivel de intestino delgado, son susceptibles de sufrir degradaciones causadas por la microbiota intestinal en el intestino grueso. Este proceso fermentativo también puede ser investigado mediante modelos *in vitro.* Los metabolitos generados a partir de la fermentación de compuestos fenólicos que llegan al intestino grueso han mostrado su efecto beneficioso sobre la microbiota intestinal, además de estar relacionados con numerosos efectos beneficiosos para la salud humana.

En la actualidad, tenemos un nuevo perfil de consumidor que no sólo busca productos de calidad y que contribuyan a su nutrición, salud y bienestar, sino que también demanda compromisos con el medioambiente y con la sociedad. Por tanto, características como alimentos de origen local, orgánicos, naturales, sin procesar o mínimamente procesados, sin aditivos, sin alérgenos o con indicativos de producción sostenible son también percibidos por el consumidor como una alternativa saludable para mejorar su vida. La industria agroalimentaria está realizando una transformación hacia un modelo de economía

circular y producción sostenible de acuerdo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas.

La implantación del procesado por **altas presiones hidrostáticas (APH)** en la industria agroalimentaria reúne la doble condición de satisfacer las necesidades de los consumidores y ser una tecnología sostenible. El procesado por altas presiones hidrostáticas cumple con el requerimiento de alimentos mínimamente procesados, seguros y libres de aditivos, manteniendo prácticamente inalteradas sus características nutricionales y saludables. En consecuencia, los alimentos procesados por altas presiones reciben la clasificación de "alimentos libres de aditivos" o "clean label". Por otro lado, el uso de esta tecnología implica consumos bajos de agua y luz además de no producir residuos, por lo que cumple con los requerimientos actuales de implantación en la industria de tecnologías sostenibles. Además, las APH aplicadas en alimentos vegetales han demostrado ser muy efectivas incrementado la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos debido a los cambios microestructurales que produce en la célula vegetal.

1.1. Importancia del consumo de frutas y hortalizas.

Los alimentos de origen vegetal (frutas, hortalizas, legumbres, cereales integrales, frutos secos, aceites, etc.) son componentes esenciales de una dieta saludable. Una dieta saludable es aquella en la que se ingieren de forma continuada alimentos en la cantidad y calidad requerida para proporcionar los nutrientes y compuestos bioactivos necesarios para que tengan lugar las funciones del cuerpo humano, proteja de padecer enfermedades no transmisibles y proporcione un óptimo estado de salud y bienestar. La composición exacta de una alimentación variada, equilibrada y saludable dependerá de las características de cada persona (edad, sexo, hábitos de vida y grado de actividad física), del contexto cultural, de los alimentos disponibles en el lugar y los hábitos alimentarios. Sin embargo, los principios básicos de la alimentación saludable son los mismos en todas las circunstancias siendo uno de los más importantes el siguiente: un alto consumo de frutas y hortalizas está asociado con un buen estado de salud y un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en 2017 unos 3,9 millones de muertes se debieron a un consumo bajo de frutas y hortalizas (OMS, 2019).

En los últimos 20 años numerosos estudios epidemiológicos han asociado el incremento del consumo de frutas y hortalizas con un menor riesgo de padecer enfermedades crónicas no transmisibles como enfermedades cardiovasculares (Liu *et al.*, 2000, Zhao *et al.*, 2017), ciertos tipos de cáncer (Steinmetz y Potter, 1996, Michels *et al.*, 2000, Aune *et al.*, 2017), enfermedades neurodegenerativas (Jiang *et al.*, 2017), además de prevenir el aumento de peso, reducir la obesidad (Mytton *et al.*, 2014) y la diabetes (Wang *et al.*, 2016), entre otras.

Las frutas y hortalizas destacan por su contenido en vitaminas y minerales, fibra, agua, bajo aporte calórico y una gran variedad de los denominados compuestos fitoquímicos o compuestos bioactivos. Los compuestos bioactivos pueden ser compuestos esenciales (p. ej., vitaminas) y no esenciales (p. ej., compuestos fenólicos) para la vida humana, están presentes de forma natural en los alimentos vegetales y han de tener una actividad biológica que proporcione efectos beneficiosos para la salud más allá del valor nutricional básico del alimento (Biesalski *et al.*, 2009). Entre los compuestos bioactivos presentes en frutas y hortalizas destacan las vitaminas C, E, K, vitaminas del grupo B, los minerales (potasio, calcio, selenio, zinc, magnesio), compuestos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, taninos), carotenoides, saponinas, fibra dietética, fitoesteroles, compuestos que contienen azufre como el sulfuro y disulfuro de alilo y se encuentran en las plantas del género *Allium* (cebolla, ajo) y el bencil isotiocianato, fenetilisotiocianato e indol-3-carbinol en especies del género *Brassica* (brócoli, repollo, coliflor, coles de bruselas), entre otros (Prior y Cao, 2000, Kris-Etherton *et al.*, 2002, Liu, 2013a).

Los mecanismos bioquímicos que son modulados por los compuestos bioactivos no son del todo conocidos, si bien están relacionados con los siguientes efectos beneficiosos para la salud (Liu, 2013a, Segneanu *et al.*, 2017):

- Actividad antioxidante: neutralizar y eliminar radicales libres y reducir el estrés oxidativo.
- Modulación de enzimas detoxificantes encargadas del metabolismo y biotransformación de xenobióticos.
- Estimulación del sistema inmune.
- Prevención de procesos cancerosos al inhibir la formación de nitrosaminas e incluso disminuir su efectividad, cuando éstas se han formado.
- Disminución de la agregación plaquetaria.

- Alteración del metabolismo del colesterol.
- Modulación de la concentración de hormonas esteroideas y del metabolismo hormonal.
- Disminución de la presión sanguínea.
- Bloqueo de la respuesta alérgica del organismo al inhibir la histamina.
- Acción antiinflamatoria.
- Acción diurética.
- Actividad antiviral y antibacteriana.

Hay que tener en cuenta que existen numerosas evidencias científicas que apoyan la hipótesis de que los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos bioactivos son el resultado del efecto sinérgico o aditivo de estos compuestos ingeridos de forma natural en el alimento vegetal. Por tanto, los consumidores deberían obtener los compuestos bioactivos o fitoquímicos a partir de la ingesta de una dieta rica y variada en frutas, hortalizas, granos, legumbres, aceites y otros productos vegetales (Liu, 2013b).

Como parte de una dieta saludable, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) recomiendan el consumo de al menos 400 g/día de frutas y hortalizas (excluyendo patatas y otros tubérculos) para mejorar la salud y reducir el riesgo de padecer determinadas enfermedades no transmisibles (WHO, 2003). Esta recomendación de ingesta mínima de 400 g/día de productos vegetales es una parte imprescindible de una dieta saludable que presenta otros requerimientos como un bajo consumo de grasas, azúcares y sodio (sal), y la práctica de ejercicio físico (al menos 30 minutos al día). Sin embargo, la tendencia hacia un consumo cada vez más bajo de frutas y hortalizas junto con un incremento de ciertas enfermedades crónicas, plantea la necesidad de incrementar la recomendación de ingesta diaria de frutas y hortalizas. Así, un estudio publicado en 2017 recomienda la ingesta de 600 g/día para reducir el riesgo de padecer ciertos tipos de cáncer, mientras que para la reducción del riesgo de enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y mortalidad prematura se estableció una ingesta de 800 g/día (Aune *et al.*, 2017).

Dentro de los países de la Unión Europea, España es uno de los países con mayor ingesta de frutas y hortalizas por persona, aunque en la actualidad no se cumple con las recomendaciones de consumo diario. Según el informe de consumo de 2018 elaborado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, el consumo medio de frutas frescas es

de 90,5 kilos por persona y año y 56,9 kilos en el caso de las hortalizas, lo que viene a ser un consumo medio inferior a 250 g/persona/día para frutas e inferior a 160 g/persona/día para hortalizas (MAPA, 2018a). En España, organismos como el Programa "5 al día", la Estrategia NAOS y el Código PAOS, han impulsado iniciativas para promover un mayor consumo de frutas y hortalizas.

Además, la implantación de dietas más saludables en las que se incluya un mayor consumo de frutas y hortalizas pueden ayudar a alcanzar algunos de los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) que fueron acordados por 193 países miembros de la ONU en septiembre de 2015 con el objetivo de erradicar la pobreza, proteger el planeta y favorecer un desarrollo sostenible e igualitario antes de 2030. El ODS 2 de dicha agenda de desarrollo establece como meta "poner fin al hambre, lograr la seguridad alimentaria y la mejora de la nutrición y promover la agricultura sostenible". Un mayor consumo de frutas y hortalizas no sólo será beneficioso para la salud de las personas reduciendo las tasas de sobrepeso y obesidad sino también ayudará a mitigar el cambio climático. La transición a dietas como las recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), con menos alimentos procesados, reducción del consumo de productos de origen animal y mayor consumo de frutas y hortalizas obtenidas de forma sostenible, tendrá como consecuencia una mejora en la salud de las personas y una reducción significativa de las emisiones de gases de efecto invernadero, logros que estarían en consonancia con el ODS 3 cuyo objetivo es "promover una vida saludable y un bienestar universal" y con el ODS 13 cuya meta es "adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos".



Figura 1: Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (ONU, 2015).

1.2. Compuestos fenólicos.

Los **compuestos fenólicos (CF)** son uno de los grupos de compuestos bioactivos presentes en alimentos vegetales que han recibido mayor atención en los últimos años (Liu, 2013b). El consumo habitual de alimentos vegetales con alto contenido en CF ha sido relacionado con distintos efectos beneficiosos para la salud y la reducción del riesgo de padecer distintas enfermedades no transmisibles como enfermedad cardiovascular, varios tipos de cáncer, diabetes, obesidad, etc. (Rasouli *et al.*, 2017). Los CF son uno de los grupos más numerosos y variados de fitoquímicos de los que ya que se conocen más de 8000 compuestos, 4000 identificados como flavonoides. En las plantas, los CF son productos del metabolismo secundario y son sintetizados principalmente por la ruta del ácido siquímico y del acetato/malonato. Estos compuestos están involucrados en los sistemas de defensa de las plantas frente a la radiación ultravioleta, las bajas temperaturas, la sequía, el ataque de herbívoros, parásitos y patógenos (Quiñones *et al.*, 2012).

1.2.1. Clasificación.

Los compuestos fenólicos (CF) constituyen un grupo muy numeroso de compuestos con estructuras químicas heterogéneas por lo que han sido clasificados según distintos criterios siendo su estructura química básica el más utilizado. Los CF presentan en su estructura química uno o varios anillos aromáticos y al menos un grupo hidroxilo. Se pueden dividir en distintos subgrupos como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos (Tresserra-Rimbau *et al.*, 2018).

También se pueden clasificar de forma general en dos grandes grupos atendiendo a su abundancia natural en los productos vegetales de la dieta: flavonoides y no-flavonoides (Santana-Gálvez y Jacobo-Velázquez, 2018). Desde el punto de vista del estudio de los efectos en la salud de la ingesta de alimentos vegetales ricos en CF y teniendo en cuenta que generalmente los CF se extraen con disolventes acuoso-orgánicos, también es adecuada la clasificación en CF *solubles* (ácidos fenólicos sencillos, flavonoides y taninos de bajo y medio peso molecular no unidos a pared celular) e *insolubles* (taninos condensados, ácidos fenólicos y otros compuestos de bajo peso molecular unidos a pared celular, polisacáridos o proteínas). La biotransformación de los CF durante la digestión

gastrointestinal, su bioaccesibilidad, biodisponibilidad y en consecuencia sus efectos fisiológicos dependen en gran medida de sus características de solubilidad (Giada, 2013).

A continuación, se describen brevemente los subgrupos más importantes de CF teniendo en cuenta su estructura química básica: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos y lignanos.

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son el segundo grupo de compuestos fenólicos más abundante después de los flavonoides. Están constituidos por un anillo fenólico, grupos hidroxilo además de un grupo carboxilo. Se dividen en dos grupos, los derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico, con estructuras C_6-C_1 y C_6-C_3, respectivamente (Figura 2). Entre los ácidos hidroxibenzoicos destacan el ácido gálico, ácido elágico, ácido siríngico, ácido vanílico y ácido protocatecuico, entre otros. Los ácidos hidroxicinámicos también se encuentran formando parte de estructuras complejas como taninos hidrolizados, galotaninos en mangos y elagitaninos en frutos rojos como fresas y frambuesas. Los cuatro ácidos hidroxicinámicos más comunes son los ácidos ferúlico, cafeico, *p*-cumárico y sináptico. Los ácidos hidroxicinámicos suelen estar también en concentraciones muy altas en distintas frutas, especialmente en las coloreadas (arándanos, frambuesas, fresas, granadas, etc.), hortalizas, té, café, cacao, vino y granos enteros. En la mayoría de los vegetales, los ácidos hidroxicinámicos se encuentran en forma de derivados glicosilados o esterificados con ácidos como el quínico, siquímico o tartárico (Manach *et al.*, 2004). El ácido cafeico es uno de los ácidos fenólicos más abundante y representa el 87% de los ácidos hidroxicinámicos presentes en la mayoría de frutas y hortalizas, aunque generalmente se encuentra combinado con el ácido quínico formando el ácido clorogénico, muy abundante en numerosas frutas como la manzana, en hortalizas y en concentraciones muy altas en el café (El Gharras, 2009).

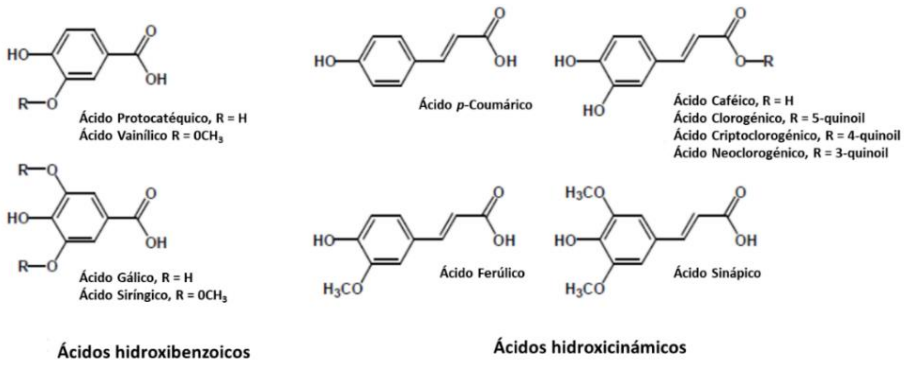


Figura 2: Ácidos fenólicos más abundantes en los productos vegetales (Tsao, 2010).

La Tabla 1 muestra la concentración de ácidos fenólicos totales de algunas frutas y hortalizas (El-Seedi *et al.*, 2012), si bien la concentración de los CF en los productos vegetales depende de la variedad, el grado de madurez, condiciones de cultivo, climatología (horas de sol, lluvia), conservación postcosecha y condiciones de procesado y conservación, entre otros factores (González-Talice *et al.*, 2013, Musacchi y Serra, 2018). Entre las frutas con mayor contenido en ácidos hidroxicinámicos destacan los arándanos, kiwis, ciruelas, cerezas y manzanas (0,5-2 g/kg peso fresco (pf)).

Tabla 1: Contenido en ácidos fenólicos totales en frutas y hortalizas.

Compuesto	Fuente	Contenido*
Ácidos hidroxicinámicos	Arándano	2000-2200
	Kiwi	600-1000
	Cereza	180-1150
	Ciruela	140-1150
	Berenjena	600-660
	Manzana	500-600
	Pera	15-600
	Alcachofa	450
	Patata	100-190
	Café	350-1750
Ácidos hidroxibenzoicos	Arándano	80-270
	Frambuesa	60-100
	Grosella negra	40-130
	Fresa	20-90

*Ácidos fenólicos totales expresados como miligramo/kg peso fresco o miligramo/L. Fuente: El Gharras (2009).

Flavonoides

Los flavonoides constituyen el grupo de CF más numeroso y se caracterizan por tener una estructura común (Figura 3) de difenilpirano (C_6-C_3-C_6) formada por 2 anillos bencénicos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los flavonoides se dividen en diferentes subclases en función del grado de oxidación de este anillo central de pirano: flavonoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavan-3-oles, antocianidinas y chalconas (Ruiz-Cruz *et al.*, 2017).

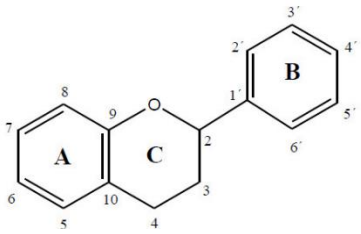


Figura 3: Estructura básica de los flavonoides.

Flavonoles: Poseen un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo –OH en posición 3 del anillo C (Figura 3). Presentan una insaturación entre el C_2 y C_3 del anillo C. Se diferencian entre ellos por los sustituyentes del anillo B. Los más conocidos dentro de este grupo son la quercetina (Figura 4), el kaempferol y la miricetina. Sin embargo, estos compuestos suelen aparecer unidos a ciertos azúcares en la posición C_3, principalmente, o en las posiciones 5, 7, 2, 4', 3' y 5'. La D-glucosa es el azúcar más frecuente, aunque otros azúcares como la D-galactosa, L-ramnosa, L-arabinosa, D-xilosa y el ácido D-glucurónico también se encuentran formando parte de su estructura química (Martínez-Florez *et al.*, 2002, Kumar y Pandey, 2013). Los flavonoles suelen estar en concentraciones bajas en los productos vegetales, entre 15-30 mg/kg pf. Las principales fuentes de flavonoles son la cebolla (350-1200 mg/kg pf), la manzana (20-40 mg/kg pf), los arándanos (30-160 mg/kg pf), la col rizada (300-600 mg/kg pf), el brócoli (40-100 mg/kg pf) y el puerro (30-225 mg/kg pf) (D'Archivio *et al.*, 2007).

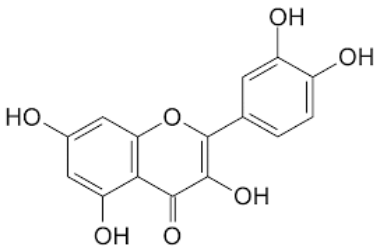


Figura 4: Estructura de la quercetina.

Flavonas: En frutas y hortalizas son menos frecuentes que los flavonoles y presentan una estructura similar a éstos, pero carecen del grupo hidroxilo en la posición C_3 (Figura 5). La mayoría se encuentra glicosiladas en la posición C_7 y pueden contener grupos acetilo o malonilo. Las flavonas más conocidas son la luteolina y la apigenina (Hostetler *et al.*, 2017). Las principales fuentes de flavonas son el perejil (240-1800 mg/kg pf) y el apio (20-140 mg/kg pf) (Manach *et al.*, 2004). La tangerina y la nobiletina son flavonas polimetoxiladas que se encuentran en la piel y la pulpa de cítricos y se reconocen como los flavonoides más hidrofóbicos.

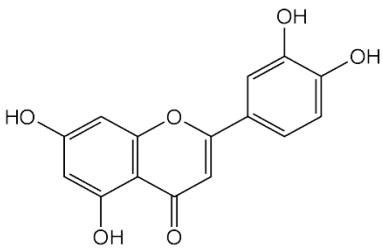


Figura 5: Estructura básica de la luteolina.

Flavanonas: Las flavanonas se diferencian de las flavonas por la ausencia del doble enlace en la posición C_2-C_3 (Figura 6). Las flavanonas se encuentran en concentraciones altas en los cítricos y en menor cantidad en tomate. Entre las flavanonas, cabe destacar las agliconas naringenina (mayoritaria en pomelo), hesperetina (mayoritaria en naranja) y eriodictiol (mayoritaria en limones). Estas flavanonas se encuentran como glicósidos dando lugar a la naringina, narirutina, hesperidina y neohesperidina (Khan *et al.*, 2014). El contenido de flavanonas totales en un zumo de naranja oscila entre 215-685 mg/L, en un zumo de pomelo entre 100-650 mg/L y en un zumo de limón entre 50-30 mg/L (Manach *et al.*, 2004).

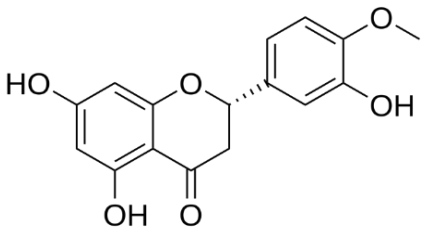


Figura 6: Estructura básica de la hesperetina.

Isoflavonas: Las isoflavonas presentan un anillo bencénico lateral en posición C_3 (Figura 7). Tienen una estructura similar a la de los estrógenos por lo que se han considerados estrógenos vegetales o fitoestrógenos. Las isoflavonas pueden aparecer en forma de aglicona (daidzeína, genisteína, gliciteína) o como glicósidos (7-*O*-glucósido, 6″-*O*-acetil-7-*O*-glucósido, 6″-*O*-malonil-7-*O*-glucósido) (Saveta Popa y Emil Rusu, 2017). Las isoflavonas se encuentran casi exclusivamente en las plantas leguminosas siendo la soja y sus productos procesados la principal fuente de estos compuestos. La soja fresca puede tener una concentración de isoflavonas entre 140-1530 mg/kg pf, y la leche de soja entre 12-130 mg/L (D' Archivio *et al.*, 2007).

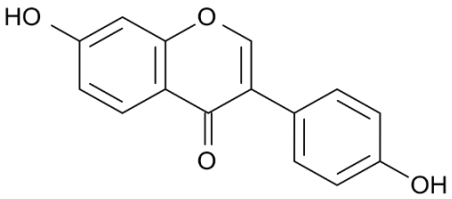


Figura 7: Estructura de la daidzeína.

Flavan-3-oles o flavanoles: Difieren de la mayoría de los flavonoides en la ausencia del doble enlace entre C_2 y C_3 y no presentan el grupo carbonilo en la posición C_4 (Figura

3). Esto junto con la hidroxilación en la posición C_3 permite a los flavan-3-oles tener dos centros quirales en la molécula. Catequina es el isómero con configuración *trans* y epicatequina presenta configuración *cis* (Figura 8). Los flavan-3-oles se encuentran en los alimentos vegetales como monómeros (catequina y epicatequina), oligómeros (procianidinas) o polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). Las formas oligoméricas, pueden ser dímeros del tipo A en las cuales los monómeros se unen en la disposición C_2-*O*-C_7 o C_2-*O*-C_5 o dímeros del tipo B, unidos en C_4-C_6 o C_4-C_8. La procianidina C1 es un trímero (Figura 8) (Tsao, 2010). A diferencia de otros flavonoides, los flavan-3-oles no se encuentran en forma glicosilada en los alimentos vegetales. Las catequinas se encuentran en muchos tipos de frutas como los albaricoques (100-250 mg/kg pf), cerezas (50-220 mg/kg pf), uvas (30-175 mg/kg pf), melocotón (300 mg/kg pf), fresa y manzana (20-120 mg/kg pf). El té y el chocolate son los alimentos con una mayor concentración de catequinas, pudiendo tener una infusión de té una concentración entre 100-800 mg/L (Manach *et al.*, 2004). Generalmente, catequina y epicatequina en forma de monómeros, dímeros y polímeros son los flavan-3-oles más frecuentes en frutas, mientras que las monómeros y procianidinas unidas a ácido gálico como galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato se encuentran en algunas semillas de leguminosas, uvas y el té (El Gharras, 2009).

Las proantocianidinas son los principales CF en las uvas encontrándose principalmente en la piel y semillas. Es difícil cuantificar el contenido en proantocianidinas en los alimentos ya que presentan distintas estructuras y pesos moleculares. Estos compuestos son los responsables de la astringencia de la fruta (uvas, manzanas, etc.) y de bebidas como el vino, la sidra, el té y la cerveza. Hay que destacar que la astringencia de las frutas desaparece con la maduración.

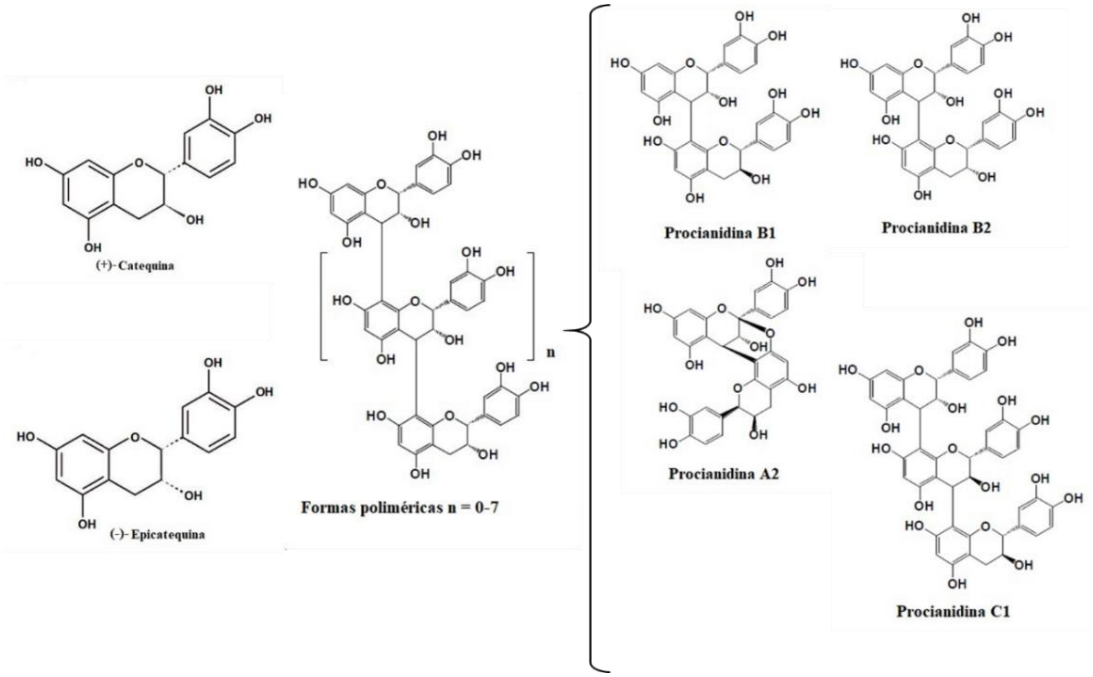
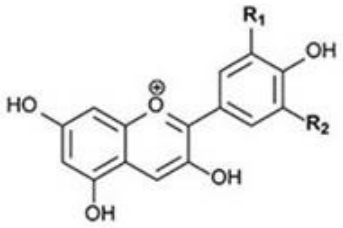


Figura 8: Flavan-3-oles: mónomeros, dímeros y polímeros.

Antocianinas: Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas solubles en agua. Son responsables del color rojo, azul y morado de muchas frutas y hortalizas (fresas, moras, cerezas, berenjena, etc.). Presentan un grupo –OH en posición 3 del anillo C y además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Las antocianinas son muy estables a la luz, pH y a la oxidación en los vegetales, pero cuando pierden el azúcar se transforman en antocianidinas que son moléculas inestables y dependiendo del pH pueden ser coloreadas o incoloras. Las antocianinas más frecuentes en los alimentos vegetales son la cianidina, pelargonidina, peonidina, malvidina, petunidina y delfinidina (Figura 9). Generalmente la molécula de azúcar se encuentra unida en la posición 3 del anillo C y también en la posición 5 y 7 del anillo A. Además, estos azúcares pueden estar esterificados con un ácido orgánico (ácido cafeico, cumárico y ferúlico). El color que transmiten las antocianinas depende del número y orientación de los grupos hidroxilos y metoxilos. Un aumento del número de hidroxilos da lugar a una coloración azul mientras que el aumento de los metoxilos incrementa el color rojo. Las antocianinas se estabilizan en los alimentos vegetales formando complejos con otros flavonoides (co-pigmentación) (Tsao, 2010).

Las antocianinas se encuentran en gran cantidad en el vino (200-300 mg/L) y en ciertas hortalizas como la lombarda (250 mg/kg pf) o la berenjena (7500 mg/kg pf), pero son más abundantes en las frutas como las uvas rojas (300-7500 mg/kg pf), fresas (150-750

mg/kg pf), cerezas (350-4500 mg/100 g pf), grosellas negras (1300-4000 mg/kg pf), moras (1000-4000 mg/kg pf) y la mayoría de las frutas del bosque (Manach *et al.*, 2004). La concentración de antocianinas aumenta con la maduración y éstas se encuentran principalmente en la piel excepto en algunas frutas como cerezas y fresas que también están en la pulpa.



	R_1	R_2
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Malvidina	OCH_3	OCH_3
Pelargonidina	H	H
Peonidina	OCH_3	H
Petunidina	OCH_3	OH

Figura 9: Estructura química de las antocianinas.

Chalconas y dihidrochalconas: Chalconas y dihidrochalconas son un grupo minoritario de flavonoides. Las chalconas se caracterizan por la ausencia del anillo C y un doble enlace en la posición C_2-C_3 (Figura 10). Las chalconas pueden encontrarse en hortalizas como las habas (0,08 mg/100 g pf) o bebidas como la cerveza (0,0003-0,03 mg/100 mL). Las dihidrochalconas se diferencian de las chalconas en la carencia del doble enlace en la posición C_2-C_3 (Figura 10) (Tsao, 2010). Las principales dihidrochalconas son floretina y su glucósido florizina, así como otros derivados glucosilados de floretina. Una de las principales fuentes dietéticas de dihidrochalconas son las manzanas, las cuales pueden presentar un contenido de floretin-2'-xiloglucósido de 2,58 mg/100 g pf, 2,69 mg/100 g pf de florizina y 0,11 mg/100 g pf de 3 hidroxi-floretin-2'-xiloglucósido (Pérez-Jiménez *et al.*, 2010).

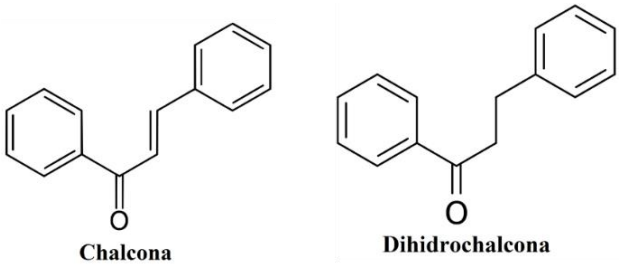


Figura 10: Estructura química de las chalconas y dihidrochalconas.

Estilbenos

Estos compuestos suelen estar presentes en bajas cantidades en nuestra dieta. Están compuestos por dos anillos de fenilo conectados por un puente de metileno. El principal representante de este grupo es el resveratrol (Pandey y Rizvi, 2009). El vino tinto es una de las fuentes más conocidas de resveratrol debido a la presencia de este compuesto en la piel de la uva tinta. Se ha estimado un contenido aproximado en vino tinto de 0,3-7mg/L en forma de aglicona y de 15 mg/L en forma de glicósidos (Manach *et al.*, 2004).

Lignanos

Están constituidos por dos unidades de fenilpropano C_6-C_3' unidos por enlaces β-β'. Están presentes de forma libre, aunque también pueden aparecer glicosilados. Secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol y pinoresinol son algunos de los lignanos identificados en alimentos (Willfor *et al.*, 2006). La linaza es una de las fuentes más importantes de secoisolariciresinol (más de 3,7 g/kg peso seco) y pequeñas cantidades de matairesinol. Otros cereales, granos, frutas y ciertas hortalizas pueden contener lignanos, aunque en una cantidad muy inferior a la linaza (Manach *et al.*, 2004).

1.2.2. Principales fuentes de compuestos fenólicos en la dieta y consumo diario. Quercetina y sus derivados.

Los compuestos fenólicos (CF), presentes en numerosos alimentos y bebidas de origen vegetal, son responsables de las principales características organolépticas de los alimentos que los contienen, como el color (pigmentos amarillos, naranjas, rojos, azules), el sabor (responsables del amargor y astringencia por la interacción de los taninos y la saliva) y el aroma. Ciertos CF como la quercetina se encuentran ampliamente distribuidos en diversos alimentos vegetales como frutas, hortalizas, cereales, té, vino, etc. Mientras otros como las flavanonas e isoflavonas son específicos de ciertos alimentos.

En la mayoría de los casos, los alimentos vegetales contienen mezclas complejas de CF y su concentración depende de distintos factores como la variedad, el grado de madurez, condiciones de cultivo, climatología, conservación postcosecha, condiciones de procesado y conservación, entre otros factores (Manach *et al.*, 2004, González-Talice *et al.*, 2013, Musacchi y Serra, 2018).

Algunas de las condiciones de cultivo que pueden modificar la composición fenólica son: el tipo de cultivo (orgánico o convencional), exposición a la luz solar, tipo de suelo, condiciones hidrográficas, la región de origen, etc. (Lamperi *et al.*, 2008, González-Talice *et al.*, 2013). En cuanto al estado de maduración, los CF disminuyen al aumentar el grado de maduración, excepto las antocianinas (Acosta-Montoya *et al.*, 2010).

Otros factores que pueden afectar al contenido de los CF son los distintos tipos de procesado a los que son sometidos los productos vegetales incluido las preparaciones culinarias. El pelado de frutas y hortalizas puede eliminar gran parte del contenido fenólico ya que estos compuestos se pueden encontrar en mayor concentración en la piel como en la manzana (Kevers *et al.*, 2011). El uso del microondas, hervido, vapor y fritura también pueden provocar pérdidas en el contenido de compuestos fenólicos (Manach *et al.*, 2004). El procesado industrial y el almacenamiento también afecta al contenido de CF por la rápida oxidación de estos compuestos debido a reacciones no-enzimáticas (reacciones de Maillard) y/o reacciones enzimáticas (acción de enzimas involucradas en la oxidación de los CF como la polifenoloxidasa y la peroxidasa). En general, el uso de temperaturas elevadas puede afectar en gran medida al contenido de los CF. Como alternativas a los tratamientos térmicos convencionales se han desarrollado técnicas de procesado no-térmico como las altas presiones hidrostáticas (APH), los pulsos eléctricos y los ultrasonidos entre otros, con el fin de reducir la pérdida de compuestos bioactivos como los CF, consiguiendo incluso, en algunos casos, un aumento de la extracción de los mismos (Sun, 2005).

La ingesta total de CF es de aproximadamente 1g/día en dietas ricas en frutas y hortalizas y bebidas como té, café y vino (Bo *et al.*, 2019). De todos los CF descritos, los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos son los que más contribuyen a la ingesta total de compuestos fenólicos en la Unión Europea (Zamora-Ros *et al.*, 2016). Datos recientes de ingesta en España a través del proyecto SUN (Seguimiento Universidad de Navarra) que incluye unos 17000 participantes (desde marzo de 2014) establecen una ingesta media de CF de 727 ± 370 mg/día, de los cuales 384 ± 269 mg/día corresponde a flavonoides, 298 ± 171 mg/día a los ácidos fenólicos, 0,9 ± 1,9 mg/día a estilbenos, 0,6 ± 0,4 mg/día a lignanos y 44 ± 34 mg/día a otros compuestos fenólicos. En este mismo estudio establecen que las frutas, incluyendo la manzana, son la principal fuente de flavonoides en España (Mendonca *et al.*, 2019). Los datos de un estudio epidemiológico anterior, PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea), realizado en España con 7447 participantes

durante 5 años (2003-2009) y utilizando la base de datos PhenolExplorer, indicaba una ingesta superior de CF que los del estudio SUN con 820 ± 323 mg/día de los que 443 ± 218 correspondía a flavonoides y 304 ± 155 mg/día (Tresserra-Rimbau *et al.*, 2013). Estos datos nos indican que en la última década el consumo de frutas y hortalizas ricos en CF ha disminuido en España. El estudio PREDIMED también mostró a las frutas como la principal fuente de CF, ya que proporcionaban el 44% de los fenoles totales y el 23% de los flavonoides. En este estudió también se analizó el aporte a la dieta de CF analizada por sub-grupos. Así, el consumo de ácidos hidroxicinámicos se estimó en 276 ± 146 mg/día, siendo el 7% proveniente del consumo de manzanas (62% café, 9% patatas y 5% aceitunas), el de proantocianidinas se calculó en 117 ± 81 mg/día aportando las manzanas el 33% de esta cantidad (35% vino tinto, 12% albaricoques y 7% ciruelas) y el de flavonoles en 80,4 ± 32,7 mg/día de los cuales el 14% fue aportado por la cebolla (24% espinacas, 17% judías y 6% lechuga) (Tresserra-Rimbau *et al.*, 2013).

Tabla 2: Productos vegetales ricos en quercetina (mg/100 g pf).

Vegetal	Contenido
Pimiento picante amarillo	50,63 ± 14,61
Hojas de cilantro	52,49 ± 23,14
Cebolla roja	39,21 ± 1,88
Bayas de Saúco	26,77 ±1,78
Col rizada (kale)	22,58 ± 2,94
Arándano rojo	14,84 ± 1,04
Pimiento picante verde	14,70 ± 0,63
Cebolla dulce	14,55 ± 0,63
Cebolla blanca	6,17 ± 0,99
Arándanos azules	7,67 ± 0,18
Cebollino	4,77 ± 2,88
Lechuga romana	4,16 ± 0,69
Manzana con piel 'Gala'	3,80 ± 0,41
Manzana con piel 'Golden'	3,69 ± 0,73
Manzana con piel 'Fuji'	2,35 ± 0,29
Espinaca	3,97 ± 2,37
Cereza dulce	2,29 ± 0,02
Tomate	0,58 ± 0,03

Fuente: USDA (2015).

La ingesta diaria de quercetina se ha estimado entre 5-40 mg/día, y estos niveles pueden verse incrementados a 200-500 mg/día si se consume una dieta rica en frutas y vegetales fuentes de este flavonol (Tabla 2). Por tanto, las manzanas y las cebollas están consideradas como las principales fuentes dietéticas de quercetina no sólo por presentar un

alto contenido de este compuesto (Tabla 2) sino también porque son alimentos muy consumidos de forma habitual en la mayoría de los países del mundo.

1.2.3. Propiedades beneficiosas para la salud de los compuestos fenólicos. Quercetina y sus derivados.

En las últimas décadas se han publicado numerosos estudios sobre los efectos beneficiosos para la salud de los compuestos fenólicos (CF) (Scalbert *et al.*, 2005, Pandey y Rizvi, 2009). La ingesta de alimentos ricos en CF se ha relacionado con la reducción del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares (Yamagata *et al.*, 2015), cáncer de colón (Woo y Kim, 2013), obesidad (Lu *et al.*, 2012), enfermedades neurodegenerativas tipo Alzheimer (Vauzour, 2012), diabetes tipo 2 (Kim *et al.*, 2016), etc. Las propiedades antioxidantes, la capacidad para neutralizar radicales libres y la protección de las células frente al estrés oxidativo son algunas de las características que se les atribuye a los CF y que explicarían sus efectos beneficiosos para la salud humana.

Actividad antioxidante: Muchas enfermedades crónicas descritas anteriormente se han relacionado con el estrés oxidativo y la formación de radicales libres en el organismo. Diversos estudios han destacado la actividad antioxidante *in vitro* de los CF y su capacidad para combatir los procesos de oxidación (Tsao, 2010). La actividad antioxidante está ligada en gran parte a su estructura química, concretamente a la presencia de los anillos aromáticos y los múltiples grupos hidroxilo que hacen que los CF sean buenos dadores de electrones y átomos de hidrógeno. Los CF también pueden actuar como quelantes de iones metálicos y por tanto inhibir la formación de radicales libres a través de reacciones de Fenton (Zhang y Tsao, 2016). Por otro lado, los CF pueden ejercer una actividad antioxidante indirecta por su efecto en el aumento de la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa, la superóxido dismutasa o glutatión peroxidasa. Las enzimas antioxidantes juegan un papel importante en la protección celular, ya que descomponen los hidroperóxidos y los aniones superóxidos (Tsao, 2010, Hu, 2011, Prochazkova *et al.*, 2011). Además, algunos CF se han relacionado con la disminución de la actividad de enzimas productoras de especies reactivas de oxígeno como la xantina-oxidasa, lipoxigenasa, ciclooxigenasa, NADPH-oxidasa, entre otras (Dembinska-Kiec *et al.*, 2008). La acción antioxidante de los CF podría relacionarse con otras actividades como la

actividad antiinflamatoria, vasodilatadora, antitrombótica, antiapoptótica o antiaterogénica (Quiñones *et al.*, 2012).

Actividad cardioprotectora: Existen numerosos estudios publicados que relacionan la presencia de CF en distintos alimentos vegetales con efectos beneficiosos en la salud cardiovascular (Ferruzzi, 2010, Bondonno *et al.*, 2012, Hooper *et al.*, 2012, Colina-Coca *et al.*, 2017). La actividad biológica de los CF relacionada con la prevención de las enfermedades cardiovasculares se debe a la inducción de las defensas antioxidantes, la disminución de la presión arterial, la mejora de la función endotelial, la inhibición de la agregación plaquetaria, la inhibición de la reducción de LDL, el aumento de HDL y la reducción de la respuesta inflamatoria (Hooper *et al.*, 2008, Pandey Rizvi, 2009, Vauzour *et al.*, 2010).

La ingesta de alimentos vegetales que presentan en su composición quercetina (manzana y cebolla) y epicatequina (manzana) se ha asociado con el incremento en los niveles de óxido nítrico (factor de relajación vascular) lo que lleva a una mejora de la función endotelial y de la presión sanguínea (Schewe *et al.*, 2008, Bondonno *et al.*, 2012). La ingesta de quercetina también se ha asociado con la disminución de la presión sistólica y la reducción de LDL en sujetos con riesgo cardiovascular (Egert *et al.*, 2009). El consumo de alimentos ricos en flavan-3-oles ha mostrado mejoras en el metabolismo lipídico y la inflamación sistémica (Lin *et al.*, 2016). Estudios *in vitro* e *in vivo* muestran la capacidad de las procianidinas para inhibir la absorción de los triglicéridos a través de la inhibición de las lipasas pancreáticas, capacidad que aumenta con el incremento del grado de polimerización (Sugiyama *et al.*, 2007). El efecto antitrombótico de los CF podría justificarse por la capacidad de estos compuestos para inhibir enzimas implicadas en la síntesis de eicosanoides como el tromboxano A_2, la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa. La quercetina es un potente inhibidor de la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa (Quiñones *et al.*, 2012).

Actividad anticarcinogénica: Los CF pueden ejercer efectos protectores frente al desarrollo de diversos tipos de cáncer, especialmente en el tracto gastrointestinal, donde podemos encontrarlos en concentraciones más altas. La ingesta de flavonoles, flavan-3-oles, antocianinas y proantocianidinas ha mostrado una relación inversa con el riesgo de cáncer colorrectal y de estómago (Woo y Kim, 2013).

Algunos de los mecanismos señalados son sus actividades estrogénicas o antiestrogénicas, antiproliferación, inducción de la apoptosis, prevención de la oxidación, inducción de enzimas detoxificantes, regulación del sistema inmunitario, actividad antiinflamatoria y cambios en la señalización celular (Pandey y Rizvi, 2009). Algunos CF como la quercetina, catequina, isoflavonas, lignanos, flavanonas, resveratrol, entre otros, han mostrado efectos protectores frente al desarrollo de ciertos tipos de cáncer, aunque el mecanismo de acción de cada compuesto es distinto. La quercetina puede mostrar su efecto inhibidor de la carcinogénesis a través de la inducción de la apoptosis tanto en células cancerosas como en tejidos tumorales a través de la activación de vías intrínsecas (Srivastava *et al.*, 2016). La epicatequina puede modular la señalización celular a través de la ruta de la MAP-quinasa (proteínas quinasas activadas por mitógenos) implicada en la proliferación celular. Las mutaciones en esta vía se pueden asociar con neoplasias malignas y en este caso la epicatequina podría actuar como agente preventivo (Shay *et al.*, 2015).

Efecto antidiabético: También se han descrito efectos antidiabéticos de los compuestos fenólicos a través de diversos mecanismos como la inhibición de la absorción intestinal de la glucosa o la captación por los tejidos periféricos (Pandey y Rizvi, 2009). Uno de los mecanismos más conocidos de los CF, especialmente flavonoides, ácidos fenólicos y taninos, en el metabolismo de los carbohidratos es la inhibición de la α-glucosidasa y α-amilasa en la mucosa intestinal, ambas enzimas implicadas en la transformación de los carbohidratos de la dieta hasta glucosa (Scalbert *et al.*, 2005). Los mecanismos antidiabéticos *in vitro* e *in vivo* descritos para la quercetina son la disminución de la resistencia a la insulina y el aumento de la captación de glucosa por los tejidos a través de la activación de ciertas proteínas (SIRT1 y PPARγ) y vías de señalización (AMPK) y suprimiendo la liberación de factores de inflamación (NF-κB, FKN, MCP-1, ICAM-1) (Shi *et al.*, 2019). Catequina y epicatequina atenúan la hiperglucemia y la producción de glucosa hepática mediante la regulación negativa de la expresión de la glucoquinasa hepática y la regulación positiva de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) (Bahadoran *et al.*, 2013). El ácido clorogénico ha mostrado efectos protectores en el metabolismo de la glucosa a través de la disminución de la absorción de la glucosa y por tanto reducción de sus niveles en plasma, disminución de la resistencia a la insulina, reducción de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa y aumento de los receptores de adiponectina, entre otros (Alam *et al.*, 2016, Santana-Gálvez *et al.*, 2017).

Efectos neuroprotectores: La acumulación del daño oxidativo en las células neuronales durante el proceso de envejecimiento puede promover una excesiva muerte celular lo que podría relacionarse con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, demencia o Parkinson. La capacidad de los CF de atravesar la barrera hematoencefálica les permite contrarrestar el efecto de las especies reactivas de oxígeno y los agentes proinflamatorios generados en el cerebro durante el metabolismo normal, así como durante el envejecimiento (Vauzour, 2012, Li *et al.*, 2014). Además, los CF pueden actuar como agentes neuroprotectores por su influencia en procesos celulares de señalización, proliferación, apoptosis, balance redox y diferenciación (Singh *et al.*, 2008). El ácido clorogénico ha mostrado efectos neuroprotectores a través de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la butirilcolinesterasa, enzimas clave en el Alzheimer (Oboh *et al.*, 2013). También se ha estudiado la eficacia de la rutina en el tratamiento del Alzheimer relacionado con sus actividades antioxidantes, antiinflamatorias y reductoras del oligómero Aβ (péptido localizado en los depósitos amiloides en el cerebro de los pacientes con enfermedad del Alzheimer) (Li *et al.*, 2014).

1.3. Manzana y cebolla. Fuentes naturales de compuestos fenólicos.

La manzana (*Malus domestica*) pertenece a la familia de las *Rosáceas* y es una de las frutas más consumidas y comercializadas a nivel mundial. China y Estados Unidos son los mayores productores de manzana. Dentro de la Unión Europea, los principales productores son en primer lugar Polonia, seguida de Italia y Rumanía, ocupando España la sexta posición (Figura 11). La producción de manzana en España en el año 2018 se estimó en 476000 toneladas (WAPA, 2019) y las variedades más comunes (Figura 12) son 'Golden Delicious' (57%), 'Gala' (16%), 'Red Delicious' (8%), 'Granny Smith' (5%), grupo 'Reinetas' (6%) y 'Fuji' (5%) (Toranzo, 2016). La manzana destaca por su alto contenido en agua (85% aproximadamente), un buen aporte de hidratos de carbono fundamentalmente azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, fibra soluble (en mayor medida) e insoluble y un buen contenido de potasio, vitamina C y ácidos orgánicos (ácido málico principalmente) (Bondonno *et al.*, 2017, USDA, 2018a).

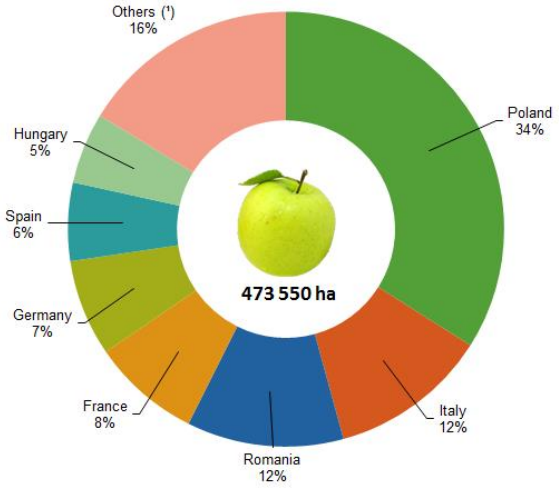


Figura 11: Área (ha) dedicada a la producción de manzana en Europa en 2017. Fuente: Eurostat (2019).



Figura 12: Variedades de manzana.

La cebolla (*Allium cepa*) es una de las hortalizas más consumidas y producidas a nivel mundial. También en España la cebolla es una de las hortalizas más consumidas detrás del tomate (FEPEX, 2018). Forma parte de la familia de las *Liliáceas* a la que pertenecen también el ajo y el puerro. Es una hortaliza que se cultiva en todos los países del mundo gracias a su adaptación a diferentes condiciones climatológicas. China e India son los mayores productores a nivel mundial y dentro de la Unión Europea, España y Holanda son los principales productores. La producción de cebolla en España en 2018 fue de 1,3 millones de toneladas, un 25% superior a la producción registrada en el año 2000 (FAOSTAT, 2018a). Las variedades de cebolla cultivadas en España se pueden identificar como de día corto, intermedio o largo en función del número mínimo de horas de luz que se requiere para que el 100% de las plantas formen el bulbo. También hay otra forma de clasificarlas en función del color de su túnica exterior como cebollas de túnica blanca, amarilla y roja o morada. Algunas de las cebollas más consumidas en España son: 'Dulce

de Fuentes' o 'Fuentes del Ebro' (túnica blanca), 'Morada de Amposta' (túnica morada), 'Grano Medio' o 'Liria' (túnica amarilla), 'Babosa' o 'Valenciana Temprana' (túnica amarilla), 'Grano de Oro' o 'Valenciana Tardía' (túnica amarilla) y 'Recas' o 'Valenciana de exportación' (túnica amarilla), siendo estas dos últimas las que presentan una mayor producción en España (MAPA, 2018b).

Tabla 3: Composición nutricional de cebolla y manzana.

Nutriente		Unidades	Manzana[a]	Cebolla[b]
Energía		kcal	89,11	85,56
Agua		g	40	52
Proteína		g	1,1	0,26
Grasa		g	0,1	0,17
	AGS[c]	g	0,042	0,028
	AGM[d]	g	0,013	0,007
	AGP[e]	g	0,017	0,051
	Colesterol	mg	0	0
Hidratos de carbono		g	13.81	9,34
	Fibra total	g	1,7	2,4
	Azúcares	g	4,24	10,39
Minerales				
	Calcio	mg	23	6
	Hierro	mg	0,21	0,12
	Magnesio	mg	10	5
	Fósforo	mg	29	11
	Potasio	mg	146	107
	Sodio	mg	4	1
	Zinc	mg	0,17	0,04
Vitaminas				
	Vitamina C	mg	7,4	4,6
	Tiamina(B1)	mg	0,046	0,017
	Riboflavina(B2)	mg	0,027	0,026
	Niacina (B3)	mg	0,116	0,091
	Piridoxina(B6)	mg	0,12	0,041
	Folato(B9)	µg	19	3
	Vitamina B12	µg	0	0
	Vitamina A	µg RAE[f]	0	3
	Vitamina E	mg	0,02	0,18
	Vitamina D	µg	0	0
	Vitamina K	µg	0,4	2,2

[a] Manzana cruda con piel (resultados obtenidos a partir de las variedades 'Red Delicious', 'Golden Delicious', 'Gala', 'Granny Smith' y 'Fuji'), [b] Cebolla cruda entera, [c] ácidos grasos saturados, [d] ácidos grasos monoinsaturados, [e] ácidos grasos poliinsaturados, [f] RAE (equivalentes de actividad de retinol). Fuente: USDA (2018a), USDA (2018b).

Las cebollas presentan un contenido de agua del 80-95%, destaca su contenido en hidratos de carbono, fibra, fructooligosacáridos y ácidos orgánicos. La cebolla también presenta cantidades significativas de vitamina C, ácido fólico y minerales como el calcio, magnesio, fósforo y potasio (Griffiths *et al.*, 2002, USDA, 2018b). Otros compuestos importantes en la cebolla son los compuestos organosulfurados (S-alqu(en)il-L-cisteína sulfóxido) y sus productos de degradación (tiosulfinatos, tiosulfonatos y compuestos mono y trisulfuros) con importantes implicaciones en la salud ya que pueden actuar como agentes quimiopreventivos (Moriarty *et al.*, 2007). En la Tabla 3 se muestra la composición nutricional media de cebolla y manzana con piel.

La manzana y la cebolla son fuentes naturales de compuestos fenólicos (CF). En concreto, en la manzana podemos destacar su contenido de monómeros de flavan-3-oles (epicatequina principalmente) y oligómeros (procianidina B2 como mayoritario), ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico fundamentalmente), flavonoles (glicósidos de quercetina, principalmente quercetina-3-galactósido y quercetina-3-ramnósido), una pequeña cantidad de dihidrochalconas (florizina y un derivado glucosilado, floretin-2'-xiloglucósido) y antocianinas en las variedades rojas (cianidina-3-galactósido) (Bondonno *et al.*, 2017). Una gran proporción de los CF se encuentran en la piel de la manzana (Francini y Sebastiani, 2013). El contenido de compuestos fenólicos varía en gran medida entre las distintas variedades de manzana y entre la misma variedad, pero distinta región de origen (Lamperi *et al.*, 2008, Lata *et al.*, 2009). La manzana es una de las principales fuentes dietéticas de ácidos hidroxicinámicos, catequina, proantocianidinas y dihidrochalconas en España (Tresserra-Rimbau *et al.*, 2018).

Las cebollas son una de las principales fuentes del flavonol quercetina y sus derivados glicosilados. Al menos 25 diferentes flavonoles han sido descritos en las diversas variedades de cebolla. El principal azúcar es la glucosa que se une a la quercetina en las posiciones 3, 4' y 7 (Slimestad *et al.*, 2007). Los principales glucósidos presentes en la cebolla son la quercetina-4'-glucósido y la quercetina-3,4'-diglucósido, representando en la mayoría de los casos más del 80% del total de flavonoides. Estos glucósidos se encuentran principalmente en el bulbo mientras que la quercetina aglicona está presente en las capas más externas de la cebolla (Beesk *et al.*, 2010). También han sido identificados derivados glicosilados de la isoramnetina y el kaempferol (Slimestad *et al.*, 2007). Las variedades rojas/moradas de cebolla también presentan un buen contenido de antocianinas (cianidina-

3-glucósido, cianidina-3-laminaribiosa, cianidina-3-malonilglucósido y cianidina-3-malonillaminaribiosa) (Griffiths *et al.*, 2002).

El elevado consumo y la gran disponibilidad geográfica tanto de manzana como de cebolla, les hacen ser grandes contribuidores a la ingesta diaria de CF. Algunos de los efectos beneficiosos para la salud atribuidos a los CF presentes en manzana y cebolla están relacionados con sus características antioxidantes, anticarcinogénicas, hipolipidémicas e hipoglicémicas que podría ayudar a la disminución del riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer, entre otras (Griffiths *et al.*, 2002, Boyer y Liu, 2004).

Aunque la manzana y la cebolla se comercializan fundamentalmente en su estado natural (crudo), existen en el mercado otros productos procesados derivados de manzana y cebolla. A partir de la manzana se obtiene distintos productos como zumos, sidra, mermeladas, salsas, gelatinas, vinagres, manzana deshidratada o en polvo. El zumo de manzana es uno de los principales productos comercializados sobre todo en Estados Unidos con una producción media en 2016 de 512 millones de galones (casi 2000 millones de litros) (US Apple Association, 2018). De la cebolla se conocen diversos productos como cebolla deshidratada, cebolla en polvo, picada, congelada, en escamas, etc. (Wiczkowski, 2018).

1.4. Nuevas perspectivas en nutrición. Alimentos funcionales.

Los cambios en los patrones de alimentación, el aumento de la esperanza de vida y el consiguiente envejecimiento de la población junto con el aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas han hecho que pasemos de hablar del concepto de nutrición equilibrada, entendida como una nutrición suficiente y dirigida a evitar déficits, al concepto de nutrición óptima, aquella que también incluye alimentos o ingredientes que proporcionan beneficios para la salud más allá de los requerimientos energéticos y nutricionales básicos. En este contexto, surgen los llamados alimentos funcionales que son objeto de investigación y desarrollo por la industria alimentaria actual.

El concepto de alimento funcional nació en Japón en los años 80, cuando las autoridades sanitarias japonesas se dieron cuenta de la importancia de garantizar una mejor calidad de vida de las personas mediante la alimentación. Se introdujo así el concepto de alimentos desarrollados específicamente para mejorar la salud y reducir el riesgo de enfermedades.

En la actualidad no existe un consenso general en cuanto a la definición de alimento funcional. De acuerdo al Instituto Internacional de Ciencias de la Vida en Europa (ILSI-Europe): "Un alimento puede considerarse funcional si ha demostrado satisfactoriamente que afecta de manera beneficiosa a una o más funciones del organismo, más allá de sus efectos nutricionales, de manera que es relevante tanto para mejorar el estado de salud y bienestar como para reducir alguno de los factores de riesgo de enfermedades". Además, estos alimentos funcionales deben consumirse dentro de la dieta y el efecto beneficioso debe conseguirse con las cantidades que habitualmente se consumen del alimento de referencia.

En la elaboración de alimentos funcionales encontramos las siguientes posibilidades (Juárez-Iglesias y Perote Alejandre, 2010):

- Incorporación a un alimento convencional de ingredientes con actividad biológica, sin función terapéutica, sino preventiva.
- Eliminación de constituyentes no deseados. Ejemplo: proteínas alergénicas.
- Sustitución de componentes de los alimentos con efectos negativos por otros con efectos beneficiosos.
- Incrementar la concentración de un ingrediente natural con efectos beneficiosos sobre la salud. Ejemplo: un micronutriente.
- Aumentar la biodisponibilidad o estabilidad de un componente con efectos beneficiosos.
- Cualquier combinación de las anteriores.

Además, se pueden utilizar tecnologías como las altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos de bajo voltaje, ultrasonidos, impregnación a vacío, fluidos supercríticos, etc., para la obtención de ingredientes funcionales o para la funcionalización de determinados alimentos (Soria y Villamiel, 2010, Ofori y Hsieh, 2013, Putnik *et al.*, 2018).

Se han empleado extractos de antocianinas obtenidas a partir de subproductos de uva, como antioxidantes o colorantes naturales combinando un tratamiento térmico moderado con pulsos eléctricos, altas presiones hidrostáticas y ultrasonidos (Corrales *et al.*, 2008b). Algunos trabajos describen la funcionalización de diversos productos como salchichas, galletas, hamburguesas o mermeladas con distintos subproductos de tomate obtenidos a través de distintas tecnologías como el secado y la pulverización (polvo, harinas obtenidas

de la piel, piel seca, …) para conseguir entre otras cosas un aumento en el contenido de licopeno, fibra, carotenoides y mejora de la textura y sabor (Szabo *et al.*, 2018). También se ha descrito el uso del tratamiento por altas presiones para la infusión de compuestos bioactivos dentro de matrices alimentarias como por ejemplo trozos de manzana (George *et al.*, 2016).

Uno de los factores más importantes a tener en cuenta para la obtención y comercialización de un alimento o ingrediente funcional es conocer la cantidad potencial del compuesto bioactivo que puede ser absorbido durante la digestión gastrointestinal (bioaccesibilidad) y el porcentaje del mismo que es realmente metabolizada por el organismo, llegando al plasma sanguíneo y produciendo el efecto metabólico buscado (biodisponibilidad). Además, es necesario conocer los factores que puedan influir en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos como pueden ser la matriz alimentaria en los que se encuentran inmersos, el procesado del alimento y el resto de alimentos de la dieta. De esta manera se puede determinar la ingesta adecuada, la mejor fuente alimentaria del compuesto bioactivo, así como las condiciones óptimas del procesado para garantizar la funcionalidad del alimento o ingrediente desarrollado (Fernández-García *et al.*, 2009). Para estudiar en profundidad este proceso, la comunidad científica ha desarrollado diversos modelos *in vitro* de digestión gastrointestinal que permiten estudiar las transformaciones de los compuestos bioactivos durante la digestión, así como los diversos factores que pueden afectar a la bioaccesibilidad y por tanto a la bioactividad de los mismos (Lucas-González *et al.*, 2018).

2. PROCESADO DE ALIMENTOS POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.

La mayoría de las tecnologías convencionales de procesado térmico de alimentos tienen como principio básico el uso del calor para lograr reducir o eliminar los microorganismos patógenos y alterantes, inactivar enzimas y así obtener alimentos seguros con una larga vida útil. Sin embargo, a menudo estas tecnologías conllevan una pérdida de la calidad nutricional y sensorial de los alimentos ya que muchos compuestos responsables del sabor/olor de los alimentos, nutrientes y compuestos bioactivos son sensibles al calor. Este hecho impulsó la búsqueda de nuevas tecnologías de procesado que asegurasen la conservación de las características sensoriales, nutricionales y bioactivas de los alimentos

sin comprometer la seguridad alimentaria. Entre estas tecnologías podemos destacar los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), irradiación, ultrasonidos, plasma frío y las altas presiones hidrostáticas (APH), en inglés High Pressure Processing (HPP).

2.1. Definición y principios básicos.

El procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) consiste en aplicar presiones entre 100 y 900 MPa por tiempos cortos sobre un líquido, generalmente agua, que contiene a los alimentos sólidos y líquidos envasados. Los tratamientos APH se pueden combinar con tratamientos térmicos suaves entre 10 ºC y 50 ºC. En la actualidad, los tratamientos comerciales se realizan a 600 MPa a temperatura ambiente durante tiempos cortos entre 3-5 minutos (San Martin *et al.*, 2002, Hogan *et al.*, 2005).

Las APH consiguen reducir o eliminar microorganismos patógenos y alterantes y la actividad de ciertas enzimas sin el uso de conservantes químicos y/o aditivos a una temperatura más baja en comparación con los tratamientos térmicos y sin ocasionar pérdida en la calidad de los alimentos (sabor, aroma, color, nutrientes, compuestos bioactivos).

El principal inconveniente de las APH es que los alimentos así procesados deben ser almacenados a temperatura de refrigeración para evitar la activación de posibles esporas bacterianas que pudieran estar presentes en el alimento. Es por ello que el procesado por APH se considerada una "pasteurización fría" ya que no consigue la inactivación de esporas.

Esta tecnología se basa en tres principios:

- **Principio de Le Chatêlier:** según el cual, cualquier fenómeno (reacción química, cambios moleculares, etc.) que va acompañado por una disminución de volumen está favorecido por un aumento de presión y viceversa (Norton y Sun, 2008). Esta es la razón por la cual las uniones covalentes prácticamente no se alteran por las APH cuando se utilizan temperaturas bajas-moderadas (0-40 ºC), mientras que las interacciones hidrofóbicas e iónicas sí se afectan, sobre todo a presiones superiores a 200 MPa (Yaldagard *et al.*, 2008). Por esta razón, el procesado por APH modifica mínimamente las moléculas de tamaño pequeño como los compuestos responsables del aroma y sabor, nutrientes y compuestos bioactivos en los que dominan los

enlaces covalentes que no se ven modificados por la presión. Sin embargo, produce cambios en las macromoléculas como proteínas donde tienen lugar fenómenos de desnaturalización cuyo resultado es la inactivación de las enzimas alterantes de la calidad de los alimentos, entre otros efectos.

- **Principio Isostático o Teorema de Pascal:** según este principio, la presión aplicada sobre la superficie de un fluido de baja comprensibilidad como el agua se transmite de forma uniforme e instantánea sobre un cuerpo que está en contacto directo con el medio o en un envase deformable. La presión se transmite de manera uniforme (isostática) e instantánea a través del producto, con independencia de su tamaño, forma y composición. Este proceso evita las zonas sobretratadas o deformaciones en el producto (Elamin *et al.*, 2015).
- **Principio de Ordenamiento Microscópico**: establece que, a una temperatura constante, el aumento de la presión aumenta el grado de ordenamiento de las moléculas de una sustancia (Elamin *et al.*, 2015).

2.2. Antecedentes.

Los primeros estudios sobre la aplicación de las altas presiones hidrostáticas (APH) como tecnología de procesado de alimentos se remontan a finales del siglo XIX. En 1899, Hite (1899) diseñó una unidad de tratamiento de altas presiones para pasteurizar leche y conseguir reducir su carga microbiana (Figura 13). En 1914, utilizó esta misma técnica para eliminar microorganismos en frutas y vegetales (Hite *et al.*, 1914). A partir de entonces, se llevaron a cabo distintos estudios sobre el efecto de esta tecnología en la inactivación de diversos microorganismos y su efecto sobre distintos componentes de los alimentos.

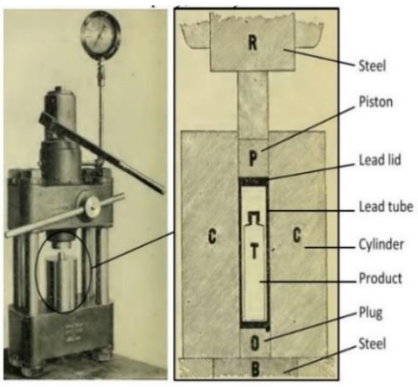


Figura 13: Equipo de altas presiones desarrollado por Hite. Fuente: Elamin *et al.* (2015).

Sin embargo, no fue hasta la década de los años 80 cuando la industria alimentaria comienza a utilizar esta tecnología de procesado y fabricar equipos capaces de procesar grandes cantidades de alimentos. En 1990, la empresa japonesa Meidi-ya Food Co introdujo en el mercado los primeros alimentos tratados por APH como mermeladas, jaleas de frutas y salsas vegetales. En EEUU, uno de los primeros productos tratados por APH con éxito comercial fue el guacamole producido en 1997 por la empresa Avomex Inc. El guacamole tratado por APH fue aceptado por los consumidores al tratarse de un producto con características sensoriales similares a las del producto fresco, sin necesidad de utilizar aditivos y con una vida comercial aceptable (Torres y Velázquez, 2005). También en 1998 se desarrolló en España un producto de jamón cocido loncheado tratado por altas presiones (Balasubramaniam *et al.*, 2015). Hoy en día, la tecnología de APH es reconocida a nivel mundial, está en constante crecimiento y cuenta con multitud de aplicaciones en la industria alimentaria. A parte de su uso como tecnología de conservación, el tratamiento por APH se está utilizando en la obtención de nuevos productos (con nuevas texturas) o para aumentar la funcionalidad de ciertos ingredientes y alimentos.

2.3. Aspectos tecnológicos.

Variables del proceso. Presión, tiempo y temperatura son tres parámetros críticos a considerar en el diseño de un tratamiento por altas presiones hidrostáticas (APH). Las presiones habituales de trabajo están comprendidas entre 300 MPa y 600 MPa (Wgiorgis, 2019). En cuanto al tiempo es importante controlar tanto el tiempo de tratamiento (cuando alcanza la presión de trabajo) como el tiempo necesario para alcanzar la presión deseada y el tiempo de descompresión hasta alcanzar de nuevo la presión atmosférica. La elección de la temperatura de tratamiento irá en función del objetivo final. El uso de temperaturas suaves (10-40 ºC) puede ser suficiente para eliminar microorganismos patógenos y alterantes en los alimentos con cambios mínimos en textura, color y sabor en comparación con tratamientos térmicos convencionales (Torres y Velázquez, 2005). Sin embargo, para conseguir la esterilización del alimento que precisa de una completa destrucción de las células vegetativas y esporas bacterianas se están ensayando tratamientos combinados de temperaturas más elevadas y presión, proceso conocido como Procesado Térmico Asistido por Presión (PTAP) derivado del inglés “Pressure Assisted Thermal Processing (PATP) (Zhang y Mittal, 2008).

También es importante tener en cuenta los cambios de temperatura que sufre el alimento al ser sometido a una presión elevada. El tratamiento por altas presiones incrementa la temperatura del alimento aproximadamente 3 ºC por cada 100 MPa (8-9 ºC por cada 100 MPa en el caso de alimentos con alto contenido en grasa) (Rastogi *et al.*, 2007). Este calentamiento ocasionado por la presión ejercida en el alimento es conocido como calentamiento adiabático.

Equipos. Los equipos de procesado por APH están formados por una cámara de presurización cilíndrica de acero de elevada resistencia, un generador de presión (constituido por una bomba hidráulica y un sistema multiplicador de presión) y un sistema de control de temperatura (Elamin *et al.*, 2015). En general, los alimentos son tratados por APH desde su envase original el cuál es introducido en la cámara de presurización (Figura 14). A continuación, la cámara se cierra y se llena con el medio transmisor de la presión (agua en el caso de las APH). La presión aplicada por el generador de presión comprime el medio alrededor del alimento provocando la disminución del volumen, que varía en función de la presión y temperatura aplicadas. A temperatura ambiente, esta disminución de volumen es del 4% a 100 MPa, 11,5% a 400 MPa y 15% a 600 MPa (Téllez-Luis *et al.*, 2001). La presión en la cámara es mantenida por un periodo de tiempo predeterminado. La cámara se somete a una descompresión y se extrae el alimento tratado. Seguidamente se coloca una nueva carga de alimento en la cámara y se inicia un nuevo ciclo. Este proceso elimina el riesgo de contaminación del alimento durante un proceso de envasado posterior ya que las APH higienizan a la vez al producto y al envase por lo que no es necesario realizar un envasado aséptico.

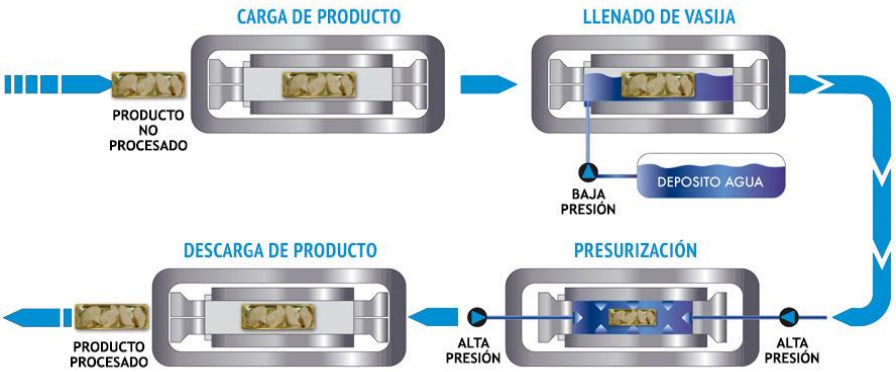


Figura 14: Esquema del funcionamiento de una unidad de altas presiones hidrostáticas. Fuente: https://www.hiperbaric.com/es/

En el mundo existen más de 10 empresas que suministran equipos de APH, aunque gran parte (50%) de los equipos existentes en el mercado son de la empresa Hiperbaric (Burgos, España). Otras empresas importantes en este sector son Avure (Middletown, Ohio, EEUU) y Multivac (Alemania) (Figura 15). Los equipos pueden presentar vasijas de tratamiento con un diseño vertical u horizontal. Los equipos con la vasija horizontal fueron diseñados inicialmente por la empresa española Hiperbaric, y después copiados por las demás empresas ya que ofrece mayores ventajas para la carga y descarga de producto en la línea de producción (Figura 15).

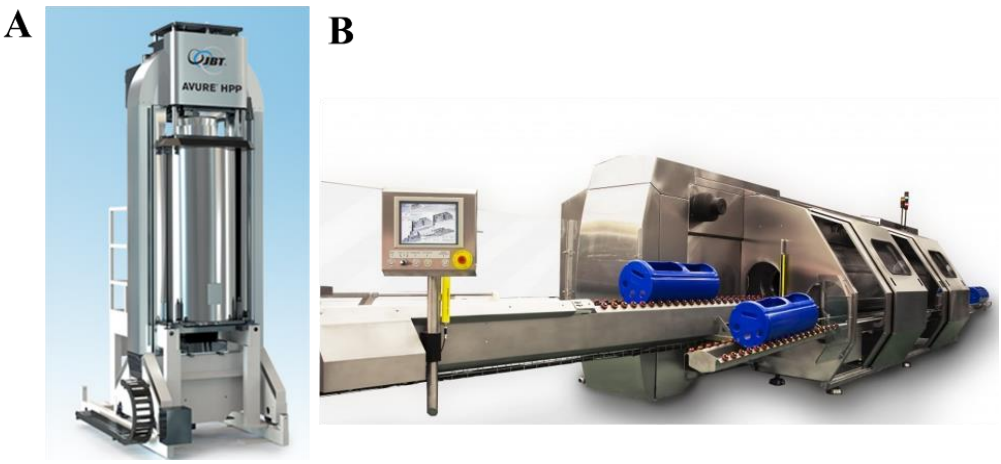


Figura 15: (A) Equipo Avure AVS, (B) equipo Hiperbaric 300. Fuentes: https://www.jbtc.com/; https://www.hiperbaric.com/

Los equipos comerciales de APH se encuentran sobre todo en América del Norte (54%), Europa (25%) y Asia (12%). El coste medio de un equipo de APH a escala comercial puede oscilar entre 0,5 y 3 millones de euros dependiendo de la capacidad de la vasija. Como ejemplo, la empresa Hiperbaric tiene equipos con vasijas entre 55 y 525 L lo que permite una producción entre 200 y 3500 kg/h (Tonello, 2013).

Coste de producción. A mayor producción anual, más barato sale producir un kg de producto (Tabla 4). Así, si se considera un equipo con una vasija de 300 L (entran 150 kg), un tratamiento estándar de 600 MPa/ 3 min, duración total del ciclo de 7,5 minutos, 8 ciclos/hora, energía consumida (90 kW/h), periodo de amortización (5 años), producción/h (1200 kg), número de operarios por turno (3) y personal de mantenimiento, el coste de producción sería de 0,209 €/kg para una producción moderada y de 0,147 €/kg para una producción intensiva (Tonello, 2013). Por tanto, el coste de producción por kg de producto en un escenario de producción moderada se puede estimar en: 59% por depreciación, 20% de mano de obra, 16% de mantenimiento (piezas como juntas) y 5% de energía.

Tabla 4: Costes de producción del procesado por altas presiones hidrostáticas.

TIPO DE USO		MODERADO	INTENSIVO
Uso diario	Horas	10	20
Uso anual	Días	200	300
Nº ciclos/día		80	160
Producción anual	Toneladas	2400	7200
COSTES tratamiento/ kg			
Cargo por depreciación	€	0,123	0,041
Cambio de piezas por desgaste	€	0,033	0,053
Mano de obra	€	0,043	0,043
Energía	€	0,01038	0,01038
TOTAL Coste/kg	€	0,209	0,147

Fuente: Tonello (2013).

Envases. Los alimentos envasados que van a ser tratados por APH deben de estar fabricados con materiales flexibles para soportar los cambios de volumen durante la compresión y descompresión. Estos materiales deben de ser capaces de reducir un 15% su volumen y ser resistentes al agua. Además, deben mantener su integridad, es decir, no sufrir roturas y que las zonas de sellado resistan la presión. Además, como estos productos procesados por APH pasan directamente al punto de venta, el material de envase no puede perder sus propiedades de barrera (frente a oxígeno, y otros gases) para asegurar una vida útil adecuada (Elamin *et al.*, 2015).

2.4. Efectos de las altas presiones hidrostáticas.

Efecto sobre los microorganismos. El principal objetivo de la tecnología de altas presiones hidrostáticas (APH) es la eliminación de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos sin modificar sus características sensoriales, nutricionales y bioactivas. Dependiendo de la intensidad del tratamiento aplicado, el nivel de seguridad obtenido en el alimento será diferente. El procesado por APH a temperatura ambiente consigue inactivar un amplio rango de microorganismos como mohos, levaduras y una gran parte de bacterias vegetativas incluyendo la mayoría de los microorganismos patógenos (Figura 16). Para conseguir la inactivación de las esporas bacterianas es necesario combinar altas presiones (>600 MPa) con temperaturas elevadas (>90 ºC), ciclos de presión o la combinación de la APH con otros tratamientos (Matser *et al.*, 2004, Black *et al.*, 2007).

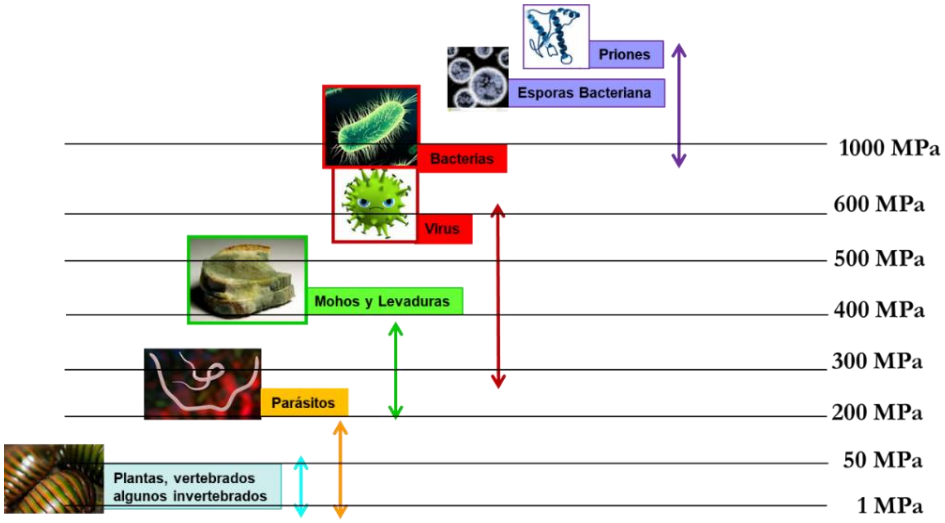


Figura 16: Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre los microorganismos. Fuente: https://www.hiperbaric.com/es/

El efecto de la presión sobre la destrucción de los microorganismos se debe principalmente a cambios en la membrana celular, cambios bioquímicos, morfológicos y genéticos. Los cambios en la membrana celular se basan en la desnaturalización de las proteínas lo que genera cambios en su permeabilidad y en el intercambio iónico. De esta manera se ven afectados los procesos de transporte celular relacionados con la obtención de nutrientes y la eliminación de desechos (Velázquez *et al.*, 2005). Las APH producen cambios morfológicos en las células vegetativas de los microorganismos como compresión del gas de las vacuolas, alargamiento de las células, cambios en la pared celular, modificaciones del citoesqueleto, núcleo y orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de componentes al espacio extracelular. A nivel genético, las APH provocan la inactivación de enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

El mayor grado de inactivación microbiológica se produce en la etapa logarítmica de crecimiento. Las bacterias Gram negativas son más sensibles a la presión, seguidas por levaduras y hongos, bacterias Gram positivas y por último los más resistentes son las esporas y los virus (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

También es importante controlar los parámetros intrínsecos propios del alimento como son el pH, la composición y la actividad del agua. Los microorganismos se vuelven más susceptibles a la presión a pH más bajos. Un punto considerado crítico son los alimentos con pH $\geq$ 4,5 que requieren un procesado más intenso y un almacenamiento refrigerado

más controlado para evitar la posible germinación de esporas. La presencia en los alimentos de azúcares y sales afecta a la baro-resistencia de los microorganismos. La reducción de la actividad de agua también afecta a la viabilidad de los mismos (Téllez-Luis *et al.*, 2001, Srinivas *et al.*, 2018).

Efecto sobre las enzimas. El efecto del tratamiento de APH sobre las enzimas depende del tipo de enzima, de las condiciones del procesado (presión, tiempo y temperatura) y de las propiedades de la matriz alimentaria como el pH y el contenido en agua (Terefe *et al.*, 2014). La inactivación enzimática por acción de la presión se debe a cambios estructurales en las proteínas, sobre todo a nivel de las estructuras terciaria y cuaternaria, producidos por el efecto que producen las APH sobre los enlaces iónicos e interacciones hidrofóbicas que mantienen estas estructuras (Téllez-Luis *et al.*, 2001).

En general, la inactivación enzimática por APH puede ser más complicada y menos predecible que la inactivación microbiológica. Dependiendo del tipo de enzima, los tratamientos a presiones bajas (100-200 MPa) pueden incrementar su actividad y necesitar presiones mucho más altas (600-900 MPa) para alcanzar una inactivación parcial o total. Sin embargo, otras enzimas son capaces de activarse incluso aplicando presiones elevadas (Mujica-Paz *et al.*, 2011). Aplicar temperaturas más elevadas durante el tratamiento también incrementa el porcentaje de inactivación.

Tratamientos entre 600 y 900 MPa a temperaturas moderadas (25-55 ºC) pueden provocar un grado de inactivación variable en enzimas como la pectinesterasa, polifenoloxidasa, peroxidasa, lipoxigenasa, fosfatasa y catalasa (Raso y Barbosa-Cánovas, 2003, Rastogi *et al.*, 2007). La combinación de las APH con altas temperaturas (>65 ºC), bajo pH y/o el uso de agentes antipardeamiento como el ácido ascórbico o benzoico, entre otros, consigue incrementar el porcentaje de inactivación (Terefe *et al.*, 2014).

Efecto en los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante. El efecto de las altas presiones sobre los compuestos bioactivos presentes en distintos productos vegetales depende de la intensidad del tratamiento y la matriz estudiada, lo que hace necesario realizar estudios de manera individualizada. En general, las APH a temperaturas moderadas no afectan a la estructura de moléculas de bajo peso molecular ya que los enlaces covalentes son estables a presiones inferiores a 200 MPa (Oey *et al.*, 2008a). Sin embargo, la calidad de productos derivados de frutas y hortalizas tratadas por APH puede cambiar durante el almacenamiento debido a reacciones químicas de oxidación o

reacciones bioquímicas por enzimas o microorganismos no inactivados de forma completa (Oey *et al*., 2008a).

El efecto de las APH sobre el contenido de vitamina C en diferentes frutas y hortalizas es uno de los más estudiados con respecto a otros compuestos bioactivos. Estudios en puré y zumo de fresa, zumo de arándanos, puré de manzana, y zumo de naranja muestran un alto porcentaje de retención de vitamina C (>90%) tras los tratamientos por altas presiones (200-600 MPa) a temperaturas moderadas (25-40 ºC) (Sánchez-Moreno *et al.*, 2005, Landl *et al.*, 2010, Barba *et al.*, 2013, Aaby *et al.*, 2018). El contenido de vitamina C parece estar más influenciado por el tipo de matriz alimentaria, el uso de temperaturas elevadas (>65 ºC) y la duración del tratamiento que por el nivel de presión aplicado (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009). Otras causas de la pérdida de vitamina C durante el tratamiento pueden ser la oxidación enzimática o la oxidación durante el calentamiento adiabático (Barrett y Lloyd, 2012).

Otros compuestos como la vitamina A, los carotenoides, las vitaminas del grupo B, especialmente la B1 (tiamina), B2 (riboflavina) y B6 (piridoxina) parecen ser bastantes estables a las APH (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009, Barrett y Lloyd, 2012). Sin embargo, la vitamina B9 (ácido fólico) muestra una mayor sensibilidad ya que el tratamiento puede provocar una desglutamilación de los folatos (Verlinde *et al.*, 2008).

Respecto a los compuestos fenólicos, el tratamiento por APH parece no afectar o incluso favorecer la extracción de estos compuestos. El contenido de compuestos fenólicos totales en productos como puré de tomate, zumo de zanahoria, puré de fresas y arándanos, cebolla y manzana, entre otros, no se modificó por el procesado por APH (400-600 MPa) a temperaturas moderadas (10-30 ºC) (Patras *et al.*, 2009a, Patras *et al.*, 2009b, Roldán-Marín *et al.*, 2009, Landl *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2016). En zumo de manzana tratado a 450 MPa/25 ºC/10 min se ha observado un aumento en el contenido de flavonoles totales (Abid *et al.*, 2014). El contenido de quercetina, quercetina-4'-glucósido y quercetina-3,4'-diglucósido aumentó en cebolla tratada a 100 y 400 MPa a baja temperatura (5 ºC) (Roldán-Marín *et al.*, 2009). El contenido de procianidina B1, ácido *p*-cumárico y ácido clorogénico en smoothies de fruta permanece estable tras el tratamiento por APH (450, 550 y 650 MPa) (Keenan *et al.*, 2011, Andrés *et al.*, 2016). Estudios en fresa, arándanos, naranja roja y uva muestran que el tratamiento por APH (200-600MPa) a temperaturas moderadas (10-30 ºC) no afectó al contenido de las antocianinas, cianidina-3-glucósido y pelargonidina-3-glucósido (Corrales *et al.*, 2008a, Patras *et al.*, 2009b, Torres *et al.*, 2011).

Sin embargo, el tratamiento por APH (450, 550 y 650 MPa durante 5 y 15 min) disminuyó el contenido de ácidos hidroxicinámicos, epicatequina, quercetina y rutina extraídos en puré de tomate (Jez *et al.*, 2018), por lo que parece que el mismo compuesto fenólico puede mostrar diferente sensibilidad a la presión dependiendo del tipo de matriz alimentaria que lo contiene. La pérdida de los compuestos fenólicos de los productos tratados por altas presiones puede deberse a la actividad residual de enzimas como la polifenoloxidasa y la peroxidasa o al uso de temperaturas inadecuadas durante el almacenamiento (Oey et al., 2008a).

En general, el procesado por APH no modifica de forma significativa la actividad antioxidante de los productos vegetales. Al igual que para los demás parámetros estudiados, el efecto de las APH sobre la actividad antioxidante depende de distintos factores como el tipo de matriz alimentaria, los parámetros del tratamiento, así como el método seleccionado para determinar la capacidad antioxidante (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009). Así, se ha observado que la actividad antioxidante (método $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$) de zumo de naranja, de zanahoria, de arándanos y de manzana no se vio afectada por los tratamientos de APH aplicados (Sánchez-Moreno *et al.*, 2005, Barba *et al.*, 2013, Abid *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2016). Sin embargo, cuando el tratamiento de alta presión se combina con temperaturas más elevadas (≥60 ºC) y tiempos prolongados (≥30 min), la pérdida de la actividad antioxidante se hace más notable (Sánchez-Moreno *et al.*, 2009).

2.5. Aplicaciones de las altas presiones hidrostáticas.

Las altas presiones hidrostáticas (APH) constituyen una de las tecnologías no térmicas con un mayor desarrollo comercial. Algunos de los productos comercializados tratados por APH son salsas como el guacamole, ensaladas, zumos de frutas, smoothies, bebidas funcionales, mariscos, carnes, pescados, productos lácteos, etc. Según se muestra en la Figura 17, el sector que más ha crecido ha sido el de los zumos de frutas y bebidas (zumos, smoothies, leches vegetales, etc.), sector que supone el 24% de los productos procesados por APH comerciales. Le sigue el sector de las frutas y vegetales con un 21% en el que destaca el guacamole. En el sector cárnico, las APH se emplean para los productos cárnicos cocidos o curados, por su capacidad para eliminar *Listeria monocytogenes* lo que permite su exportación a los países más exigentes en esta materia como EEUU y Japón,

entre otros. Las APH tienen un gran éxito en la extracción de la carne intacta de los crustáceos y la apertura de moluscos a la vez que elimina la bacteria patógena *Vibrio* spp.



Figura 17: Aplicación de las altas presiones hidrostáticas por sectores en la industria alimentaria. Adaptado de Tonello (2013).

Entre algunas de las aplicaciones más novedosas descritas para esta tecnología está la infusión de compuestos bioactivos en matrices vegetales para mejorar la calidad del producto. Algunos ejemplos son la infusión de cloruro cálcico para mejorar la textura de zanahoria o la infusión de ácido ascórbico en manzana para evitar el pardeamiento (Rastogi *et al.*, 2008, Vatankhah y Ramaswamy, 2019). Las APH también pueden emplearse para funcionalizar alimentos proporcionando efectos prebióticos, como ejemplo, el tratamiento por APH se empleó para mejorar la funcionalidad de la fibra dietética en Okara, un subproducto de soja (Mateos-Aparicio *et al.*, 2010). Se está estudiando el empleo de los tratamientos con APH como pre-tratamiento para mejorar la calidad de los productos obtenidos mediante procesos en los que tiene lugar una transferencia de masa como la congelación o liofilización.

Las APH se han encuadrado dentro de las llamadas “green technologies” o tecnologías ecológicas, reconocido por la FDA (Food and Drugs Administration) en los Estados Unidos ya que solo requiere energía eléctrica y agua y no genera residuos (Soquetta *et al.*, 2018). En este sentido cabe destacar que las APH se han empleado también como tecnología de extracción de compuestos bioactivos a partir de residuos o subproductos alimentarios lo que además podría ofrecer una ventaja medioambiental adicional (Duba y Fiori, 2015). Por último, la combinación de la APH con tendencias actuales de consumo de

productos orgánicos y productos naturales y libres de aditivos (clean label) puede servir para impulsar el desarrollo de esta tecnología en la industria alimentaria (Huang *et al.*, 2017).

3. DIGESTIÓN Y BIOACCESIBILIDAD.

3.1. Conceptos: digestión, bioaccesibilidad, biodisponibilidad y bioactividad.

La **digestión** es el proceso de transformación de los alimentos ingeridos en el tracto digestivo en unidades más sencillas, solubles y fáciles de absorber y cuya finalidad es obtener energía para el organismo y para la creación y reparación de los tejidos. La digestión puede dividirse en procesos mecánicos (movimientos peristálticos, trituración, contracción y relajación) y procesos químicos (acción de diversas enzimas, temperatura y pH) que marcan las principales diferencias entre las fases de digestión (oral, gástrica e intestinal) (Figura 18).

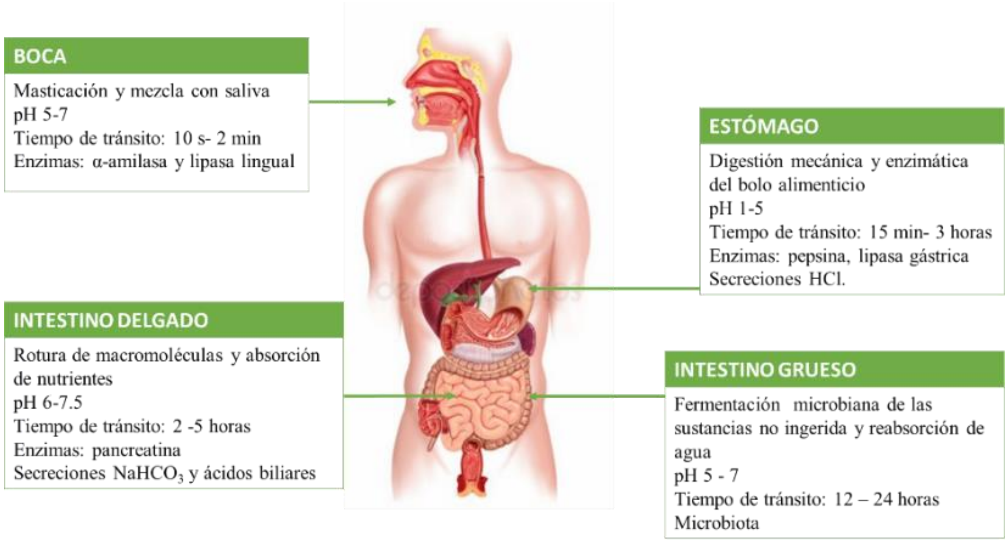


Figura 18: Condiciones físico-químicas del proceso de digestión. Adaptado de Guerra *et al.* (2012).

En la boca se produce la masticación/trituración del alimento y la mezcla con la saliva, que además de lubricar, contiene α-amilasa, una enzima implicada en la digestión del almidón, y lipasa lingual, que participa en la digestión de las grasas. En el estómago se lleva a cabo la digestión gástrica, etapa en la que actúa la pepsina, enzima responsable de

la digestión de proteínas, y las secreciones de ácido clorhídrico, que permiten la disminución del pH (de aproximadamente 6-5 hasta 1,5) necesaria para la hidrólisis proteica. En el estómago se producen movimientos de contracción y relajación que consiguen reducir el tamaño de los componentes de los alimentos y la mezcla con las secreciones gástricas formando lo que se conoce como quimo. El intestino delgado es el principal órgano para la digestión y absorción de nutrientes. En él se liberan jugos procedentes del páncreas que contienen pancreatina, una mezcla compleja de proteasas, amilasas y lipasas que llevarán a cabo la digestión de los macronutrientes (proteínas, hidratos de carbono y grasas). Las sales biliares procedentes del hígado y/o de la vesícula biliar que llegan al intestino actúan emulsionando la grasa en pequeñas gotas facilitando así la acción de la lipasa pancreática (Guerra *et al.*, 2012). La característica fundamental del intestino delgado es su gran superficie de absorción debido a la disposición de la mucosa en pliegues compuestos por vellosidades intestinales y la membrana apical del enterocito por microvellosidades (Figura 19) (Carlson, 2019). Los componentes no absorbidos llegan al intestino grueso (colon) cuyas principales funciones son la absorción de agua y electrolitos, la recuperación de las sales biliares, fermentación de los carbohidratos por la microbiota y la formación, almacenamiento y eliminación de las heces (Guerra *et al.*, 2012).

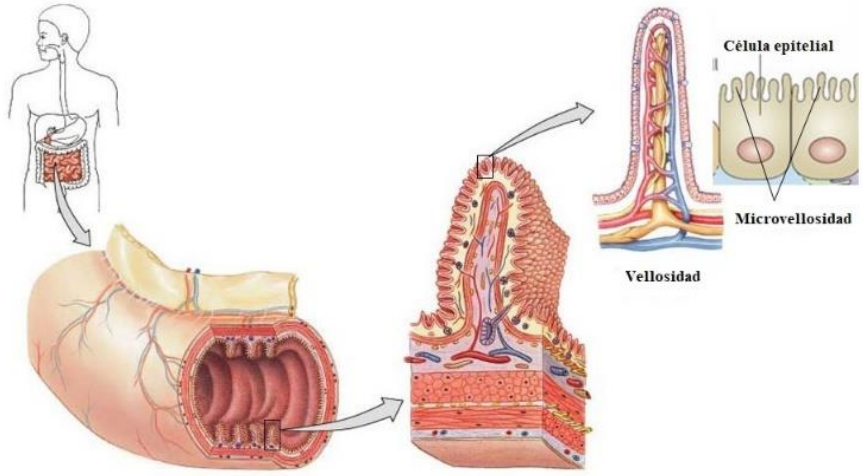


Figura 19: Características de la mucosa del intestino delgado. Fuente: *The Digestive System, http://slideplayer.com/slide/8126831/.*

La actividad biológica de un compuesto bioactivo viene determinada no sólo por la cantidad del mismo presente en el alimento, sino que es fundamental conocer su bioaccesibilidad y biodisponibilidad.

La **bioaccesibilidad** de un compuesto bioactivo es la fracción del mismo que se libera de la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal y está disponible para su absorción intestinal (Rein *et al.*, 2013). Algunos autores consideran que este concepto engloba la transformación del compuesto bioactivo durante la digestión en compuestos que puedan ser asimilados por el organismo, la absorción y asimilación a través del epitelio intestinal e incluso el metabolismo pre-sistémico (intestinal y hepático) (Fernández-García *et al.*, 2009, Carbonell-Capella *et al.*, 2014).

La bioaccesibilidad está relacionada con el concepto de **biodisponibilidad** (Figura 20) que puede definirse como la fracción de un compuesto que tras ser ingerido, digerido y absorbido a través de las paredes del intestino delgado pasa a la circulación sistémica y es utilizado por los tejidos para ejercer su función biológica. La biodisponibilidad por tanto incluye el estudio de la digestión gastrointestinal, absorción, metabolismo, distribución por los tejidos y bioactividad (Fernández-García *et al.*, 2009).

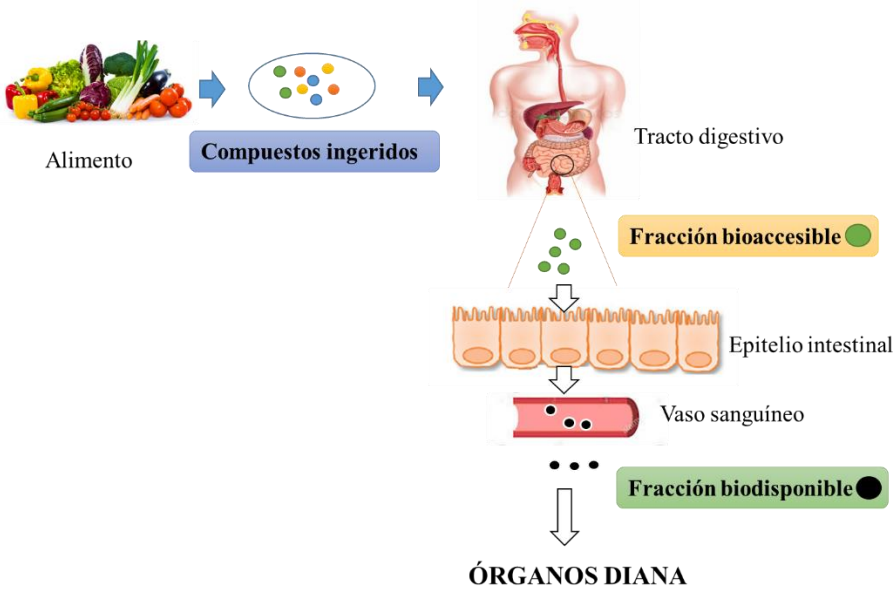


Figura 20: Relación entre fracción bioaccesible y fracción biodisponible. Adaptado de Guerra *et al.* (2012).

La **bioactividad**, por su parte, es la capacidad de un compuesto bioactivo de generar una respuesta fisiológica determinada. El concepto de bioactividad se relaciona con el transporte del compuesto al tejido diana, la interacción con otras moléculas, el metabolismo, la biotransformación, la generación de un marcador biológico y finalmente la respuesta fisiológica que causa (Fernández-García *et al.*, 2009).

3.2. Digestión, absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos.

La absorción y metabolismo de los compuestos fenólicos (CF) está condicionada por sus propiedades físico-químicas como la hidrosolubilidad o liposolubilidad, el peso molecular, la estructura química, el grado de polimerización o glicosilación, o la conjugación con otros fenoles. En los alimentos, los CF suelen encontrarse en forma glicosilada, esterificada o formando polímeros. Para ser absorbidos, los CF en su forma glicosilada, deben ser hidrolizados con el fin de liberar la aglicona. Esta hidrólisis generalmente ocurre en el intestino delgado, pero puede iniciarse en la cavidad oral por la acción de la enzima β-glucosidasa de la saliva o de la microbiota oral (Cueva *et al.*, 2020). La hidrólisis de los CF también puede ocurrir en el intestino grueso dependiendo de la complejidad de la molécula y el tipo de azúcar que lo forma.

Algunos monoglicósidos, como la quercetina-3-*O*-glucósido, pueden ser hidrolizados en el epitelio del intestino delgado por la enzima lactasa-florizin hidrolasa, liberando la aglicona que puede pasar al enterocito por difusión pasiva debido a su mayor lipofilicidad. Sin embargo, algunos estudios indican la posibilidad de un transporte activo hacia las células epiteliales de determinados glicósidos como quercetina-4'-*O*-glucósido por la acción de un transportador de glucosa dependiente de sodio (SGLT1) y la posterior hidrólisis de éstos en las células por acción de una β-glucosidasa citosólica (CBG) (Crozier *et al.*, 2010).

La mayoría de los flavan-3-oles pasan inalterados al intestino grueso donde se metabolizan por la acción de la microbiota colónica. Algunos monómeros pueden ser absorbidos por los enterocitos del intestino delgado sin hidrólisis previa. Los compuestos de esta familia de mayor peso molecular como las proantocianidinas poliméricas no pueden ser absorbidas en el intestino delgado pero las oligoméricas podrían hacerlo si sufren una degradación previa a compuestos de menor peso molecular (Zhang *et al.*, 2016).

Los ácidos fenólicos pueden ser absorbidos en la parte superior del tracto digestivo si están en su forma de aglicona, de hecho, el estómago es un sitio de absorción activa para ácidos fenólicos como el gálico, cafeico y ferúlico. Sin embargo, los ácidos hidroxicinámicos que generalmente se encuentran esterificados con azúcares, ácidos orgánicos y lípidos presentan un nivel bajo de absorción porque las enzimas intestinales son menos eficaces para hidrolizar los enlaces éster. Por tanto, estos compuestos son

metabolizados en mayor medida en el colon por la acción de la microbiota (Lafay y Gil-Izquierdo, 2007).

Los CF absorbidos a nivel del intestino delgado interactúan con las enzimas de fase II, catecol-*O*-metiltransferasas (COMT), uridin-5'-difosfato glucuronosiltransferasas (UGTs) y sulfotransferasas (SULT) en el propio enterocito y posteriormente en el hígado y en los tejidos periféricos (Figura 21). Como resultado de esta interacción se producen metabolitos conjugados (glucurónidos, sulfatos y derivados metilados) que pasan a circular en el plasma sanguíneo. Generalmente, no se encuentran agliconas de los CF circulando por la sangre excepto algunas catequinas e isoflavonas. La formación de derivados metilados y glucurónidos tiene lugar en las células intestinales y en el hígado mientras que la sulfatación se produce principalmente en el hígado. Después de las transformaciones, los derivados conjugados pueden regresar al intestino delgado mediante un transporte enterohepático vía biliar pudiendo ser reabsorbidos (Figura 21) (Lewandowska *et al.*, 2013).

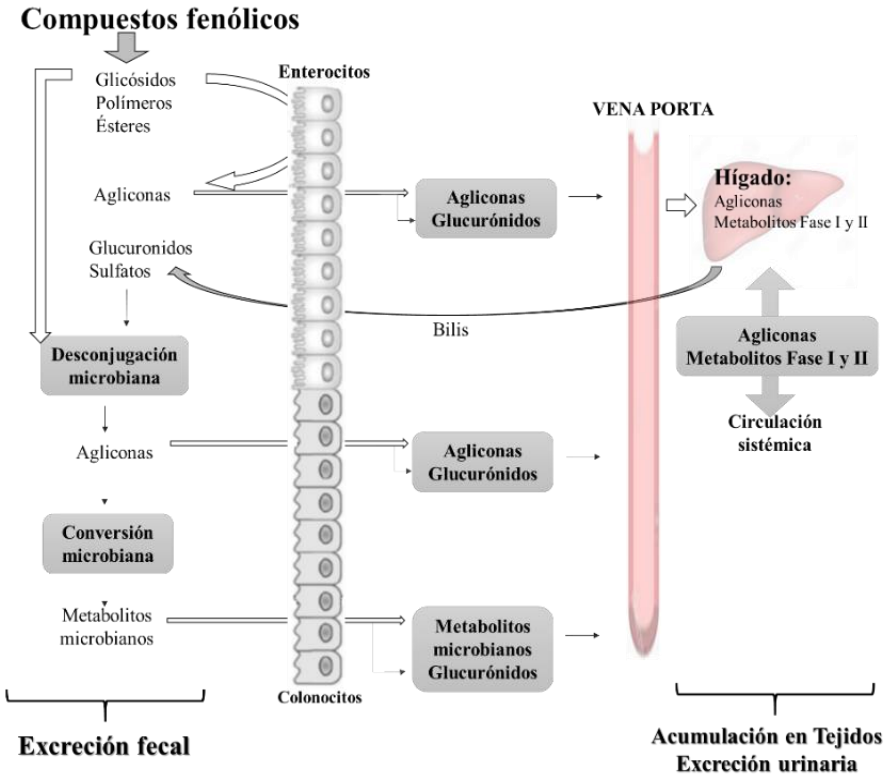


Figura 21: Metabolismo de los compuestos fenólicos. Adaptado de Kemperman *et al.* (2010).

Los CF que no son absorbidos a nivel del intestino delgado, que se estima sean hasta el 90-95% del total ingerido, y las formas conjugadas que llegan por el sistema biliar, alcanzan el intestino grueso. Diversos mecanismos de acción de las enzimas microbianas como deshidroxilación, desmetilación, descaboxilación, hidrólisis de los metabolitos conjugados (glucurónidos, sulfatos y metilados) transforman los compuestos fenólicos en metabolitos de bajo peso molecular (Cardona *et al.*, 2013).

Estos metabolitos pueden ser absorbidos y transportados vía vena porta hasta el hígado, donde serán sometidos al metabolismo de fase II y ser posteriormente distribuidos por la circulación sistémica a los tejidos periféricos o ser excretados por los riñones (Lewandowska *et al.*, 2013) (Figura 21). El metabolismo descrito hace que la concentración final de los CF conjugados y sus metabolitos en el plasma humano sea del orden de micro- o nanomolar a las pocas horas de la ingesta y se reduzca por debajo de los niveles de detección después de 24 horas (Kawabata *et al.*, 2019).

3.3. Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos.

La bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos (CF) puede verse afectada por factores propios del proceso de digestión oral-gastrointestinal. Una vez liberados de la matriz alimentaria, los CF pueden sufrir diferentes cambios estructurales por la influencia de diversos factores físico-químicos (pH, actividades enzimáticas, temperatura) y mecánicos (trituración, mezcla) y, por ende, cambios en la bioaccesibilidad. Además, dependiendo de su estructura química, los CF pueden ser parcialmente absorbidos en el intestino delgado (se ha estimado que de un 5-10% de los compuestos ingeridos) y los no absorbidos pueden alcanzar el colon sin apenas modificaciones (Clifford, 2004).

Otros factores pueden influir (positiva o negativamente) en la bioaccesibilidad de los CF son por un lado la matriz alimentaria en la que se encuentra inmerso el compuesto fenólico y, por otro lado, el tipo de procesado al que se someta a dicho alimento (Bohn, 2014, Ribas-Agusti *et al.*, 2018). Los CF pueden interaccionar con otros constituyentes de la matriz alimentaria durante la digestión gastrointestinal y modificar su liberación y solubilización. Algunos CF se encuentran fuertemente unidos a los carbohidratos de las paredes celulares (pectinas, celulosas y fibra dietética) lo que puede dificultar su extracción durante el proceso de digestión (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014). Otros en cambio, se encuentran en las vacuolas de las células vegetales y su interacción con los carbohidratos

se da cuando la matriz es alterada durante el procesado o la masticación (Jakobek, 2015, Ribas-Agusti *et al.*, 2018). Además, la fibra dietética influye en el tiempo del tránsito intestinal por el aumento de la viscosidad y el volumen del digerido lo que puede influenciar la absorción de los CF (Bohn, 2014). Los CF unidos a carbohidratos pueden llegar directamente al intestino grueso donde por acción de diversas enzimas son liberados y metabolizados por la microbiota intestinal (Jakobek, 2015).

La presencia de proteínas y grasas, en la propia matriz o en otros alimentos presentes en la dieta, también pueden influir en la bioaccesibilidad de los CF. Se ha observado que los CF con un mayor peso molecular, mayor número de grupos hidroxilo y una mayor flexibilidad estructural presentan una mayor capacidad para unirse a proteínas. Por otro lado, las proteínas con un mayor contenido en prolina también tendrán más posibilidad de unirse a estos compuestos. Estas interacciones son principalmente interacciones hidrófobas no covalentes y tienden a romperse por la acción de enzimas digestivas y el pH gástrico (Ribas-Agusti *et al.*, 2018). La presencia de lípidos parece influir en menor medida en la absorción de los CF a excepción de los casos en los que se ha visto que éstos quedan atrapados en pequeñas gotas de grasa lo que favorecería su posterior absorción (Jakobek, 2015).

El procesado de los alimentos puede utilizarse como una estrategia para aumentar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de estos compuestos. Para ello, se deben cumplir dos requisitos, por un lado, el procesado debe minimizar la degradación de los CF y por otro lado debe inducir cambios en la matriz alimentaria que favorezcan la liberación de los mismos durante la digestión gastrointestinal (Ribas-Agusti *et al.*, 2018). En este sentido, las tecnologías de procesado no térmicas como las altas presiones hidrostáticas adquieren una atención especial ya que por un lado no afectan o afectan de forma mínima al contenido de CF y por otro, inducen cambios sobre la matriz alimentaria como la rotura de las estructuras celulares lo que podría permitir la liberación de los CF al espacio extracelular y por tanto aumentar la bioaccesibilidad de los mismos (Balasubramaniam *et al.*, 2016). Otras técnicas de procesado de alimentos como la trituración o molienda, el secado o la liofilización pueden afectar a la bioaccesibilidad de los CF por la disrupción de las paredes celulares de los tejidos vegetales, la disminución del tamaño de las partículas y la disociación de los complejos nutriente-matriz (Ribas-Agusti *et al.*, 2018).

Por tanto, conocer el efecto de la digestión oral-gastrointestinal seguido de un proceso de fermentación colónica sobre la estabilidad, bioaccesibilidad y

biotransformación de los CF es un primer paso imprescindible para determinar el grado de actividad biológica de los mismos. Para ello se han desarrollado modelos de digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro* que simulan todas las fases de la digestión y permiten estudiar la bioccesibilidad de los CF de forma más rápida y económica, así como la biotransformación de estos compuestos debido a la acción de la microbiota intestinal (Verhoeckx *et al.*, 2015).

3.4. Modelos de digestión gastrointestinal.

La digestión gastrointestinal puede evaluarse a través de diferentes modelos *in vitro* estáticos y dinámicos, modelos *in vivo* humanos y animales, modelos *in silico* y modelos *ex vivo*. Aunque los estudios *in vivo*, como los estudios de intervención con humanos, permiten obtener una información más específica sobre la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de un compuesto, a menudo resultan muy costosos y complejos. Por esta razón, se han desarrollado diversos modelos *in vitro* que permiten una mayor rapidez en la obtención de resultados, un ahorro de costes frente a los métodos *in vivo* y una mayor reproducibilidad de las complejas condiciones físico-químicas y fisiológicas del tracto gastrointestinal (Verhoeckx *et al.*, 2015).

Los modelos *in silico* son modelos matemáticos y softwares que simulan las condiciones digestivas utilizando datos obtenidos mediante estudios *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*. En los modelos *ex vivo* se utilizan muestras de tejidos de animales (Lefebvre *et al.*, 2015). Los modelos más utilizados para evaluar los efectos de la digestión sobre los compuestos fenólicos son los modelos *in vivo* e *in vitro*:

Modelos *in vivo*: Los modelos *in vivo* se han llevado a cabo tanto en humanos (balance químico o empleo de isótopos) como en modelos animales. Los estudios *in vivo* permiten determinar de forma indirecta, la cantidad absorbida de un nutriente o compuesto bioactivo analizando la diferencia entre la cantidad ingerida y excretada (orina y heces) o la concentración de estos compuestos o sus metabolitos en los tejidos mediante el análisis de su contenido en suero o plasma. Aunque los modelos *in vivo* permiten una mejor estimación de la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos, pueden presentar una serie de limitaciones como un coste más elevado, una mayor complejidad y una serie de limitaciones éticas. En ocasiones, la extrapolación de los resultados de estudios *in vivo* con animales al metabolismo humano resulta complejo por las diferencias que puedan existir

con el metabolismo del propio animal. Además, los modelos *in vivo* no permiten analizar el impacto de cada fase de la digestión en la liberación y disponibilidad de los compuestos y en su bioaccesibilidad (Alminger *et al.*, 2014, Carbonell-Capella *et al.*, 2014). Gran parte de los compuestos sufren modificaciones a lo largo del proceso de digestión, absorción y distribución, por lo que las formas encontradas en sangre pueden ser diferentes a la forma original, lo que dificultaría su identificación mediante estos modelos *in vivo* (Fernández-García *et al.*, 2009).

Modelos *in vitro*: Los modelos *in vitro* han sido ampliamente utilizados para reproducir las condiciones de digestión gastrointestinal. Las ventajas de estos modelos son una mayor sencillez, rapidez y control de las distintas variables experimentales. Los modelos *in vitro* permiten evaluar la digestibilidad, la liberación de los compuestos presentes en los alimentos durante las diversas fases de digestión gastrointestinal, las interacciones con otros componentes del alimento (fibra o grasas) y cómo todo esto afecta a la eficacia global de la digestión y a la bioaccesibilidad de los mismos (Fernández-García *et al.*, 2009). Los modelos *in vitro* pueden operar de manera estática (modelos estáticos) o dinámica (modelos dinámicos). A continuación, se detallan las principales diferencias entre estos modelos:

Modelos estáticos: Los modelos estáticos utilizan técnicas simples que incluyen dos o tres fases de digestión (oral, gástrica e intestinal) y cuyos productos permanecen inmóviles en un mismo reactor estático (generalmente un baño termostatizado). La simplicidad es la principal ventaja de este modelo lo que permite llevar a cabo la digestión de muestras en paralelo. Sin embargo, estos modelos simulan un número limitado de parámetros de digestión como pH, temperatura, concentración de enzimas y sales biliares y no reproducen parámetros tan importantes como la hidratación, mezcla, cizallamiento, cambios de los parámetros a lo largo del tiempo, movimientos peristálticos, vaciado gástrico, tránsito intestinal, etc. (Verhoeckx *et al.*, 2015). En cada una de las fases (oral, gástrica e intestinal), el producto alimenticio se incuba durante un tiempo específico con saliva artificial y fluidos digestivos (gástrico e intestinal), compuestos por una serie de electrolitos y soluciones enzimáticas. La temperatura se mantiene a 37 ºC y el pH se fija al inicio de cada fase.

Modelos dinámicos: A diferencia de los modelos estáticos, el modelo dinámico permite simular los continuos cambios en los parámetros físico-químicos como las variaciones en el pH, las secreciones gástricas e intestinales o el mantenimiento de la

temperatura que ocurren durante el proceso de digestión gastrointestinal. También controla parámetros mecánicos como los movimientos peristálticos y el control del tránsito y vaciado.

Dentro de los modelos dinámicos, se han desarrollado modelos mono-compartimentados que incluye un único tramo o reactor (principalmente modelos de digestión gástrica) o modelos multi-compartimentados que incluyen varios reactores (que simulan tanto estómago como intestino delgado). Los modelos mono-compartimentados solventan algunos de los principales inconvenientes de los sistemas estáticos como la regulación del pH, el flujo progresivo de enzimas o la regulación del vaciado gástrico. Sin embargo, estos modelos están limitados al estudio de una única fase de digestión gastrointestinal. Ejemplos de modelos mono-compartimentados son por un lado el modelo de digestión gástrica (DGM) desarrollado por el Institute of Food Research (Norwich, Reino Unido) y el simulador gástrico humano (HGS) (Figura 22) desarrollado en la Universidad California-Davis (Alminger *et al.*, 2014).

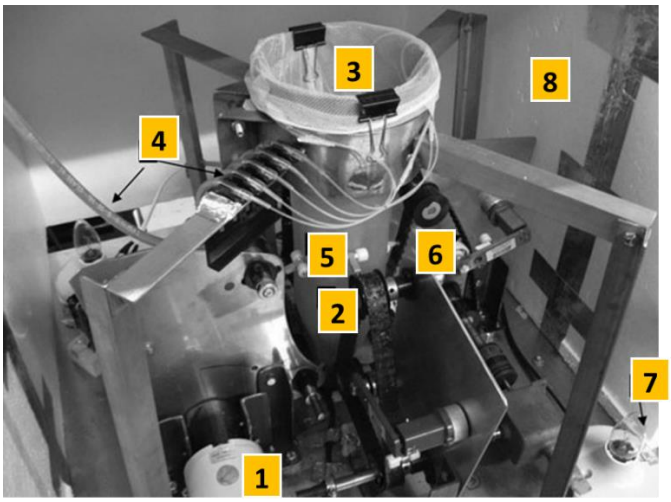


Figura 22: Modelo HGS. (1) Motor; (2) Revestimiento de látex; (3) Bolsa de malla; (4) Conductos para las distintas secreciones; (5) Rodillo; (6) Cadena; (7) Bombilla para el control de la temperatura; (8) Sistema de aislamiento. Fuente: Verhoeckx *et al.* (2015).

Los modelos multi-compartimentados permiten una simulación del proceso de digestión gastrointestinal más cercano a las condiciones *in vivo*. Simulan las condiciones de digestión en el estómago e intestino delgado. Estos modelos están controlados mediante un sistema informático que regula los cambios de pH y permiten programar la duración de las fases, los tiempos de llenado, tránsito y vaciado y las distintas secreciones (pepsina,

pancreatina y/o ácidos biliares). El pH de cada fase (gástrica e intestinal) se controla mediante la adición controlada de ácido (ácido clorhídrico) o base (bicarbonato sódico) hasta valores preestablecidos, para ello algunos modelos incorporan sensores de pH. Las distintas secreciones enzimáticas se añaden de forma secuenciada y programada, simulando así las distintas etapas de la digestión. El modelo reproduce los movimientos peristálticos y de mezcla a través de diversos mecanismos como por ejemplo cambios de presión del agua que circula entre la pared externa (de metacrilato, generalmente) y la pared del propio reactor, que en el caso del reactor gástrico es flexible. Además, el control de la temperatura del agua permite mantener la temperatura en todo el sistema a 37 ºC. El llenado, tránsito y vaciado del digerido entre los reactores se lleva a cabo mediante la apertura y cierre de distintas válvulas. Los modelos que presentan una alineación vertical de los reactores suelen incluir un sistema de agitación para prevenir la sedimentación de partículas en el fondo por acción de la gravedad. Otros modelos solventan el problema de la sedimentación con la alineación horizontal de los reactores. Algunos modelos mantienen las condiciones anaeróbicas mediante el burbujeo con gas nitrógeno (Alminger *et al.*, 2014, Verhoeckx *et al.*, 2015).

La mayor parte de estos modelos no incluyen un simulador de la masticación que adquiere una gran importancia sobre todo en alimentos sólidos. La digestión oral se suele realizar como un paso previo a la digestión gastrointestinal y consiste básicamente en mezclar el alimento con soluciones que simulan la saliva y que contienen α-amilasa y electrolitos durante un corto periodo de tiempo. En algunas ocasiones se utilizan equipos que tratan de simular la masticación.

El modelo TIM-1 (TNO gastro-Intestinal Model 1) (Figura 23) desarrollado por el TNO (The Netherlands Organisation for applied scientific research, Holanda) o el modelo DIDGI® desarrollado en el INRA (French National Institute for Agricultural Research) son dos tipos de modelos multi-compartimentados de digestión gastrointestinal. En el caso del TIM-1, 4 reactores simulan el estómago y las tres partes del intestino delgado (duodeno, yeyuno, íleon) (Verhoeckx *et al.*, 2015).



Figura 23: Modelo TIM-1. Fuente: *http://www.agfdt.de/loads/st06/havenabb.pdf.*

En España también contamos con modelos que simulan la digestión gastrointestinal de características similares a las de TIM-1 como el simgi® desarrollado por el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC) y el modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal desarrollado por el Centro Tecnológico AINIA en Valencia (España) (Figura 24).



Figura 24: Modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal del Centro Tecnológico AINIA. Fuente: https://www.ainia.es/

3.5. Obtención de la fracción bioaccesible.

Los métodos descritos para la obtención de la fracción bioaccesible son fundamentalmente dos, la diálisis y la centrifugación. El proceso de diálisis intenta simular el paso de los compuestos fenólicos por la barrera epitelial tras la digestión utilizando una membrana con un determinado tamaño de poro (14000 daltons) (Gil-Izquierdo *et al.*, 2002). Algunos de los factores a tener en cuenta en este método son el volumen y la composición del tampón empleado, la concentración de azúcares en la muestra o la habilidad de otros compuestos para unirse a la membrana (Bermúdez-Soto *et al.*, 2007).

En el caso de la centrifugación, tras finalizar el proceso de digestión gastrointestinal, el digerido es sometido a un proceso de centrifugación a baja velocidad, tras el cual se obtiene un sobrenadante que recogería los compuestos bioaccesibles en el intestino delgado y los compuestos presentes en el residuo constituirían la fracción no bioaccesible. Algunos estudios complementan la centrifugación con una posterior filtración del sobrenadante (Dinnella *et al.*, 2007).

4. FERMENTACIÓN COLÓNICA.

El proceso de fermentación colónica es el proceso metabólico por el cual los componentes de los alimentos que no han sido absorbidos y que llegan al colon van a sufrir un proceso de metabolización por parte de la microbiota. Los conocimientos actuales sobre las funciones de la microbiota intestinal justifican su consideración como un órgano metabólico con funciones en la nutrición, la regulación de la inmunidad y de la inflamación sistémica (Gomes *et al.*, 2018).

4.1. La microbiota intestinal.

Composición de la microbiota. Del conjunto de microorganismos que forman la microbiota humana, el tracto gastrointestinal alberga el ecosistema más complejo y abundante del cuerpo humano y en concreto el colon posee la concentración más alta (10^{12} células/g) (Tinahones, 2017, Valdes *et al.*, 2018). En una persona adulta, el tracto gastrointestinal puede albergar más de 1000 especies de microorganismos, siendo las bacterias de los filos *Bacteroidetes* (25%) y *Firmicutes* (60%) los mayoritarios (Tabla 5).

En menor proporción se detectan *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* y *Spirochaetes.* Es importante tener una proporción equilibrada de los dos tipos mayoritarios, y por ello se ha establecido la ratio Firmicutes/Bacteroidetes como un parámetro para evaluar el equilibrio de la microbiota intestinal, y su funcionalidad. Por ejemplo, las personas obesas y los ancianos presentan alterado esta ratio a favor del aumento de los Firmicutes (Gomes *et al.*, 2018).

Tabla 5: Clasificación de las bacterias intestinales.

Filo	***Firmicutes***	***Bacteroidetes* (dominio bacteria)**	***Bacteroidetes***	**Actinobacteria**
Clase	*Clostridios*	*Bacteroidia*	*Bacteroidetes*	Actinobacteria
Orden	*Clostridiales*	*Bacteroidales*	*Bacteroidales*	*Bifidobacteriales*
Familia	*Ruminococcaceae*	*Bacteroidaceae*	*Prevotellaceae*	*Bifidobacteriaceae*
Género	*Ruminococcus*	*Bacteroides*	*Prevotella*	*Bifidobacterium*
Anaerobio/ Aerobio	Anaerobios	Anaerobios (aerotolerantes)	Anaerobios	Anaerobios
Gram	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
Otras características	*Lactobacillus:casei,paracasei, rhamnosus* (aerotolerantes)	*B.faecis, B.fragilis* (implicado en la resistencia a antiobioticos), *B.intestinalis*, etc.	Predominante en la microbiota de dietas ricas en vegetales y baja en proteínas y grasa.	*B. bifidum, B.breve, B.infantis, B.lactis, B.suis, B.thermacidophilum, B.thermophilum*

Fuente: Hervert-Hernández y Goñi (2011).

Los Firmicutes son los más abundantes y dentro de este filo se engloban más de 250 géneros (entre ellos *Lactobacillus*, *Mycoplasma*, *Bacillus* y *Clostridium*). En general, la mayoría de las bacterias de la microbiota intestinal pertenecen a los géneros *Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium, Eubacterium, Ruminococcus, Peptococcus, Peptostreptococcus y Bifidobacterium*. Las bacterias de los géneros *Escherichia y Lactobacillus* están presentes en menor medida. Las especies del género *Bacteroides* constituyen aproximadamente el 30% de todas las bacterias del intestino, por lo que este género es especialmente importante en el funcionamiento del hospedador. Existen otros microorganismos que pertenecen a los filos menos abundantes pero que pueden tener una gran influencia en el mantenimiento de la salud como las bifidobacterias, pertenecientes a los *Actinomycetes* y que constituyen entre el 3% y 5% de la microbiota presente en el

colon, pero de gran importancia al ser considerados probióticos (Hernández Hernández *et al.*, 2015).

Funcionalidad de la microbiota. En condiciones normales, la microbiota intestinal desempeña multitud de funciones metabólicas como la hidrólisis o degradación de nutrientes no digeridos (carbohidratos, proteínas y lípidos). A través de este proceso se obtiene energía y nutrientes tanto para los propios microorganismos como para el hospedador. La fermentación de los carbohidratos (almidón, celulosa, hemicelulosa, inulina, oligosacáridos, azúcares y alcoholes no absorbidos) fundamentalmente, da lugar a la formación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el ácido acético, propiónico y butírico que presentan un papel fisiológico importante. El ácido butírico es la principal fuente de energía de los colonocitos, puede inducir la apoptosis de las células colónicas cancerosas y puede activar la gluconeogénesis a nivel intestinal. El propiónico es transferido al hígado donde participa en la regulación de la gluconeogénesis y en los mecanismos de la saciedad. El ácido acético, el más abundante, es esencial para el crecimiento de otras bacterias, y además puede alcanzar los tejidos periféricos donde participa en el metabolismo del colesterol y en la lipogénesis, responsable de hasta el 10% de la energía que absorbe el cuerpo humano y, además, juega un papel fundamental en la regulación del apetito (Valdes *et al.*, 2015). También la presencia de los AGCC en el colon y en el huésped se ha relacionado con procesos de inmunorregulación (Morrison y Preston, 2016).

El metabolismo microbiano de los componentes no digeribles de la dieta también da lugar a la formación de etanol y ácido láctico que junto con los AGCC ayudan a la acidificación del colon (pH 5,5-5,9), favoreciendo así la absorción de otros oligoelementos como el hierro, calcio y magnesio, y mejorando la biodisponibilidad del zinc, cobre y fósforo. La microbiota también participa en la síntesis de las vitaminas K, B12, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico. La capacidad metabólica de estos microorganismos incluye también la eliminación de compuestos tóxicos como determinadas sustancias carcinogénicas y/o mutagénicas. La microbiota presenta también una importante función inmunomoduladora ya que estimula el sistema inmune y ayuda en el desarrollo y proliferación celular, además de una función protectora frente a la colonización de patógenos y oportunistas (Tinahones, 2017). En cambio, el desequilibrio en la diversidad o funcionalidad de la microbiota (denominado como disbiosis) se asocia con la aparición o riesgo de diversas enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal, colon

irritable, cáncer colorrectal, obesidad, diabetes, síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular y enfermedades neurodegenerativas, entre otras (Espín *et al.*, 2017).

Dieta y microbiota. La composición de la microbiota evoluciona a lo largo de la vida y varía en función de factores genéticos, el entorno y la dieta. Los hábitos alimentarios tienen un importante efecto sobre la composición de la microbiota lo que a su vez puede traducirse en importantes efectos en la salud. De hecho, se han observado que dietas ricas en alimentos vegetales y fibra en comparación con una dieta típica occidental incrementan la población de *Bacteroidetes* (principalmente *Prevotella* y *Xylanibacter*), que son capaces de hidrolizar los polisacáridos presentes en los vegetales, y disminuyen la de *Firmicutes* observándose también una disminución de enterobacterias. Otros estudios han llegado a la conclusión de que el enterotipo *Bacteroides* se asocia con las dietas ricas en proteínas y grasas animales mientras que el enterotipo *Prevotella* se relaciona con dietas ricas en carbohidratos (Figura 25).

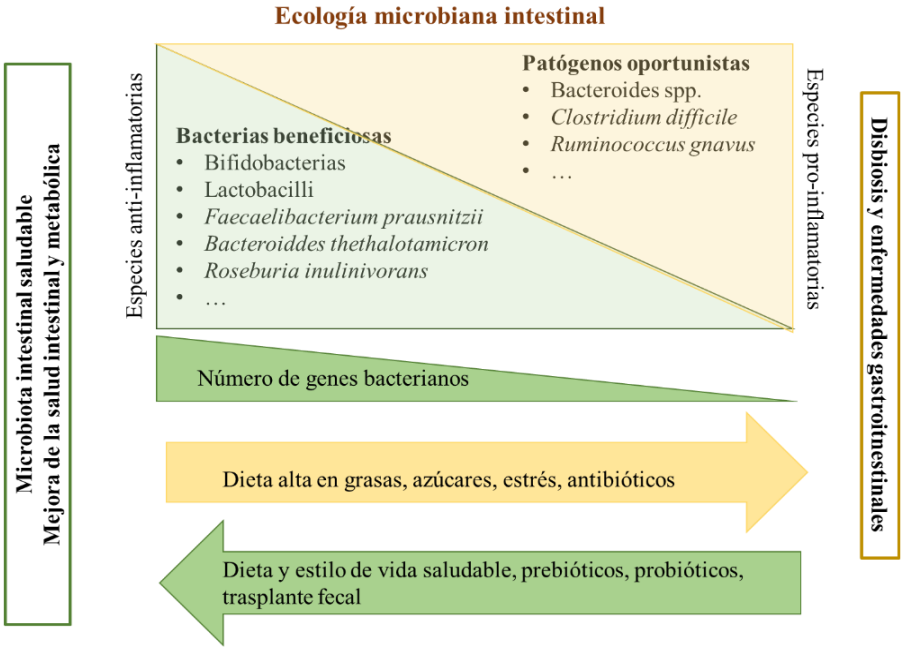


Figura 25: Efecto en la salud intestinal y metabólica del hospeador de una microbiota intestinal saludable *vs*. disbiosis. Adaptado de Tamargo *et al.* (2017).

4.2. Microbiota y compuestos fenólicos.

En relación a los compuestos fenólicos (CF), numerosos estudios han puesto de manifiesto el papel fundamental de la microbiota en la bioactividad de estos compuestos (Valdes *et al.*, 2015). Gran parte de los CF ingeridos no serán absorbidos a nivel de

intestino delgado y pasan directamente al colon convirtiéndose en substratos fermentables por la microbiota. En el metabolismo de los CF solo están implicadas unas pocas especies bacterianas (p. ej. *Escherichia coli*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp.) (Cardona *et al.*, 2013).

Diversos estudios han señalado que la relación existente entre los CF y la microbiota es una relación bidireccional. Por un lado, la microbiota colónica juega un papel fundamental en la transformación de los CF dando lugar a metabolitos de menor tamaño, generalmente más biodisponibles y con importantes efectos biológicos (Selma *et al.*, 2009). Por otro lado, los CF y sus metabolitos han mostrado efectos positivos sobre la modulación de la microbiota intestinal, estimulando el crecimiento de bacterias beneficiosas (efecto prebiótico) e inhibiendo el de microorganismos patógenos (actividad antimicrobiana) (Cardona *et al.*, 2013).

La microbiota presenta un amplio y variado rango de actividades enzimáticas que hacen posible la transformación de los compuestos que alcanzan el colon. En el caso de los CF, una de las primeras transformaciones es la liberación de las agliconas a través de distintas reacciones de desconjugación de la molécula asociada (azúcares o ácidos orgánicos) o la rotura de los compuestos poliméricos hasta sus correspondientes monómeros. Algunas de las enzimas implicadas en estas reacciones son α-ramnosidasas, β-glucosidasas y β-glucuronidasas (Selma *et al.*, 2009). Posteriormente, las agliconas liberadas sufren otras transformaciones que incluyen la rotura del anillo C, oxidaciones y diversas reacciones enzimáticas o divisiones de los grupos funcionales (deshidroxilación, desmetilación, descarboxilación, hidrólisis, isomerizaciones, …) (Mosele *et al.*, 2015).

Los flavonoides son ampliamente transformados por la microbiota hasta compuestos aromáticos hidroxilados y ácidos fenólicos que se forman a partir del anillo A y B tras la rotura del anillo C (Figura 26) (Selma *et al.*, 2009).

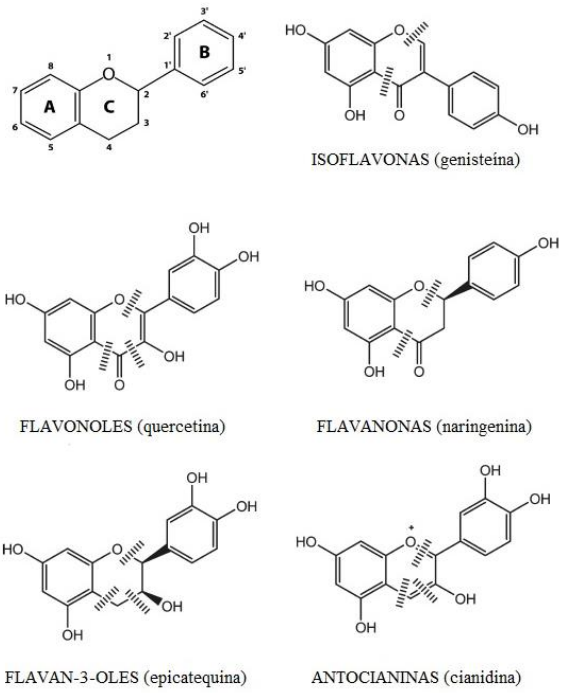


Figura 26: Posibles rotura del anillo C de los flavonoides por la microbiota. Adaptado de Selma *et al.* (2009).

A partir de los flavonoles se forman principalmente ácidos fenilacéticos, las flavonas y flavanonas se degradan en ácidos cinámicos y fenilpropiónicos, y los flavan-3-oles dan lugar principalmente a fenil-γ-valerolactonas, ácidos fenilvaléricos y ácidos fenilpropiónicos. Los flavonoles dan lugar principalmente a ácidos di- y mono-hidroxifenilacéticos. Finalmente, todos estos metabolitos pueden ser transformados en derivados del ácido benzoico (Selma *et al.*, 2009, Mosele *et al.*, 2015) (Figura 27).

Los ácidos fenólicos como los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos, sufren inicialmente distintas reacciones de deshidroxilación, deshidrogenación o hidrólisis de los ésteres lo que da lugar a la formación de ácidos di- e hidroxifenilpropiónicos como metabolitos principales (Ozdal *et al.*, 2016). Posteriormente estos metabolitos pueden ser transformados en derivados del ácido benzoico (Figura 27) (Mosele *et al.*, 2015).

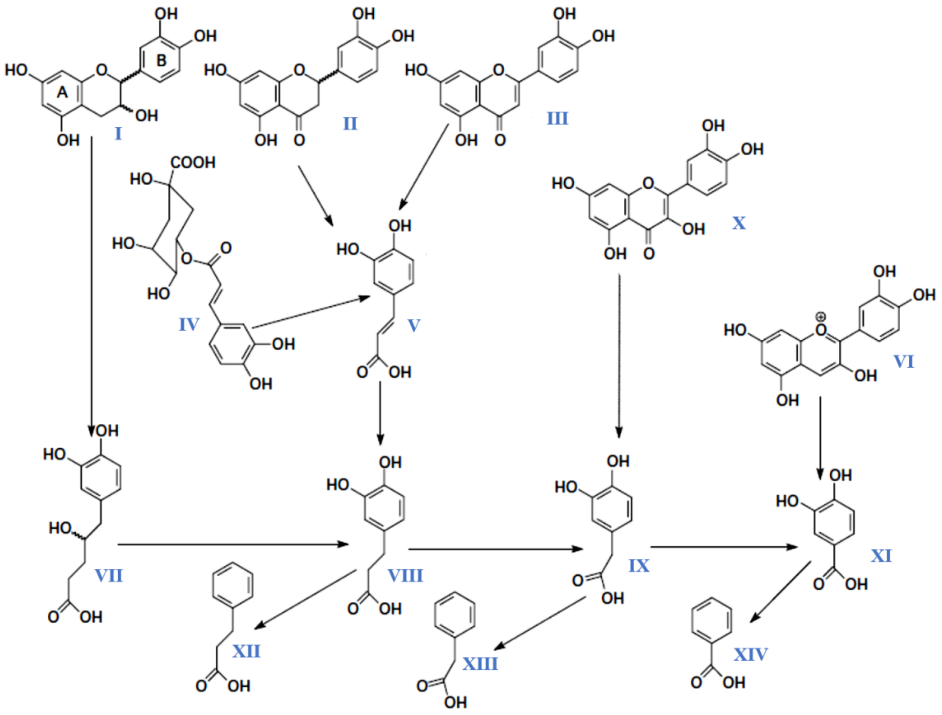


Figura 27: Estructuras de compuestos fenólicos y de sus catabolitos microbianos representativos. A y B indican el anillo A y B, respectivamente. Se muestran las estructuras típicas para los flavan-3-oles (catequina) (I); flavanonas (II); flavonas (III); ácido clorogénico (conjugados cinámicos) (IV); ácidos cinámicos (C_6–C_3) (V); antocianos (VI); ácidos fenilvaléricos (C_6–C_5-γ-OH) (VII); ácidos fenilpropiónicos (C_6–C_3) (VIII, XII); ácidos fenilacéticos (C_6–C_2) (IX, XIII); flavonoles (X); ácidos benzoicos (XI, XIV). Adaptado de Williamson y Clifford (2010).

Los metabolitos de los CF adquieren una gran importancia en términos de salud ya que estos aparecen en plasma y son excretados por la orina y pueden por tanto mostrar efectos a nivel local y sistémico (Espín *et al.*, 2017). Las funciones fisiológicas de los metabolitos pueden ser diferentes a las mostradas por los compuestos originales. De hecho, la estructura química de la molécula activa puede ser completamente diferente a la del compuesto inicial. Algunos de los efectos sobre la salud asociados a los metabolitos de los CF son sus propiedades antiinflamatorias, efectos beneficiosos sobre el síndrome metabólico y efectos protectores sobre el desarrollo del cáncer (colorrectal fundamentalmente) y sobre la enfermedad inflamatoria intestinal (Cardona *et al.*, 2013, Kawabata *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos y sus metabolitos pueden actuar como prebióticos atendiendo a la siguiente definición: *"Un prebiótico es un compuesto no-digerible que, a través de su metabolización por los microorganismos del colon, modula la composición*

y/o actividad de la microbiota colónica, y esto confiere un efecto fisiológico beneficioso en el hospeador" (Espín *et al.*, 2017). El efecto prebiótico de estos compuestos se ha mostrado en diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* en los cuales se describe su influencia en el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias y otras especies saludables como es el caso de *Akkermansia* (Espín *et al.*, 2017) y el efecto antibacteriano sobre determinados microorganismos perjudiciales como bacterias del género *Clostridum* spp. (Selma *et al.*, 2009). Los mecanismos por los cuales los CF y sus metabolitos actúan modulando la microbiota no se han descrito del todo, aunque podrían incluir interferencias con la expresión y actividad de determinadas enzimas, cambios en las características del medio presente en el colon, cambios en la modulación de las rutas de señalización responsables de los efectos pro-oxidantes, inflamatorios y carcinogénicos y protección del epitelio intestinal de las sustancias tóxicas (Mosele *et al.*, 2015).

Por otro lado, determinados flavonoides y ácidos fenólicos han mostrado un efecto positivo sobre el aumento de la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) al promover el crecimiento de las bacterias productoras de los mismos como *Bifidobacterium* spp. y *Akkermansia muciniphila* o al activar la función metabólica de estas bacterias (Kawabata *et al.*, 2019).

En definitiva, el estudio de los beneficios de la ingesta de CF no sólo puede centrarse en determinar su contenido en los alimentos ya que, como se ha descrito, la digestión gastrointestinal y su biotransformación por la microbiota intestinal juega un papel fundamental en el metabolismo y bioactividad de los CF. Es por tanto fundamental establecer si los beneficios para la salud están asociados a los compuestos originales o a sus respectivos metabolitos y de esta manera diseñar estrategias dietéticas y tecnológicas adecuadas para promover una salud adecuada en la población. Para ello no solo es imprescindible evaluar la formación de metabolitos de CF, sino determinar la población microbiana responsable, así como los cambios en la composición de la microbiota derivados de una ingesta rica en CF.

4.3. Modelos de fermentación colónica.

El creciente interés por conocer más sobre el papel de la microbiota en la salud, o incluso de utilizar la dieta para ayudar a tratar enfermedades asociadas a un desequilibrio

de la microbiota (disbiosis) ha favorecido el desarrollo de diferentes modelos de fermentación colónica *in vitro* e *in vivo* que son capaces de reproducir las condiciones naturales del colon en cuanto al pH, temperatura y composición de la microbiota intestinal humana. Estos modelos nos permiten estudiar las transformaciones que sufren los alimentos y/o ingredientes durante la digestión gastrointestinal, así como los cambios de la composición de la microbiota intestinal y su metabolismo, como fase inicial a estudios de intervención *in vivo* (animales y humanos), más costosos y que precisan de numerosos requerimientos éticos.

Existen modelos de fermentación colónica *in vitro*, modelos celulares y modelos *in vivo* humanos y animales. La selección del modelo apropiado dependerá de los objetivos del estudio y de las ventajas y limitaciones de cada uno. Las principales características de cada tipo de modelo se detallan a continuación:

Modelos *in vivo*: La microbiota colónica puede estudiarse *in vivo* a través de voluntarios sanos, pacientes de hospital, pacientes con ileostomías o modelos animales. Los mejores resultados en cuanto a los efectos de la dieta sobre la microbiota son aquellos obtenidos a partir de estudios con humanos. Sin embargo, estos modelos presentan grandes limitaciones por cuestiones prácticas y éticas, además de que existen limitaciones en cuanto al tipo y dosis administradas del alimento y de determinados compuestos. El empleo de modelos animales para investigar los procesos metabólicos mediados por los microorganismos del colon presenta un gran valor ya que los animales pueden ser alimentados con dietas controladas y se puede disponer fácilmente del contenido intestinal o de ciertos órganos y tejidos. El principal inconveniente de estos modelos animales es el elevado coste en comparación con los modelos *in vitro*. Además, la fisiología digestiva del animal difiere de la del humano (Macfarlane y Macfarlane, 2007).

Modelos *in vitro*: Los modelos *in vitro* son los más empleados para este tipo de estudio. Dentro de los modelos de fermentación *in vitro* encontramos dos tipos principales, los modelos estáticos o modelos tipo batch y los modelos dinámicos compuestos por uno o más reactores que simulan cada una de las partes del colon. El principio básico es común en estos modelos, uno o varios reactores son inoculados con microbiota fecal en condiciones anaeróbicas y a un valor de temperatura y pH fisiológico.

Modelos tipo batch: Son sistemas generalmente cerrados que usan botellas selladas o reactores que se mantienen en condiciones anaeróbicas y que son inoculados con

microbiota de suspensiones fecales. Estos modelos son fáciles de configurar y son útiles para evaluar la fermentación colónica de determinados compuestos. Son modelos apropiados para determinar la variabilidad interindividual en respuesta a un compuesto bioactivo concreto o para el estudio de las consecuencias de exposición a diferentes fuentes o dosis de un compuesto. Sin embargo, se trata de estudios a corto plazo y que tienen un escaso control microbiológico (Payne *et al.*, 2012).

Modelos dinámicos: Los modelos dinámicos están dotados de un flujo continuo para simular de forma más próxima las condiciones *in vivo.* Se utilizan ampliamente en los estudios de fermentación colónica a largo plazo con el fin de analizar la adaptación (espacial y temporal) de la microbiota a los compuestos ingeridos y el metabolismo microbiano de los mismos (Macfarlane y Macfarlane, 2007, Alminger *et al.*, 2014). Dentro de los modelos dinámicos encontramos modelos que únicamente reproducen el proceso de fermentación colónica y modelos más complejos que simulan el tracto gastrointestinal completo desde el estómago al colon. El modelo TIM-2 (TNO gastro-Intestinal Model 2) desarrollado por el TNO es un modelo simple que reproduce el proceso de fermentación colónica. El modelo SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) desarrollado en la Universidad de Gante (Bélgica), el modelo simgi® (SIMulator GastroIntestinal) desarrollado en el Centro de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) en Madrid (España) y el modelo dinámico in *vitro* de digestión gastrointestinal y fermentación colónica de AINIA (Valencia, España) están diseñados para reproducir de forma conjunta el proceso de digestión gastrointestinal y el proceso de fermentación colónica (Figura 28).

Estos modelos están formados por cinco reactores que simulan el estómago, intestino delgado y las tres zonas o regiones del colon (ascendente, transversal y descendente) en condiciones controladas. De forma general los tres reactores del colon (ascendente, transversal y descendente) están alineados en serie, alimentados de forma continua con medio de cultivo, con agitación mecánica, en atmósfera anaeróbica mediante el bombeo de N_2 y con pH controlado. Un sistema informático permite el control del pH y de los tiempos de vaciado. Para el control de la temperatura (37 ºC), el sistema bombea agua entre la doble pared que conforma los reactores y que además permite mediante cambios en la presión simular los movimientos peristálticos y de mezcla. Los reactores presentan diferentes puntos de toma de muestra para llevar a cabo los análisis bioquímicos y microbiológicos. El tiempo de residencia puede ser de 8 a 30 días, en función del objeto de

estudio (Tamargo *et al.*, 2017). La inoculación de los reactores se puede hacer utilizando cepas simples, mezclas de cepas, aunque en la mayoría de los casos, se emplean suspensiones fecales de voluntarios (Payne *et al.*, 2012).

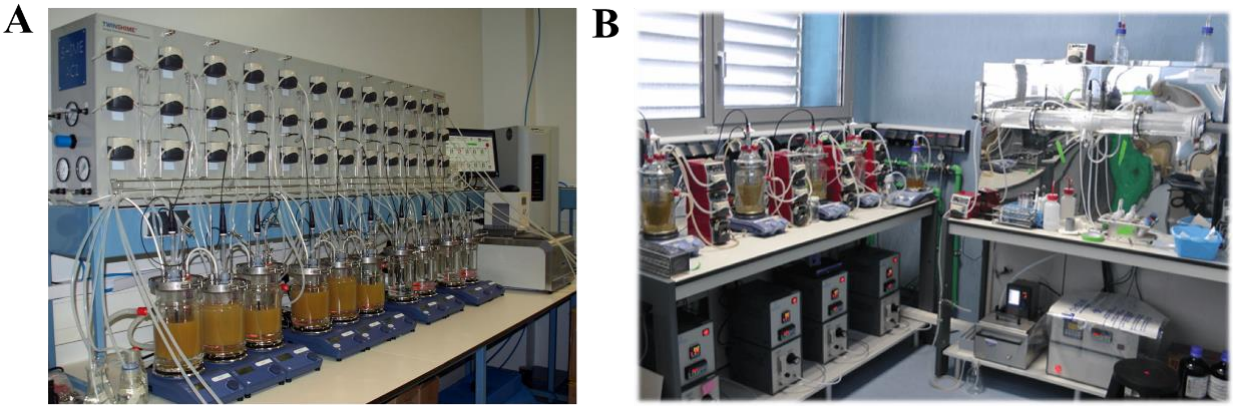


Figura 28: Modelos dinámicos de fermentación colónica. (A) Modelo SHIME; (B) Modelo simgi®. Fuentes: https://www.prodigest.eu/en/technology; https://www.cial.uam-csic.es/que-ofrecemos/simulador-gastrointestinal/simgi/

El uso de distintas tecnologías ómicas (proteómica, transcriptómica, metagenómica y metabolómica) junto con estos modelos dinámicos de digestión gastrointestinal y fermentación *in vitro* permite estudiar los mecanismos bioquímicos y tener una visión general de los procesos biológicos implicados tras la ingesta de un determinado compuesto activo (Payne *et al.*, 2012). Además, los modelos *in vitro* de digestión gastrointestinal y fermentación colónica pueden complementarse con modelos de células intestinales para reproducir *in vitro* las respuestas del hospedador (estudios de adherencia, producción de citoquinas o expresión genética) (Verhoeckx *et al.*, 2015).

CAPÍTULO II:

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El **objetivo general** de la presente tesis es el estudio del efecto combinado de la matriz vegetal y el procesado por altas presiones hidrostáticas sobre la estabilidad, bioaccesibilidad y metabolismo colónico de compuestos fenólicos de manzana y cebolla utilizando un modelo dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica, con el fin de plantear una estrategia para desarrollar un ingrediente alimentario con potencial carácter funcional.

Para alcanzar este objetivo general se han desarrollado varios objetivos específicos:

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Estudiar el efecto del procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) sobre los compuestos fenólicos y características antioxidantes de manzana 'Golden Delicious' de distinto origen geográfico y cebolla 'Recas'.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Estudiar el efecto de la matriz vegetal y del procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) sobre la estabilidad, bioaccesibilidad de compuestos fenólicos y características antioxidantes de un ingrediente de manzana 'Golden Delicious' y de un ingrediente cebolla 'Recas' mediante un modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Evaluar el impacto de un proceso continuo de digestión gastrointestinal y fermentación colónica sobre los compuestos fenólicos de ingredientes de manzana 'Golden Delicious' y cebolla 'Recas' procesadas por altas presiones hidrostáticas (APH) y su efecto sobre la microbiota colónica humana y su metabolismo: producción de metabolitos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta.

CAPÍTULO III:

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LOS INGREDIENTES DE MANZANA Y CEBOLLA PROCESADAS POR ALTAS PRESIONES HIDROSTÁTICAS.

1.1. Material vegetal y suplemento dietético.

Se ha seleccionado como material vegetal la manzana (*Malus domestica* Borkh., 'Golden Delicious') y la cebolla (*Allium cepa* L. var. *Cepa*, 'Recas'). Se estudiarán manzana y cebolla por ser las principales fuentes dietéticas del flavonol quercetina, así como de otros compuestos fenólicos. Además, se han seleccionado las variedades de cada uno de estos vegetales que presentan una mayor producción y consumo en España.

Las manzanas 'Golden Delicious' procedentes de dos orígenes, Aragón (España) (AMA, Alta Montaña de Aragón) (clima de tierras bajas, cálido y seco) y norte de Italia (El Capricho) (clima de montaña, frío y húmedo), y las cebollas 'Recas' (Carabaña, Madrid, España) fueron compradas en un supermercado local de Madrid en mayo de 2015, transportadas al ICTAN y almacenadas a 4 ºC hasta su procesado.

El suplemento dietético de quercetina en cápsulas de 500 mg (Solaray, Nutraceutical Corp, Estados Unidos) (Figura 29) fue adquirido en una farmacia local de Madrid en mayo de 2015.

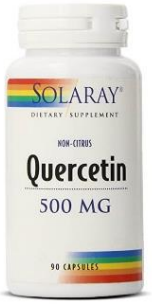


Figura 29: Suplemento dietético de quercetina.

1.2. Procesado por Altas Presiones Hidrostáticas.

1.2.1. Preparación de las muestras.

- *Manzanas:* Aproximadamente 12 kg de manzana 'Golden Delicious' de Aragón (España) y 12 kg de manzana 'Golden Delicious' procedente de Italia fueron lavadas, cortadas en cuartos con piel eliminando el corazón de la fruta y envasadas

(aproximadamente 200 g) en bolsas flexibles de baja permeabilidad (BB4L, Cryovac, Barcelona, España) y selladas con un vacío ligero (3,2 mbar). Las bolsas de manzana de cada origen geográfico se dividieron en 4 lotes; uno correspondiente a las muestras control (no procesadas por APH) y los otros tres lotes, correspondientes a los tres tratamientos de altas presiones hidrostáticas (APH) seleccionados: APH-1, (400 MPa/35 ºC/5 min); APH-2, (500 MPa/35 ºC/5 min) y APH-3 (600 MPa/35 ºC/5 min). Las bolsas de las muestras control se congelaron rápidamente con nitrógeno (N_2) líquido y se almacenaron a -80 ºC. Una vez tratadas por APH, las manzanas fueron igualmente congeladas con nitrógeno (N_2) líquido y almacenadas a -80 ºC (Figura 30).

- *Cebollas*: Las cebollas 'Recas' (aproximadamente 12 kg), fueron lavadas, peladas eliminando únicamente las dos capas externas, y posteriormente cortadas en cubos de 10 mm y envasadas (aproximadamente 200 g) en bolsas flexibles de baja permeabilidad (BB4L, Cryovac, Barcelona, España) y selladas con un vacío ligero (3,2 mbar). Se prepararon dos lotes, uno para las muestras control (no procesadas por APH) que fueron congeladas rápidamente con nitrógeno (N_2) líquido y almacenadas a -80 ºC. El otro lote se reservó para su procesado por APH (400 MPa/25 ºC/5 min) (Figura 31).

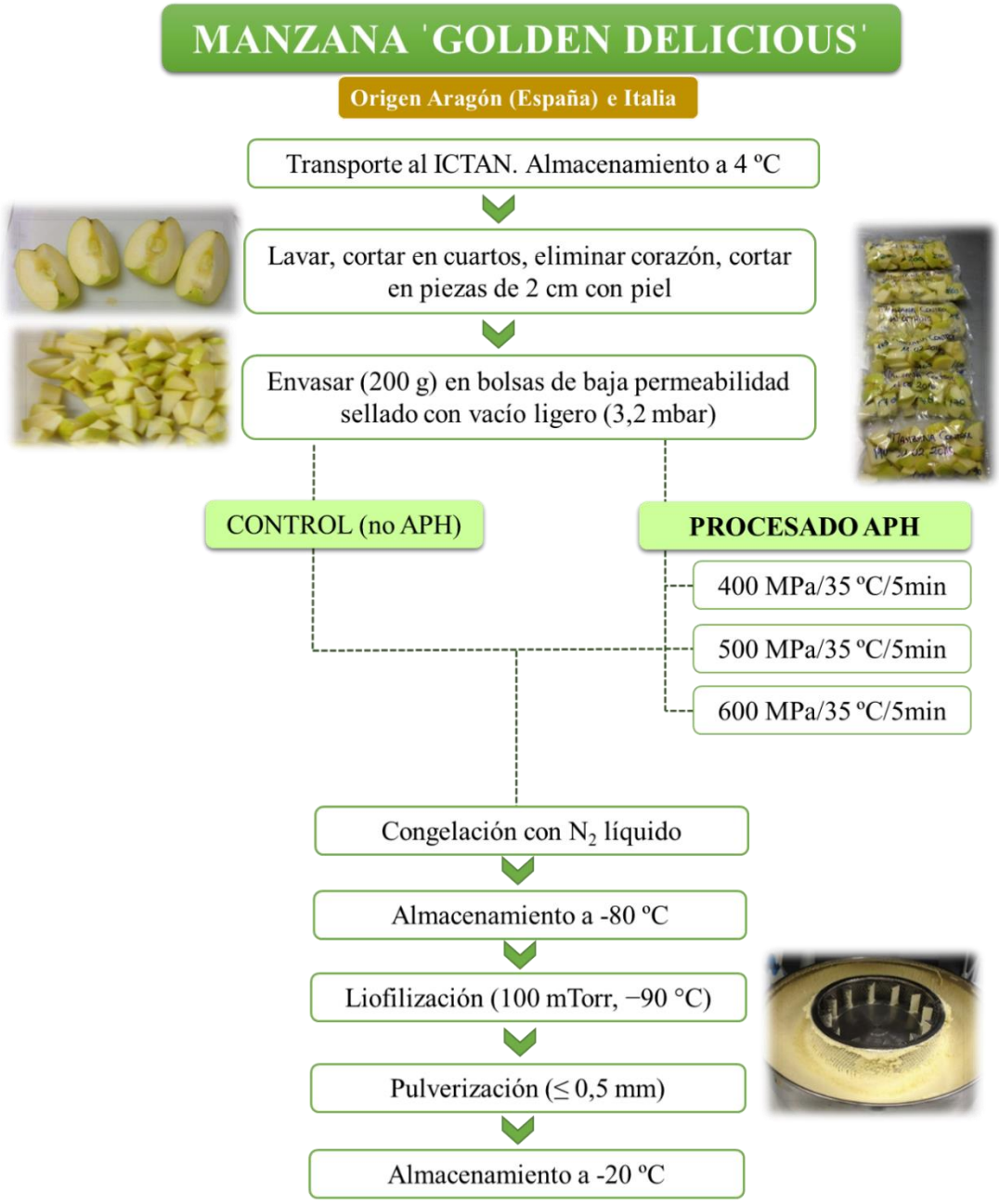


Figura 30: Esquema de la obtención de los ingredientes de manzana 'Golden Delicious' de dos orígenes geográficos distintos, Aragón (España) e Italia.



Figura 31: Esquema de la obtención del ingrediente de Cebolla 'Recas' procedente de Carabaña (España).

1.2.2. Condiciones del procesado por APH.

El procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) se realizó con el equipo High pressure Iso-Lab System, modelo FPG7100:9/2C (Stansted Fluid Power LTD, Essex, Reino Unido) disponible en el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN) (Figura 32). El equipo cuenta con una cámara de procesado de 1925 mL de capacidad y utiliza agua como medio transmisor de la presión. El equipo es capaz de operar en un rango de 100 a 900 MPa y dispone de un sistema de termostatización que permite realizar tratamientos combinados de presión y temperatura entre -10 ºC y 60 ºC.

Las manzanas 'Golden Delicious' procedentes de dos orígenes (Aragón-España e Italia), se procesaron a 400 MPa, 500 MPa y 600 MPa y un tiempo de procesado de 5 min. Debido a la compresión adiabática, el baño termostático se ajustó para alcanzar una temperatura máxima de 35 ºC en el interior de la vasija durante todos los tratamientos. En el caso de la cebolla el tratamiento aplicado fue 400 MPa y se mantuvo a 25 ºC durante 5 min. La velocidad de compresión fue de 3 MPa/s y la descompresión fue instantánea. La presión y la temperatura se controlaron y monitorizaron mediante un programa de ordenador durante todo el proceso.

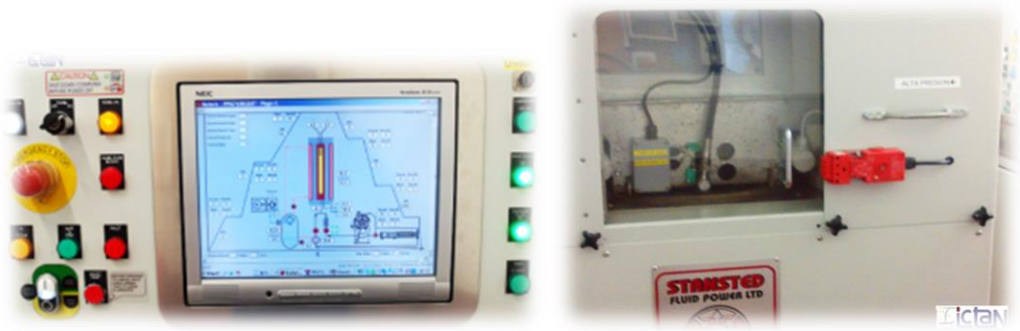


Figura 32: Equipo de Altas Presiones disponible en el ICTAN-CSIC.

1.3. Liofilización, molienda y tamizado de las muestras.

Las muestras no tratadas y tratadas por altas presiones hidrostáticas se congelaron rápidamente con nitrógeno (N_2) líquido y se almacenaron a -80 ºC durante un mínimo de 2 días. Posteriormente se liofilizaron en un liofilizador modelo Lyalfa (Telstar S.A., Barcelona, España) durante 72 h. Las condiciones de liofilización se fijaron en 100 mTorr y -90 ºC (Figuras 30 y 31).

Las muestras liofilizadas se pulverizaron y tamizaron utilizando un molinillo ultracentrífugo ZM-200 (Retsch GmbH, Haan, Alemania) para obtener un polvo fino de 0,5µm de tamaño de partícula. Las muestras liofilizadas y pulverizadas se envasaron en bolsas de plástico de muy baja permeabilidad y se almacenaron a -20 ºC hasta su posterior análisis.

2. DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL *IN VITRO.*

Los ingredientes de manzana y cebolla y el suplemento dietético de quercetina fueron sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal simulado empleando un modelo de digestión gastrointestinal dinámico *in vitro* desarrollado por el Centro Tecnológico AINIA (Valencia, España) (Viadel Crespo *et al*., 2012). El digestor dinámico *in vitro* está formado por dos compartimentos que simulan el estómago y el intestino delgado. Cada compartimento lo forman dos cámaras que están conectadas entre sí. Un sistema informático permite controlar y regular el movimiento peristáltico, la temperatura y el pH de forma continua durante todo el proceso de digestión. Para simular los movimientos peristálticos, las cámaras disponen de unas paredes flexibles de silicona alrededor de las cuáles circula agua y que mediante el empleo de unas bombas peristálticas se realizan movimientos de compresión y relajación lo que permite la mezcla del quimo y el tránsito digestivo. Además, la temperatura del agua es controlada por el sistema informático y mantenida a 37 ºC. Para el control del tránsito del quimo se utilizó la siguiente fórmula:

$$f = 1\text{-}2^{-(t/t1/2)\beta}$$

donde f constituye la fracción del quimo vaciado, t el tiempo de vaciado, t1/2 es el tiempo medio de vaciado y β el coeficiente que describe la curva de vaciado (Elashoff *et al*., 1982, Villemejane *et al*., 2016).

El vaciado estomacal se programó mediante un tránsito lento del quimo (t1/2= 70 min y β =2) y el vaciado intestinal mediante tránsito lento (t1/2= 160 min y β =1,6) (Minekus *et al*., 1995, Blanquet-Diot *et al*., 2004). El tránsito se reguló a través de la apertura o cierre de las válvulas que conectan estómago e intestino.

La incorporación de los digeridos gástrico e intestinal a cada compartimento se controla mediante el sistema informático. Este sistema a su vez controla el pH de manera continua mediante secreciones de HCl 1M en el estómago (de pH 5 a pH 2) y bicarbonato sódico 1M en el intestino delgado (pH 6,5-7). Los parámetros de este proceso de digestión dinámico *in vitro* se seleccionaron con el objetivo de reproducir el proceso de digestión gastrointestinal de una persona adulta sana tras la ingesta de una comida sólida (Blanquet-Diot *et al*., 2009, Etienne-Mesmin *et al*., 2011, Blanquet-Diot *et al*., 2012). El proceso de digestión gastrointestinal se llevó a cabo en 360 min (de 0 a 120 min la fase de digestión gástrica, y de 0 a 360 min la fase de digestión intestinal), 37 ºC, oscuridad y condiciones

anaeróbicas (inyección de gas nitrógeno en el sistema) (Bermúdez-Soto *et al*., 2007, Blanquet-Diot *et al*., 2009).

Se realizó la digestión gastrointestinal de muestras liofilizadas de manzana no tratada y tratada por APH (aproximadamente 37,5 g de muestra, digestión por duplicado), cebolla no tratada y tratada por APH (aproximadamente 27 g de muestra, digestión por duplicado), y de un suplemento dietético de quercetina (0,0705 g de polvo de una mezcla de 5 cápsulas). Las fases de este proceso (Figura 33) se resumen a continuación:

- Fase oral: El proceso se inició mezclando la muestra con el fluido salival a 37 ºC. Esta disolución o fluido salival contenía 9600 unidades de α-amilasa, 30 mL de tampón citrato (pH 6), 100 mL de una solución de electrolitos (NaCl, $CaCl_2$ y $NaHCO_3$) y agua ultrapura hasta completar un volumen de 300 mL. La mezcla se homogeneizó durante 2 min y seguidamente se sometió a un burbujeo con nitrógeno durante 10 min para eliminar el oxígeno disuelto.

- Digestión gastrointestinal: El contenido de la fase oral se introduce en el compartimento del estómago para dar lugar al inicio de la digestión gastrointestinal. Previo al inicio de la digestión, se introdujeron 10 mL de solución gástrica en el compartimento del estómago y 60 mL de solución intestinal en el del intestino. La ***solución gástrica*** a pH 1,5-2 (solución de electrolitos formada por 0,03% lipasa gástrica y 0,03% de pepsina) y ***solución intestinal*** a pH 6,5-7,0 (solución de electrolitos formada por 7% pancreatina, 4% sales biliares durante los primeros 30 min del ensayo y 2% de sales biliares hasta el final del ensayo). La composición de ambas soluciones (gástrica e intestinal) se basó en los datos de los trabajos publicados por Minekus *et al*. (1995) y Larsson *et al*. (1997). Con el objetivo de monitorizar la liberación de los compuestos fenólicos durante el proceso, se recogieron alícuotas de cada fase, fase oral, fase de digestión gástrica (a los 120 min) y fase de digestión intestinal (desde los 0 a los 360 min). Estas alícuotas se acidificaron a pH 2 para asegurar la inactivación enzimática y la estabilidad de los compuestos fenólicos y se mantuvieron a -20 ºC hasta su análisis.

- Fracción bioaccesible: El digerido intestinal a pH 2 se centrifugó a 3890 *g* y 4 ºC durante 1 h en una centrífuga refrigerada (Sigma Laboratory Centrifuge 6K15). El sobrenadante se recogió y se mantuvo a -20 ºC hasta su análisis. Este sobrenadante representó la fracción bioaccesible de acuerdo a los procedimientos descritos por Cilla *et al*. (2012) y Shim (2012).



Figura 33: Esquema del proceso de digestión gastrointestinal dinámico *in vitro.*

- Cálculos bioaccesibilidad: La bioaccesibilidad (%) de los compuestos fenólicos fue determinada utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{[CF\ fracción\ bioaccesible]}{[CF\ muestra\ no\ digerida]} \times 100$$

[CF fracción bioaccesible]: concentración del compuesto fenólico en la fracción bioaccesible.
[CF muestra no digerida]: concentración del compuesto fenólico en la muestra no digerida.

3. FERMENTACIÓN COLÓNICA *IN VITRO*.

El proceso de fermentación colónica de los ingredientes de manzana y cebolla tratadas por APH se llevó a cabo en un digestor *in vitro* de fermentación colónica disponible en el Centro Tecnológico AINIA (Valencia, España). El equipo está formado por cinco reactores: estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente (Figura 34). La puesta a punto del método, así como de las condiciones del

proceso de fermentación colónica (composición del medio de cultivo, volúmenes utilizados) se basaron en los trabajos publicados por Molly *et al*. (1994), Van de Wiele *et al*. (2007), Marzorati *et al*. (2010), Serra *et al*. (2011), Dall'Asta *et al*. (2012) y Cueva *et al*. (2015).

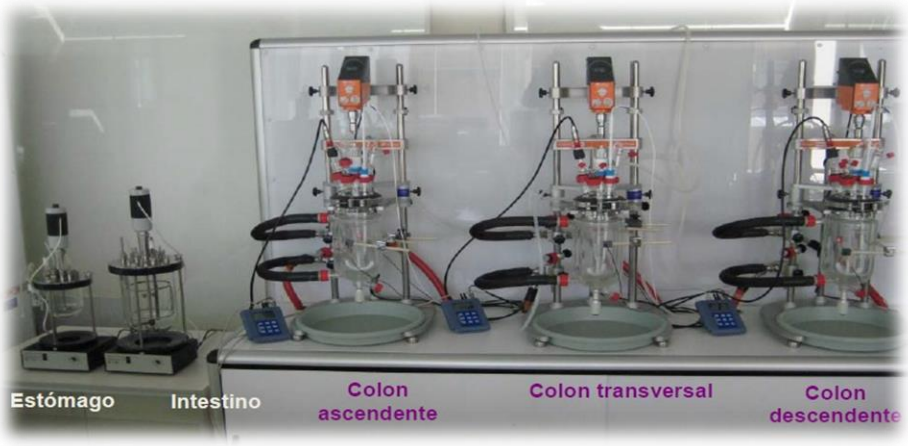


Figura 34: Digestor *in vitro* de fermentación colónica desarrollado por AINIA.

Los tres reactores del colon se llenan de medio de cultivo usando diferentes volúmenes, 1600 mL en colon ascendente (Reactor 3), 1200 mL para el colon transversal (Reactor 4) y 1000 mL para el colon descendente (Reactor 5).

El medio de cultivo estaba compuesto por una mezcla de carbohidratos (1 g/L de arabinogalactano, 2 g/L pectina, 1 g/L xilano, 4 g/L almidón, 0,4 g/L glucosa), extracto de levadura (3 g/L), peptona (1 g/L), mucina (4 g/L), L-cisteína (0.5 g/L), Tween80, sales ($NaHCO_3$, NaCl, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $CaCl_2$, $MgSO_4$), oligoelementos ($MnSO_4$, $FeSO_4$, $CoSO_4$, $ZnSO_4$) y vitaminas. A continuación, se ajustó el pH de cada reactor utilizando HCl o $NaCO_3$ y se burbujeó con gas nitrógeno para la eliminación del oxígeno disuelto.

El siguiente paso fue inocular el medio de cultivo de cada reactor con una solución fecal al 20% de bacterias de muestras fecales de voluntarios sanos. Las condiciones para la recogida de las muestras fecales se escogieron en base a trabajos previamente publicados (De Boever *et al*., 2000, Van den Abbeele *et al*., 2009, Possemiers *et al*., 2011).

Estas muestras fecales se obtuvieron de un mínimo de tres voluntarios adultos sanos, no fumadores, sin tratamiento con antibióticos durante al menos tres meses anteriores al estudio, con una dieta normal, sin trastornos metabólicos ni gastrointestinales previos y con una dieta libre de probióticos durante los dos días anteriores a la recogida de las muestras. Las muestras fecales se recogieron en el mismo día del ensayo, en recipientes estériles,

mantenidas en refrigeración y en condiciones de anaerobiosis para asegurar la estabilidad de la microbiota presente en las mismas.

El pH óptimo de actuación de las bacterias en cada reactor se ajustó y se controló durante todo el proceso, siendo ese pH para el colon ascendente entre 5-5,6, colon transversal 6-6,4 y colon descendente 6,4-6,8. Durante todo el proceso la temperatura fue controlada y mantenida a 37 ºC en todas las etapas. Dos veces al día, los reactores fueron burbujeados durante 15 min con gas nitrógeno para mantener las condiciones de anaerobiosis.

Las bombas de trasvase que conectan el estómago y el intestino delgado trabajan de forma semicontinua mientras que las bombas que conectan los tres reactores del colon lo hacen de una manera continua para simular las condiciones reales del tracto digestivo. El funcionamiento del sistema se controla mediante un sistema informático.

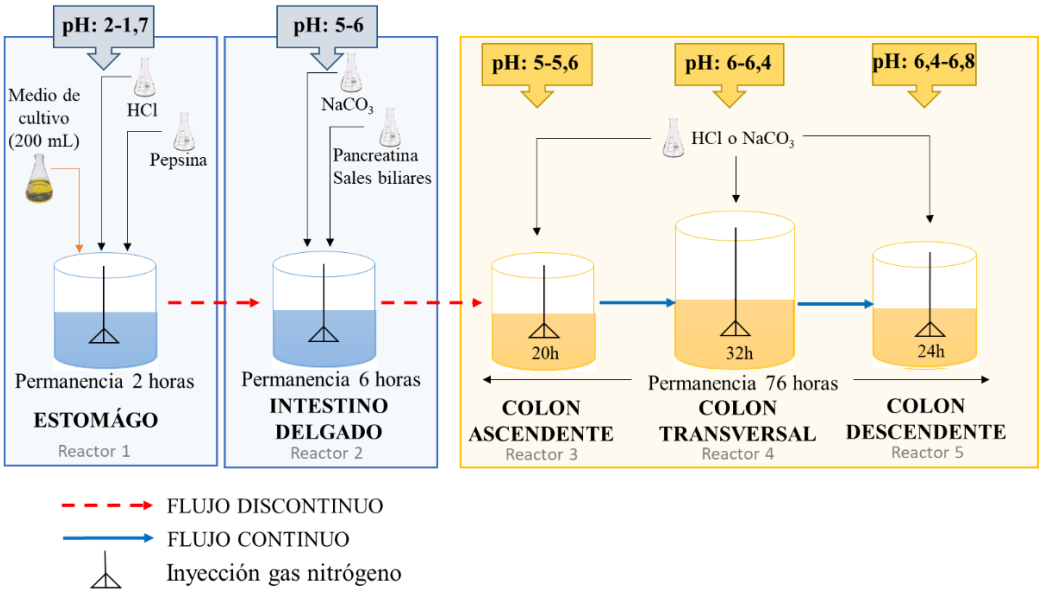


Figura 35: Esquema del proceso de digestión gastrointestinal y fermentación colónica *in vitro*.

El proceso de digestión gastrointestinal y fermentación colónica incluye un periodo basal (estabilización) de 12 a 13 días de duración y un periodo de ingesta (periodo de tratamiento) de 14 días de duración. Durante el periodo de estabilización, el digestor fue alimentado con 200 mL de medio de cultivo cada 8 h (3 veces al día) con el objetivo de conseguir la adaptación de la microbiota a las condiciones *in vitro* impuestas hasta alcanzar niveles similares a los presentes en colon ascendente, transversal y descendente. Durante el periodo de ingesta se adicionó una vez al día medio de cultivo (200 mL) junto con el

ingrediente de manzana (37,5 g) o el ingrediente de cebolla (27 g) y de forma adicional se añadió dos veces solo medio de cultivo (200 mL).

Previamente se llevó a cabo una digestión gástrica e intestinal de las muestras usando las mismas condiciones descritas anteriormente. Tras el proceso de digestión gastrointestinal, se transfirió el digerido intestinal al colon ascendente mediante un flujo en discontinuo. Esta incorporación tuvo lugar 3 veces al día. El volumen y tiempo de tránsito en cada reactor trata de simular las condiciones *in vivo* y son los siguientes: 260 mL y 2 h en el reactor 1 (estómago), 460 mL y 6 h en el reactor 2 (intestino delgado), 1000 mL y 20 h en el reactor 3 (colon ascendente), 1600 mL y 32 h en el reactor 4 (colon transversal) y 1200 mL y 24 h en el reactor 5 (colon descendente) (Figura 35).

El tiempo total del proceso es de 3,5 días (84 h), tiempo aproximado de retención del alimento en condiciones reales (Cummings *et al*., 1989, Kontula *et al*., 1998, De Boever *et al*., 2000). El tránsito entre los reactores del colon se realiza mediante un flujo continuo. Además, los reactores reciben continuamente gas nitrógeno para crear una atmósfera anaeróbica, la temperatura es mantenida a 37 ºC, en oscuridad y con una agitación ligera (150 rpm).

Para el estudio del efecto de la microbiota sobre los compuestos fenólicos de manzana-APH y cebolla-APH, se recogieron muestras (50 g) de los tres reactores que simulan el colon (ascendente, transversal, descendente) cada día durante los 14 días del periodo de ingesta. También se tomaron muestras (10 g) de digerido gástrico e intestinal en los días 2, 7 y 9 del periodo de ingesta. Las muestras se congelaron inmediatamente y se mantuvieron a -20 ºC y en oscuridad hasta su envío al ICTAN. Una vez allí, se almacenaron a -80 ºC hasta su liofilización.

4. METODOLOGÍA.

4.1. Análisis físicos.

4.1.1. Estudio de la microestructura.

Para el estudio del efecto de las distintas fases de un proceso *in vitro* de digestión gastrointestinal sobre la microestructura de los ingredientes de manzana y cebolla (APH y no APH) y de un suplemento dietético de quercetina, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse 80i (Nikon Co., Ltd., Tokio, Japón). Se empleó una lámpara de mercurio con un

filtro FITC ($\lambda_{ex\ max}$ = 482nm, $\lambda_{em\ max}$ =536 nm) como fuerza de excitación. Se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos y las imágenes se obtuvieron con el aumento 4x. Mediante un software específico conectado al microscopio (NIS-Elements F, Version 4.0, Nikon, Tokio, Japón) se obtuvieron las imágenes de las muestras (1280 x 1024 pixels). Los análisis se realizaron por el Grupo de Investigación Microestructura y Química de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia (España).

4.1.2. Estudio de las propiedades reológicas.

Para estudiar los cambios reológicos que tienen lugar durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal *in vitro* de los ingredientes de manzana y cebolla (APH y no APH) y de un suplemento dietético de quercetina, se empleó un reómetro rotacional dinámico Kinexus Pro (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, Reino Unido) (Figura 36). El equipo está equipado con una geometría de cono y placa (ángulo del cono 4º, 40 mm de diámetro) y gap de 0,15 mm. El control de la temperatura en las muestras se lleva a cabo con un sistema Peltier. Las muestras se colocaron en los platos y se dejaron equilibrar a 37 ºC durante 5 min antes de las mediciones. Las muestras se sometieron a un tratamiento de cizallamiento constante (100 s^{-1}, 5 min) antes del análisis para estandarizar la velocidad de cizallamiento de cada muestra. A continuación, se obtuvieron curvas de flujo en función de la velocidad de cizallamiento en un rango de 100 a 0,1 s^{-1}. La ecuación de la Ley de Potencia fue utilizada para describir el efecto de la velocidad de corte sobre la viscosidad aparente de las muestras:

$$\eta_a = K\dot{\gamma}^{n-1}$$

η_a, viscosidad aparente (mPa s), *K* índice de consistencia (mPa s^n), $\dot{\gamma}$ velocidad de cizallamiento (s^{-1}), *n* índice de comportamiento de flujo.



Figura 36: Reómetro rotacional Kinexus Pro.

Una velocidad de cizallamiento a 10 $^{s-1}$ se utilizó para reproducir las condiciones de la fase oral de la digestión (Pal, 2011, Espinal-Ruiz *et al*., 2016). Para comprobar la precisión de los modelos predictivos se calcularon coeficientes de correlación lineal entre la viscosidad aparente y los valores calculados a través de la fórmula de la Ley de Potencia utilizando velocidades de cizallamiento de 0,1, 7,5 y 100 s^{-1}. Las medidas se hicieron por triplicado por las dos muestras de digestión gastrointestinal obtenidas (n=6). Estos análisis fueron realizados en colaboración con el Grupo REOTEXTAL del ICTAN.

4.2. Análisis físico-químicos.

4.2.1. pH y acidez titulable.

La determinación de pH y acidez titulable del material vegetal inicial y de los ingredientes de manzana y cebolla (APH y no APH) liofilizados se realizó según el procedimiento descrito en Plaza *et al*. (2012). Se pesaron 1,5 g de producto liofilizado (o 10 gramos de producto fresco) con 20 mL de agua desionizada en un homogeneizador Omnimixer (modelo ES-207, Omni International Inc., Gainesville, VA, Estados Unidos). Este homogenizado se calentó hasta ebullición para eliminar el CO_2 ocluido y evitar la formación de ácido carbónico. A continuación, se añadieron 20 mL de agua al homogenizado y una vez a temperatura ambiente, se determinó el pH empleando un pH-metro (Microph 2000, Crison, Barcelona, España).

La acidez titulable se determinó por neutralización con sosa 0,1 M en la misma disolución preparada para determinar el pH. Se introdujo un imán y el electrodo del pH-metro, se apuntó el pH inicial y se valoró con la sosa añadiéndola poco a poco. Se consideró finalizada la neutralización cuando el valor de pH medido con el pH-metro fue de 8,1 (viraje de la fenolftaleína). Se apuntó el volumen en mL de sosa gastados.

La acidez titulable se expresa en gramos de ácido málico o cítrico (manzana o cebolla) por 100 gramos de peso fresco (g ácido/100 g pf) para los vegetales frescos y como gramos de ácido málico o cítrico por 100 gramos de peso seco (g acido/100 g ps) para los liofilizados. El análisis se hizo por triplicado.

$$\% \text{ Acidez} = \frac{\text{mL NaOH x N NaOH (0,1) x } \textit{miliequivalentes del ácido}}{\text{Peso de la muestra (g)}} \text{ X } 100$$

Miliequivalentes del ácido:

Ácido málico anhidro: 0,06704 g/meq
Ácido cítrico anhidro: 0,06404 g/meq

4.2.2. Contenido en agua.

Para la determinación del contenido de agua se pesaron aproximadamente 10 gramos de trozos de manzana o cebolla frescas (por triplicado) sobre una célula de aluminio y se apuntó el peso exacto. A continuación, se introdujeron en una estufa a 90 ºC durante varios días hasta obtener un peso constante. El resultado de la determinación por triplicado se expresa como gramos de agua en 100 g de peso fresco (% de agua).

4.2.3. Sólidos solubles.

La determinación de los sólidos solubles se realizó teniendo en cuenta el procedimiento descrito por Plaza *et al*. (2012). Los sólidos solubles, expresados como extracto refractométrico en grados Brix (ºBrix) a 20 ºC se midieron empleando un refractómetro digital Atago dbx-30 (Japón) con corrector automático de temperatura. Los sólidos solubles se midieron con el zumo obtenido tras exprimir a mano con una gasa tipo "cheese-cloth" varias rodajas de manzana o cebolla frescas cortadas en trozos.

4.3. Análisis microbiológicos.

4.3.1. Ingredientes de manzana y cebolla.

Para determinar la estabilidad del producto liofilizado de manzana y cebolla (APH y no APH) se llevó a cabo un estudio microbiológico de las muestras justo tras su liofilización y pulverización, a los 2 meses y a los 24 meses de conservación en refrigeración (4 ºC). El recuento de aerobios totales (30 ºC) se determinó de acuerdo al protocolo estandarizado AFNOR NF V08-051 (1999), el recuento de mohos y levaduras en base al protocolo AFNOR NF V08-59 (2002), para coliformes se empleó la norma ISO 4832:2006, para *Escherichia-coli* (β-glucuronidasa) la norma ISO 16649-2:2001, para

Listeria monocytogenes la norma ISO 21528-2:2017 y para *Salmonella* spp. la norma ISO 6579-1:2017. Estos análisis fueron realizados en colaboración con la Unidad de Servicio de Técnicas Analíticas, Instrumentales y Microbiológicas del ICTAN (USTA).

4.3.2. Muestras de fermentación colónica.

Para el estudio del efecto de los compuestos fenólicos de manzana-APH y cebolla-APH sobre la microbiota intestinal se recogieron muestras (5 mL) de cada reactor del colon (ascendente, transversal y descendente) a distintos tiempos del periodo de ingesta, obteniéndose un total de 18 muestras de producto de fermentación (6 de colon ascendente, 6 de colon transversal y 6 de colon descendente) (Tabla 6). También se tomaron muestras de los digeridos del colon durante la etapa basal o de estabilización, con el fin de evaluar la evolución de la microbiota durante el proceso de fermentación de las muestras de manzana-APH y cebolla-APH. El análisis de las muestras se realizó de forma inmediata tras la recogida en el Departamento de Microbiología de AINIA (Valencia, España).

Tabla 6: Tiempo de recogida de los digeridos en los tres reactores del colon para las muestras de fermentación colónica de manzana-APH y cebolla-APH.

	RECOGIDA DE MUESTRA (DÍAS)	
	MANZANA	CEBOLLA
PERIODO BASAL	0	0
	5	6
	9	8
	13	12
PERIODO DE INGESTA	1	1
	3	3
	6	6
	8	8
	10	10
	14	14

La Tabla 7 muestra los microorganismos analizados en las muestras mediante aislamiento y recuento empleando medios de cultivos selectivos y diferenciales y condiciones de incubación adecuadas (Hartemink y Rombouts, 1999, Nebra y Blanch, 1999, Tannock *et al*., 2000). Se analizaron los siguientes microorganismos: microorganismos anaerobios y Enterobacterias como indicadores de microbiota colónica total; coliformes totales y *Clostridium* spp. que forman parte de la composición de la

microbiota y están relacionados con potenciales efectos perjudiciales; *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. asociados con la microbiota beneficiosa del colon.

Tabla 7: Medios de cultivo utilizados para el aislamiento y recuento de los microorganismos de interés, así como, las condiciones de incubación de los mismos.

Microorganismo	Medio	Condiciones de incubación
Bifidobacterium spp.	Agar TOS-propionato (Merck Millipore)	Anaerobiosis, 37 ºC, 2 días, siembra en profundidad
Lactobacillus spp.	Agar MRS (Oxoid)	Anaerobiosis, 37 ºC, 2 días, siembra en profundidad
Enterobacteriaceae	Agar VRBD (Merck Millipore)	Anaerobiosis, 37 ºC, 1 día, siembra en profundidad
Coliformes totales	Agar VRBL (Merck Millipore)	Anaerobiosis, 37 ºC, 1 día, siembra en profundidad
Clostridium spp.	TSC Agar (Oxoid)	Anaerobiosis, 37 ºC, 1 día, siembra en profundidad
Anaerobios totales	Agar Schaedler Anaerobe (Oxoid)	Anaerobiosis, 37 ºC, 3 días, siembra en profundidad

4.4. Análisis bioquímicos.

4.4.1. Actividad polifenoloxidasa y peroxidasa.

Las determinaciones de las actividades enzimáticas polifenoloxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) se realizó de acuerdo con las metodologías descritas en varias publicaciones (Hernández y Cano, 1998, Quiles *et al*., 2005, Schmitz-Eiberger y Matthes, 2011).

La enzima polifenoloxidasa (PPO) (E.C. 1.10.3.1) es una enzima oxidorreductasa implicada en el pardeamiento enzimático de los alimentos. Estas enzimas catalizan la oxidación de monofenoles en posición orto para dar lugar a o-difenoles y en una segunda reacción, catalizan la oxidación de los o-difenoles a quinonas, las cuales pueden polimerizar dando lugar a cambios de las características sensoriales de los alimentos vegetales como cambios de color por el desarrollo de pardeamiento, entre otros (Figura 37).

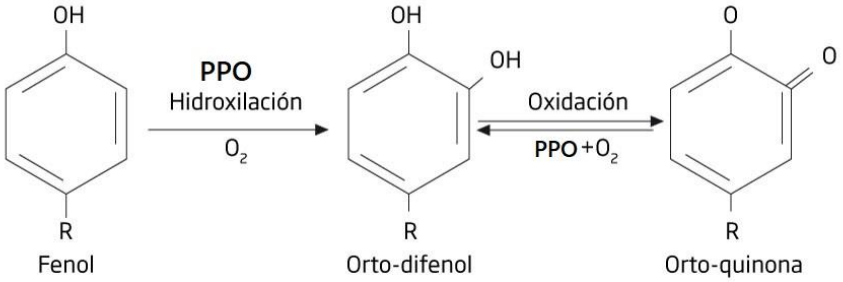


Figura 37: Esquema del proceso de oxidación durante el pardeamiento enzimático.

La enzima peroxidasa (POD) (EC.1.11.1.7.) forma parte de un grupo de enzimas conocidas como oxidorreductasas, enzimas implicadas en la oxidación de un gran número de compuestos naturales (principalmente peroxidación de ácidos grasos) dando lugar al desarrollo de olores y sabores extraños y cambios de color (en menor medida que la PPO) en presencia de peróxido de hidrogeno y dando lugar a radicales libres:

$$ROOH + AH_2 \rightarrow H_2O + ROH + A^*$$

R = H^+, CH_3, C_2H_5

AH_2 = donador de hidrógeno en forma reducida

A^* = donador de hidrógeno en forma oxidada

Extracto enzimático. La determinación de las actividades POD y PPO se realizó en un extracto enzimático obtenido a partir de las muestras liofilizadas de manzana y cebolla (APH y no APH). Para la obtención de este extracto enzimático, a 1 g de muestra liofilizada de manzana y cebolla (APH y no APH) se añadieron 10 mL de una solución de extracción compuesta por un tampón fosfato potásico 0,2 M (pH 6,5) conteniendo 2,5 g/L de Tween 20 y 10 g/L de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Sigma Aldrich-Chemical, San Luis, MO, EEUU). La mezcla se homogeneizó en Omnimixer a 8000 rpm durante 2 min. Posteriormente se centrifugó a 12000 *g*, durante 30 min a 4 ºC. El sobrenadante se filtró utilizando 6 capas de gasa tipo "cheese-cloth" y se anotó el volumen obtenido. Los extractos se realizaron por triplicado.

Para la determinación de la actividad PPO, 100 µL del extracto enzimático fueron añadidos a una cubeta que contenía 2,9 mL de 4-metilcatecol 0,033 M en tampón fosfato potásico 0,2M (pH 6,5) en el caso de las muestras de manzana. Para la cebolla, fueron 300 µL del extracto enzimático los que se añadieron a la cubeta que contenía 2,7 mL de 4-

metilcatecol 0,033 M. El incremento de absorbancia se midió a 420 nm cada 12 segundos durante 10 min y 25 ºC, en el espectrofotómetro Biochrom Ultrospec 4300 pro UV-vis (Cambridge, Inglaterra). Los resultados se expresaron mediante la determinación de la pendiente de la reacción, definiendo la unidad de actividad enzimática como el cambio de absorbancia por min y por peso en gramos de la muestra según la siguiente ecuación:

$$\Delta DO/\min/g\ ps = \frac{V_A\ (mL) x\ \Delta DO/min}{V_B\ (mL)\ x\ g\ muestra}$$

ΔDO/min = incremento de la densidad óptica por min (pendiente)
V_A = Volumen total del extracto enzimático (mL)
V_B = Volumen del extracto enzimático utilizado en la mezcla de reacción de la cubeta (mL)

Para la determinación de la actividad peroxidasa (POD), se utilizan dadores de hidrógeno que al oxidarse dan compuestos con grupos cromóforos que absorben en el visible, en este caso se utilizó la *p*-fenilendiamina. Para la medición de la actividad POD, 0,05 mL del extracto enzimático se mezclaron con 2,6 mL del tampón fosfato sódico 0,2 M (pH 6,5), 0,1 mL de peróxido de hidrógeno al 1,5% v/v, y 0,2 mL de *p*-fenilendiamina al 1%. Las lecturas se realizaron a 485 nm cada 12 s durante 10 min y a 25 ºC. Los resultados se expresaron mediante la determinación de la pendiente de la reacción, definiendo la unidad de actividad enzimática como el cambio de absorbancia por minuto y por peso en gramos de la muestra según la siguiente ecuación:

$$\Delta DO/\min/g\ ps = \frac{V_A\ (mL)\ x\ \Delta DO/min}{V_B(mL)\ x\ g\ muestra}$$

ΔDO/min = incremento de la densidad óptica por min (pendiente)
V_A = Volumen total del extracto enzimático (mL)
V_B = Volumen del extracto enzimático utilizado en la mezcla de reacción de la cubeta (mL)

4.4.2. Proteínas solubles totales.

El contenido de proteínas solubles totales fue determinado de acuerdo al método Bradford (Bradford, 1976) en el mismo extracto obtenido para analizar las actividades PPO y POD. Se mezclaron en la cubeta 50 µL del extracto enzimático, 750 µL de agua ultrapura y 200 µL del reactivo BioRad. A continuación, se dejó 10 min a temperatura ambiente y se

midió en un espectrofotómetro (Biochrom Ultrospec 4300) prefijado a $\lambda = 595$ nm, utilizando un blanco como referencia (800 µL de agua ultrapura y 200 µL del reactivo BioRad). La cuantificación se llevó a cabo mediante patrón externo. Para ello se construyó una recta de calibrado de seis niveles de concentración (20, 15, 10, 5, 2, 1 µg proteína) (r^2 = 0,9994).

4.5. Análisis químicos.

4.5.1. Vitamina C y ácido ascórbico

El contenido total de vitamina C (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico) se determinó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de UV-vis de diodos (HPLC-DAD) tras la reducción del ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico usando ditiotreitol (DTT, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU) como agente reductor (Figura 38), según el método descrito por Vázquez-Gutiérrez *et al*. (2013) con algunas modificaciones.

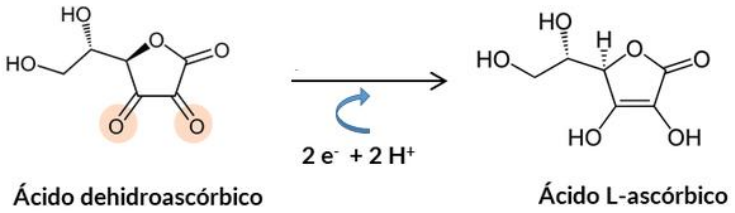


Figura 38: Esquema de la reducción del ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico.

Para ello 1,5 g de las muestras liofilizadas de manzana y cebolla (APH y no APH) se homogeneizaron con una solución al 3% de ácido metafosfórico y 8% de ácido acético (20 mL en el caso de las muestras de manzana o 40 mL en cebolla). La mezcla se centrifugó a 11000 *g* durante 10 min a 4 ºC en centrífuga refrigerada (Thermo Scientific Sorvall, mod. Evolution RC, Thermo Fischer Scientific Inc, EEUU). Se recogió el sobrenadante y el volumen se ajustó con agua destilada a 25 mL en el caso de la manzana y 50 mL en cebolla (Disolución A). De la disolución anterior (A) se filtraron 1,5 mL aproximadamente con filtro de 0,45 µm y se inyectaron 20 µL en el sistema cromatográfico para la determinación del ácido ascórbico. El resultado se expresó en mg de ácido ascórbico por 100 g peso seco.

Para la determinación de la vitamina C total (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico), de la disolución A se tomaron 0,5 mL y se hicieron reaccionar con 1 mL de la solución DTT (ditiotreitol) con una concentración de 20 mg/mL en agua destilada durante 2 h, a temperatura ambiente y en oscuridad. De esta forma el ácido dehidroascórbico contenido en la muestra pasó a ácido ascórbico. Pasado ese tiempo la solución se filtró con filtro de 0,45 µm y se inyectaron 20 µL en el sistema cromatográfico. El resultado se expresó en mg de vitamina C por 100 g peso seco. Las extracciones de ácido ascórbico y vitamina C se hicieron por duplicado.

Para la determinación del ácido ascórbico se utilizó una columna de fase reversa C18 Hypersyl ODS de 250 mm x 4,6 mm y 5 µm (Teknokroma, Barcelona, España). El equipo utilizado fue un HPLC modelo Agilent-1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbroon, Alemania) que cuenta un detector de diodos (DAD) de UV-vis (G1315B), una bomba cuaternaria (G1311A), un desgasificador (G13279A), un inyector automático (G1329A) y un compartimento termostatizado para la columna (G1316A). El sistema estuvo controlado por el software HP Chemstation. La separación se realizó en una única etapa en modo isocrático de 15 min, empleando como fase móvil una disolución de ácido sulfúrico (Panreac Química) al 0,01% (pH = 2,5-2,6). El flujo utilizado fue de 1 mL/min y se inyectaron 20 µL de las muestras. La columna estuvo termostatizada durante el proceso de separación a 25 ºC. La longitud de onda de medida fue fijada a 245 nm.

La identificación del ácido ascórbico se realizó por comparación de su tiempo de retención y el espectro de absorción en UV-vis con los de un patrón comercial de ácido ascórbico. Para la cuantificación del contenido de ácido ascórbico y vitamina C total se empleó una curva de calibrado ($r^2 \geq 0,99$) con ácido ascórbico comercial (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU) a distintas concentraciones (5 a 500 µg/mL).

4.5.2. Fibra soluble, insoluble y total.

La fibra soluble, insoluble y total se determinaron de acuerdo al método oficial AOAC 991.43 (AOAC, 2012).

4.5.3. Pectinas.

El contenido de pectinas en manzana se determinó en base al método publicado por Canteri *et al*. (2005) con algunas modificaciones. Las pectinas se extrajeron a partir de 2 g de muestra de manzana liofilizada sometida a reflujo en un sistema de condensación a una temperatura entre 70 y 80 ºC durante 70 min utilizando una solución acuosa acidificada con ácido cítrico a pH 2,5 y una relación soluto:solvente de 1:25 (v/v). La mezcla caliente se filtró a vacío y el filtrado se enfrió rápidamente en baño con hielo hasta los 4 ºC para minimizar la degradación de las pectinas por el calor. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 10 min. Las pectinas se obtuvieron por precipitación del sobrenadante tras añadir etanol al 96% (2:1, v/v). El precipitado se agitó y se mantuvo 12 h a temperatura ambiente y oscuridad. Las pectinas se filtraron, se enjuagaron con 10 mL de etanol al 70%, seguido 10 mL de etanol al 96% y 10 mL de acetona. Por último, las pectinas se sometieron a un secado en horno a 40 ºC hasta peso constante. La extracción se hizo por triplicado y los resultados se expresaron en % de pectinas respecto al peso inicial de la manzana según la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento en pectinas (\%)} = \frac{\text{Peso seco pectinas}}{\text{Peso inicial muestra manzana}} \times 100$$

Grado de esterificación: el grado de esterificación se define como la relación entre los grupos de ácido galacturónico esterificados y los grupos ácidos libres. Se determinó por un método de valoración según Liew *et al*. (2016) con algunas modificaciones. Se partió de 0,2 g de pectina seca mezclada con 3 mL de etanol al 96% y 20 mL de agua destilada. La mezcla se agitó con imán hasta la disolución de la pectina. A la mezcla disuelta se añadieron tres gotas de fenolftaleína y se valoró con hidróxido sódico al 0,1 N hasta obtener un ligero color rosado. Se anotó el volumen gastado de sosa (V_1). A continuación, se adicionaron 10 mL de hidróxido sódico al 0,1 N para la neutralización del ácido poligalacturónico, se agitó la mezcla y se dejó reposar 2 h a temperatura ambiente para desesterificar la pectina. Para neutralizar el ácido sódico se añadieron 10 mL de ácido clorhídrico 0,1 N y la mezcla se agitó hasta la desaparición del color rosa. De nuevo se añadieron tres gotas de fenolftaleína y la mezcla se volvió a valorar con hidróxido sódico al 0,1 N. Se anotó el volumen gastado de sosa (V_2) hasta la aparición de nuevo del color rosa. Este segundo volumen gastado nos permitió calcular el número de grupos carboxi esterificados mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de esterificación (\%)} = \frac{V_2\ (mL)}{V_1(mL)+V_2(mL)} \times 100$$

En las frutas la gran mayoría de los grupos ácidos del ácido galacturónico se encuentran esterificados con metanol (Figura 39). Este metanol se puede perder con relativa facilidad mediante hidrólisis ácida o enzimática. En función del número de restos de ácido galacturónico esterificados, las pectinas se clasifican como grado de esterificación alto cuando este es superior al 50% y bajo cuando es inferior al 50%.

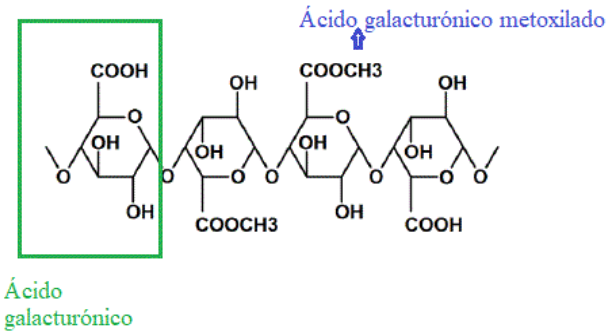


Figura 39: Ácido poligalacturónico metoxilado.

4.5.4. Azúcares y ácidos orgánicos.

La determinación de azúcares y ácidos orgánicos se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Colina-Coca *et al*. (2014). Se partió de 0,1 g de muestra liofilizada de manzana y cebolla (APH y no APH). Las muestras se mezclaron con 10 mL de etanol al 70% y se calentaron hasta ebullición durante 10 min. Posteriormente la mezcla se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min y se separaron los sobrenadantes. El residuo se mezcló con otros 10 mL de etanol al 70%, se agitó unos segundos en vórtex, se sonicó durante 5 min y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 min. Los dos sobrenadantes se mezclaron y evaporaron a 40 ºC utilizando un evaporador a vacío. Por último, el extracto seco se reconstituyó con 10 mL de agua ultrapura y se almacenó a -20 ºC hasta su análisis.

Para la determinación de azúcares y ácidos orgánicos se empleó un cromatógrafo iónico Advanced (Metrohm AG, Suiza) compuesto por una bomba (IC Pump 812), un desgasificador acoplado (IC-837), un dispensador 800 Dosino y un software de control (Metrodata IC Net 2.3). Para la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa en los extractos de manzana y cebolla se empleó el detector de pulsos amperométrico (modulo

817 BioScan), una columna Metrosep Carb 1 (250 x 4mm, 5 µm de tamaño de partícula), 20 mM de hidróxido sódico como fase móvil, un flujo de 1 mL/min, un volumen de inyección de 20 µL y un tiempo de análisis de 50 min. Para la identificación y cuantificación de los azúcares se emplearon patrones externos de D-(+)-glucosa, D-(-)-fructosa y sacarosa. Las extracciones se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron como gramo por 100 g de peso seco.

El análisis de ácidos orgánicos en muestras liofilizadas de manzana y cebolla se realizó utilizando el detector de conductividad (IC 819). Para la determinación de piruvato, ascorbato, malato y acetato se empleó una columna Metrosep Organic Acid (250 x 4mm, 5 µm de tamaño de partícula), 0,5 mM de ácido perclórico como fase móvil, un flujo de 0,5 mL/min, un volumen de inyección de 20 µL y un tiempo de análisis de 30 min.

Para la determinación de citrato y fumárico se utilizó una columna Metrosep ASupp5 (250 x 4mm, 5 µm de tamaño de partícula), 15 mM de carbonato sódico como fase móvil, 50 mM de H_2SO_4 como supresor, un flujo de 0,8 mL/min, un volumen de inyección de 20 µL y un tiempo de análisis de 15 min. Para la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos se utilizaron patrones comerciales de acetato, formiato, tartrato, citrato, succinato malato, lactato, ácido fumárico, L-ascorbato sódico y piruvato sódico. Las extracciones se hicieron por triplicado y los resultados se expresaron como miligramo por 100 g de peso seco (gramos por 100 g de peso seco en el caso del malato). Este análisis fue realizado en colaboración con la Unidad de Servicio de Técnicas Analíticas, Instrumentales y Microbiológicas del ICTAN (USTA).

4.6. Análisis de compuestos fenólicos.

4.6.1. Extracción de compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla.

Para la extracción de los compuestos fenólicos de las muestras liofilizadas no tratadas y tratadas por APH de manzana y cebolla se emplearon dos métodos: una extracción utilizando una solución hidrometanólica (metanol/agua, 80:20, v/v) y otra utilizando un tampón fosfato salino (PBS) a pH 6,8.

Extracción hidrometanólica: Para la extracción de los compuestos fenólicos se utilizó 1 g de muestra liofilizada de manzana (APH y no APH) o 0,5 g en el caso de la cebolla (APH y no APH). Las muestras se mezclaron con 12,5 mL de la solución de extracción

metanol/agua 80:20 (v/v) en Omnimixer a 8000 rpm durante 4,5 min (modelo ES-270, Omni International Inc., Gainesville, VA, Estados Unidos). Las mezclas fueron centrifugadas a 8000 g a 4 ºC y 15 min. Se recogió el sobrenadante y el residuo se volvió a extraer con 12,5 mL de la solución hidrometanólica. La mezcla se agitó en vórtex durante 1 min y se volvió a centrifugar. Los dos sobrenadantes se juntaron y evaporaron a 40 ºC utilizando un evaporador a vacío. Por último, los extractos se reconstituyeron con 10 mL de metanol y se mantuvieron a -20 ºC hasta su análisis. Las extracciones se hicieron por duplicado.

Extracción con tampón PBS: En la extracción con tampón PBS, 1 g de muestra liofilizada de manzana no tratada y tratada por APH o 0,5 g en el caso de la cebolla se mezclaron con 10 mL de PBS (pH 6,8) utilizando un Omnimixer (8000 rpm, 4,5 min) y posteriormente se llevó a agitación en baño a 37 ºC durante 30 min. A continuación, las muestras se centrifugaron a 8000 *g*, 4 ºC y 15 min. El residuo se volvió a extraer con 10 mL de PBS y de nuevo se centrifugó. Los dos sobrenadantes se unieron y se anotó el volumen final del extracto. Las extracciones se hicieron por duplicado.

4.6.2. Extracción de compuestos fenólicos a partir de los digeridos de la digestión gastrointestinal dinámica in vitro.

En el caso de las muestras obtenidas de la digestión gastrointestinal dinámica *in vitro*, alícuotas de 10 mL de fase oral, digerido gástrico, digerido intestinal y fracción bioaccesible se liofilizaron. La extracción de los compuestos fenólicos tuvo lugar tras añadir 10 mL de metanol a las muestras liofilizadas de fase oral, digerido gástrico e intestinal y 1,5 mL a la muestra de fracción bioaccesible. Las mezclas se agitaron en vórtex durante 2 min, se centrifugaron a 8000 *g* durante 15 min y 4 ºC y se almacenaron a -20 ºC hasta su análisis. Antes de ser inyectadas en el sistema cromatográfico, los extractos se filtraron con filtros de 0,45 µm. Las extracciones se hicieron por duplicado.

4.6.3. Análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS.

La separación e identificación de los compuestos fenólicos a partir de los extractos hidrometanólicos de las muestras liofilizadas de manzana y cebolla (APH y no APH) y del suplemento dietético de quercetina, así como sus correspondientes digeridos obtenidos de

las distintas fases de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se realizó por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas-masas (HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS). El equipo, Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbroon, Alemania), está compuesto por una bomba cuaternaria (G1311A) con un desgasificador integrado (G1322A), un inyector automático termostatizado (G1367B), un módulo termostatizado de columna (G1316A), un detector de diodos (DAD) (G1315B) y un espectrómetro de masas híbrido con detector cuádrupolo tiempo de vuelo y fuente de ionización a presión atmosférica por electrospray (ESI) con tecnología Jetstream (Agilent G6530A Accurate Mass Q-TOF LCMS, Waldbroon, Alemania).

Para la separación de los compuestos fenólicos se utilizó una columna de fase reversa C_{18} Hypersil ODS (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) mantenida a 30 ºC. Como fase móvil se utilizó una solución de ácido fórmico al 0,1% (Solución A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo (Solución B). El gradiente utilizado para la separación fue el siguiente:

Tabla 8: Gradiente utilizado en los análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS y HPLC-DAD.

TIEMPO (min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	95	5
20	70	30
30	70	30
35	20	80
40	95	5

El volumen de inyección fue 20 µL y el flujo se fijó en 1 mL/min. En el detector de UV-vis de diodos (DAD), se fijaron tres longitudes de onda: λ=360 nm (flavonoles), λ=320 (ácidos hidroxicinámicos) y λ=280 (dihidrochalconas y flavan-3-oles). El espectro de masas fue adquirido en modo negativo con un rango de masas de 100 a 1000 (m/z). Como gas de colisión y nebulización se utilizó nitrógeno de alta pureza. Las condiciones del electrospray fueron las siguientes: voltaje del capilar 3500 V, voltaje del fragmentador 100 V, presión de nitrógeno 45 psi, flujo del nebulizador 10 L/min, temperatura del aire de secado 350 ºC, voltaje del octopolo 750 V, voltaje del skimmer 65V. Los parámetros para la tecnología JetStream fueron: temperatura del nitrógeno sheath gas 350 ºC y flujo 11L/min. La energía de colisión del MS/MS se fijó en 20V. Las masas de referencia utilizadas fueron 119,03632000 y 966,00072500. Los datos fueron adquiridos y procesados utilizando el programa Masshunter Qualitative Analysis B.07.00. Los datos de MS y

MS/MS se procesaron a través del programa Masshunter Workstation software (versión B.04.00, Agilent Technologies, Waldronn, Alemania). La identificación de los compuestos fenólicos de las muestras fue posible por la comparación de los datos publicados en bases de datos (Phenol-Explorer, Chemspider, MassBank, entre otras) y los datos obtenidos del espectro UV-vis y del espectro de masas (MS) y el espectro de MS/MS de patrones comerciales inyectados en el sistema (Figura 40).

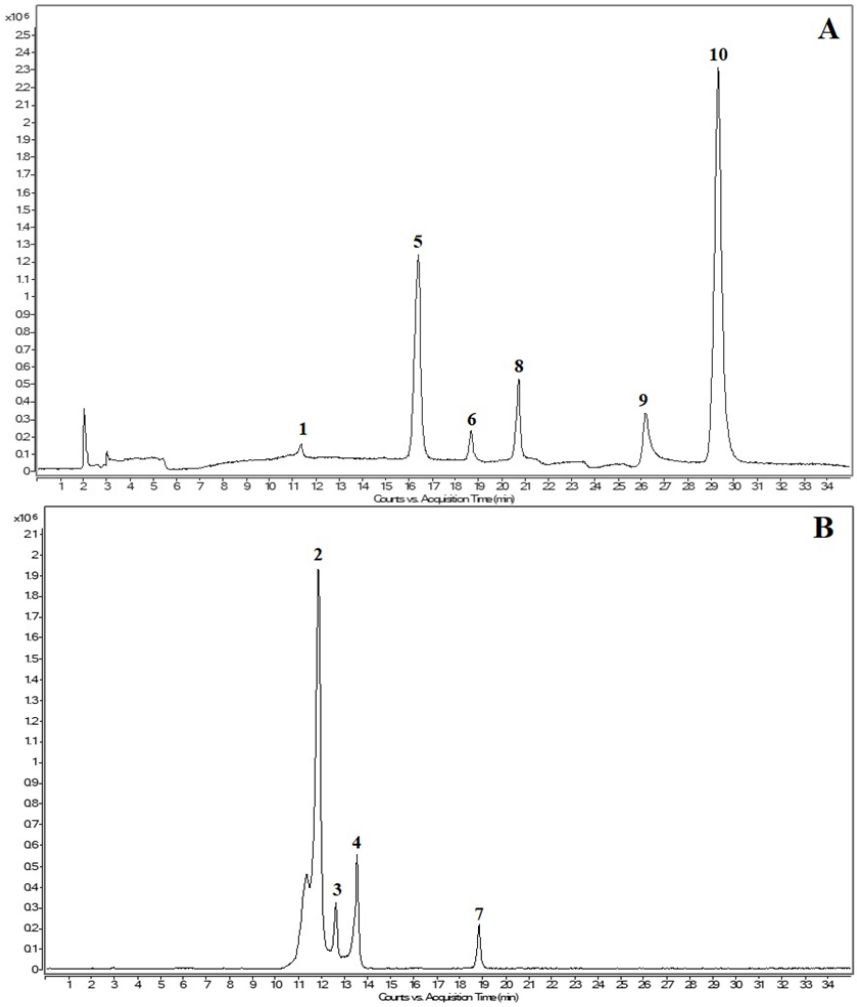


Figura 40: EIC (Extract Ion Chromatogram) de los multipatrones A y B. Picos: (1) (+)-catequina, (2) ácido clorogénico, (3) procianidina B2, (4) (-)-epicatequina, (5) ácido *p*-cumárico, (6) Q-3-galactósido, (7) Q-3-glucósido, (8) florizina, (9) quercetina, (10) floretin.

4.6.4. Análisis por HPLC-DAD.

La separación, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en los extractos hidrometanólicos y con PBS de manzana y cebolla (APH y no APH) y del suplemento dietético de quercetina y de sus correspondientes digeridos obtenidos de las

distintas fases de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se realizó por cromatografía líquida de alta resolución utilizando un detector de UV-vis de diodos (HPLC-DAD). El equipo utilizado fue un HPLC modelo Agilent-1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbroon, Alemania) que cuenta un detector de diodos (DAD) de UV-vis (G1315B), una bomba cuaternaria (G1311A), un desgasificador (G13279A), un inyector automático (G1329A) y un compartimento termostatizado para la columna (G1316A). Se utilizó una columna de fase reversa C_{18} Hypersil ODS (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) termostatizada a 30 ºC, la misma que la utilizada para los análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS. El sistema estuvo controlado por el software HP Chemstation.

El gradiente de la fase móvil, volumen de inyección, flujo y las longitudes de onda monitorizadas para las distintas familias de compuestos fenólicos fueron las mismas que las usadas en el análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS (Tabla 8). Se utilizaron distintas curvas de patrones comerciales para la identificación (en base a su tiempo de retención y espectro de absorción) y cuantificación de los compuestos fenólicos presentes en las muestras (Tabla 9). La Figura 41 muestra los cromatogramas a 280 nm, 320 nm y 360 nm de una muestra de manzana 'Golden Delicious' sin procesar por APH procedente de Aragón. La Figura 42 muestra un cromatograma a 360 nm de una muestra de cebolla 'Recas' sin procesar por APH.

Tabla 9: Curvas patrones para la cuantificación de los compuestos fenólicos en muestras liofilizadas de manzana y cebolla sin procesar y procesadas por APH.

	Alimento	TR	Curva	r^2	Concentración (µg/mL)
Quercetina	M, C	26,2	y = 62,439x - 37,263	0,9959	15,6-0,5
Quercetin-3-glucósido	M, C	18,8	y = 62,634x - 17,964	0,9999	550-0,41
Quercetin-3-galactósido	M	18,6	y = 32,409x - 15,273	0,9995	36-0,56
Quercetin-3,4'-diglucósido	C	16,1	y = 19,986x + 55,63	0,9965	350-0,9
Isoramnetin-3-glucósido	C	21,1	y = 40,45x + 5,9539	0,9999	62-1,9
Ácido clorogénico	M	11,9	y = 52,536x - 80,844	0,9998	250-3,9
Ácido *p*-cumárico	M	16,4	y = 142,55x - 25,401	0,9981	5-0,63
Catequina	M	11,3	y = 7,9688x - 4,9251	0,9986	50-1,6
Epicatequina	M	13,7	y = 10,557x + 12,128	0,9992	200-0,8
Procianidina B2	M	12,6	y = 9,6856x - 7,5546	0,9988	200-0,5
Floretin	M	29,4	y = 71,247x + 18,496	0,9999	50-0,8
Florizina	M	20,7	y = 45,168x - 2,5893	1	50-0,4

M, manzana; C, cebolla

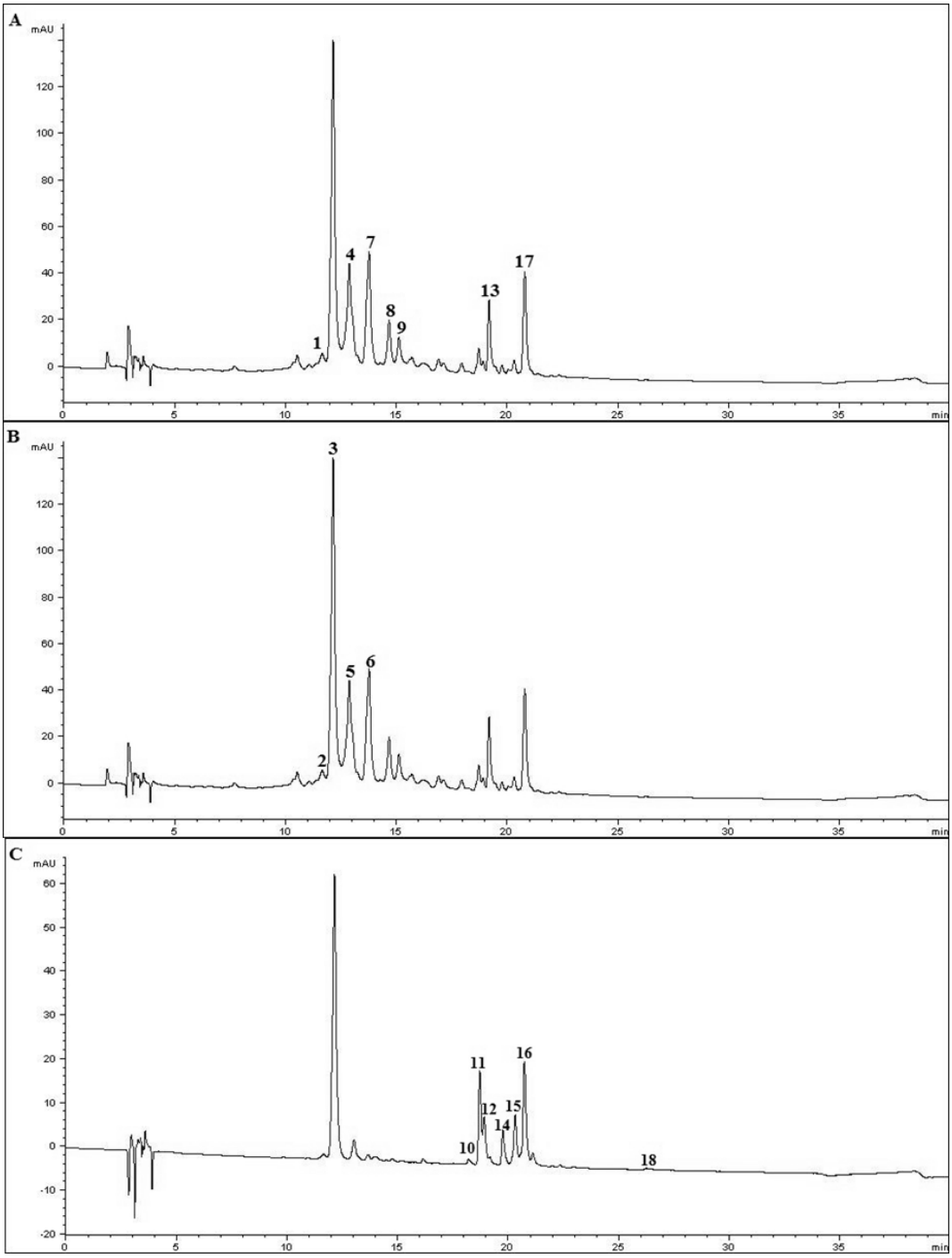


Figura 41: HPLC-DAD cromatograma de manzana 'Golden Delicious' procedente de Aragón; A) 280 nm, B) 320 nm, C) 360 nm. Picos: (1) (+)-catequina, (2) ácido neoclorogénico, (3) ácido clorogénico, (4) procianidina B2, (5) ácido criptoclorogénico, (7) (-)-epicatequina, (8) trímero de epicatequina, (9) dímero de epicatequina, (10) Q-3-rutinósido, (11) Q-3-galactósido, (12) Q-3-glucósido, (13) floretin-2'-xiloglucósido, (14) Q-3-arabinósido, (15) Q-3-xilósido, (16) Q-3-ramnósido, (17) florizina, (18) quercetina.

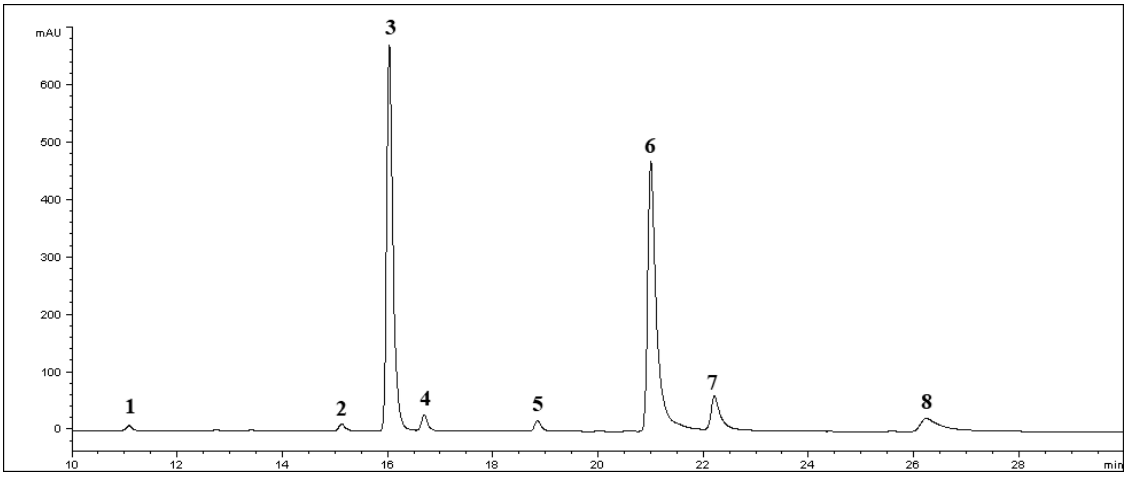


Figura 42: HPLC-DAD cromatograma de cebolla 'Recas' a λ=360 nm. Picos: (1) Q-3,7,4'-triglucósido, (2) Q-7,4'-diglucósido, (3) Q-3,4'-diglucósido, (4) Isoramnetin-3,4'-diglucósido, (5) Q-3-glucósido, (6) Q-4'-glucósido, (7) Isoramnetin-4'-glucósido, (8) Quercetina.

4.6.5. Determinación espectrofotométrica de flavonoles totales.

La determinación de flavonoles totales en los extractos hidrometanólicos de manzana y cebolla se llevó a cabo utilizando la metodología descrita por Bonoli *et al.* (2004). En la cubeta de cuarzo se colocaron 100 µl del extracto y 900 µl de metanol y se llevó a cabo la lectura a 360 nm en el espectofotómetro (espectrofotómetro Ultrospec 4300 pro, Amersham Biosciences, UK, Ltd.). Para la cuantificación de los flavonoles totales se utilizó una curva de un patrón comercial de quercetina (1-50 µg/ml). Las muestras se analizaron por duplicado y los datos se expresaron como mg de equivalentes de quercetina (EQ)/g peso seco (ps).

4.7. Análisis de los productos de la fermentación colónica.

Los productos de la fermentación colónica de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH llegaron congelados desde AINIA (Valencia) y se almacenaron a -80 ºC en el ICTAN durante una semana. Posteriormente se liofilizaron (Liofilizador, modelo Lyoalfa, Telstar S.A, Barcelona, España) y guardaron a -20 ºC hasta su análisis.

4.7.1. Extracción y análisis de metabolitos fenólicos.

Extracción: Aproximadamente 25 mg de los productos de fermentación colónica liofilizados (se apuntó peso exacto) se agitaron con 1,5 mL de una solución de

metanol/agua ácida (80:20, v/v, agua al 0,1% de ácido fórmico) en vórtex durante 1 min y después se sonicaron durante 5 min. A continuación, se centrifugaron a 18894 *g* (Thermo Fisher Scientific™, Sorvall, mod. ST16R, Waltham, Massachusetts, EEUU) durante 15 min a 4 ºC. El sobrenadante se separó y se sometió a una nueva centrifugación en las mismas condiciones. El sobrenadante final (1 mL) se diluyó con agua ultrapura (0,5 mL para las muestras de manzana y 2 mL para las muestras de cebolla). Para el análisis de la quercetina aglicona, 1 mL del extracto se diluyó con 2 mL de una solución de metanol/agua (80:20, v/v). Las extracciones se realizaron por triplicado. Se prepararon un control de calidad (quality control-QC) (mezcla de 10 µL de todos los extractos) y un pool por cada zona de colon (mezcla de los extractos de colon ascendente, transversal y descendente). Por último, todos los extractos se filtraron con filtros de 0,22 µm antes de su análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS.

Análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS: La separación, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos y sus metabolitos se realizó por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS (características del equipo en apartado 4.6.3). Para la separación se empleó una columna Luna C18 de 50mm x 2mm, 3 µm con pre-columna (Phenomenex, Torrance, CA, EEUU). La fase móvil consistió en un gradiente lineal de 0,1% de ácido fórmico en agua ultrapura en las proporciones mostradas en Tabla 10. El flujo se fijó en 0,4 mL/min y el volumen de inyección en 10 µL.

Tabla 10: Gradiente utilizado en los análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS de metabolitos fenólicos.

TIEMPO(min)	Solución A (%)	Solución B (%)
0	95	5
15	80	20
25	50	50
30	20	80
40	95	5

El análisis se realizó en modo negativo, rango m/z 50-1000 (100-1000 para MS/MS) y nitrógeno de alta pureza como gas de secado, colisión y nebulización. Las condiciones de la fuente de ionización fueron las siguientes: voltaje del capilar 3 kV, temperatura del gas de secado 225 ºC, flujo del gas de secado 10 L/min, presión del nebulizador 45 psi, voltaje del fragmentador 125 V, voltaje del skimmer 65 V, voltaje del octopolo 750 V. Las

condiciones del JetStream fueron: temperatura del nitrógeno (sheath gas) 300 ºC y flujo 10 L/min. La energía de colisión empleada para el MS/MS fue de 15 eV.

Tabla 11: Curvas patrones para el estudio de los compuestos fenólicos y sus metabolitos en muestras de fermentación colónica *in vitro*.

COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	CURVAS	r^2
Metabolitos			
Ácido 3,4dihidroxifenilacético	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 2000000x-314292	0,993
Ácido 3,4dihidroxicinámico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 4000000x+12969	0,9994
Ácido 3-hidroxibenzoico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y= 4000000x-163189	0,9994
Ácido 3-hidroxifenilacético	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y= 1000000x-408441	0,9994
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 4000000x+293336	0,998
Ácido 4-hidroxibenzoico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 4000000x+515495	0,9949
Ácido 4-hidroxifenilacético	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 473282x-45671	0,9976
Ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 282798x-24614	0,9981
Ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico	2,1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 4000000x-20393	0,9995
Ácido benzoico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 161126x-4900,3	0,9994
Ácido ferúlico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 2000000x+25818	0,9999
Ácido cafeico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 8000000x+1000000	0,9941
Catecol	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 4000000x+653860	0,9944
Floroglucinol	5, 1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 209653x+5546,2	0,9974
Compuestos fenólicos			
Quercetin-3,4'-diglucósido	1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 3000000x+16929	0,9997
Quercetin-3-glucósido	1, 0,5, 0,05, 0,005,0,0005	y = 4000000x-10233	1
Isoramnetin-3-glucósido	1, 0,5, 0,05, 0,005	y = 5000000x+201790	0,9811
Ácido gálico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 3000000x+32989	1
Quercetin-3-galatósido	1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 3000000x-23417	0,9929
Catequina	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 3000000x-252958	0,9979
Epicatequina	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 3000000x+89283	0,9995
Procianidina B2	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 4000000x-214929	0,9992
Ácido clorogénico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 4000000x+16512	1
Ácido *p*-cumárico	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 4000000x-368762	0,9926
Floretin	5, 1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 9000000x-15059	0,9878
Florizina	1, 0,5, 0,05, 0,01	y = 3000000x+42775	0,9993

Los datos se procesaron a través del software MasshunterWorkstation (versión B.04.00, Agilent Technologies, Waldronn, Alemania). Para el análisis de los datos se utilizaron los programas Masshunter Qualitative Analysis B.07.00 y Masshunter Profinder B.08.00. La identificación se realizó comparando los espectros de masas con los datos obtenidos de patrones comerciales, bases de datos online (MassBank, Pubchem, Phenol-

Explorer, MoNA database) y con una base de datos propia creada a partir de trabajos publicados sobre compuestos fenólicos de manzana y cebolla y sus posibles metabolitos. Para la cuantificación de los compuestos fenólicos y sus metabolitos se emplearon curvas de patrones comerciales (Tabla 11). Para los compuestos fenólicos y metabolitos sin patrón comercial, se emplearon aquellos patrones con una estructura similar.

4.7.2. Extracción y análisis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

Extracción en manzana: La determinación de AGCC en los extractos de los productos de fermentación de manzana se realizó en base a un método previamente descrito (Primec *et al*., 2017). Aproximadamente 20 mg de las muestras del producto de fermentación colónica de manzana-APH liofilizada fueron extraídas con ácido fosfórico al 0,5% en una relación 0,01g/mL. Este extracto se diluyó con la misma mezcla de ácido fosfórico al 0,5% para obtener una concentración final de 0,005 g/mL. Una alícuota de 100 µL del extracto diluido se mezcló con 300 µL de ácido fosfórico al 0,5% y con 100 µL de patrón interno 788 µM metil valérico preparado con 0,5% de ácido fosfórico. Posteriormente las mezclas fueron extraídas con 1000 µL de n-butanol. Los patrones usados en el análisis también fueron extraídos con n-butanol. Los análisis por cromatografía de gases se realizaron usando la fase orgánica de n-butanol. Las extracciones se realizaron por duplicado.

Extracción en cebolla: La determinación de AGCC en los extractos de los productos de fermentación colónica de cebolla, se realizó según la metodología descrita por Castro-Gómez *et al*. (2014). Aproximadamente 200 mg de las muestras liofilizadas se mezclaron con 0,8 mL de agua ultrapura. De esta mezcla se cogieron aproximadamente 100 mg y se incorporaron 2 patrones internos de C9:0 y C13:0 (50 µL de una concentración de 1 mg/mL en diclorometano). Se adicionaron 2,5 mL de metóxido sódico (MetNa) con una concentración de 0,5 M. Se llevó a termoagitador a 80 ºC, 10 min y 1300 rpm. Durante esta etapa se produjo la metilación básica de la muestra. A continuación, se enfriaron las muestras con hielo y se añadió 1,83 mL de dimetilformamida. Después se llevó a cabo una metilación ácida tras añadir 3 mL de H_2SO_4 (1M) y termoagitar a 1300 rpm a 60 ºC durante 30 min. Después de enfriar los tubos, se añadió 1 mL de hexano y 7,5 mL de Na_2CO_3 al 6%. Por último, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm, 10 min y 0 ºC. La fase orgánica de hexano se llevó a un vial para su posterior análisis por cromatografía de gases unida a espectrometría de masas (GC-MS).

Análisis por cromatografía de gases de AGCC en manzana: El equipo empleado en el análisis de AGCC en las muestras de fermentación colónica de manzana-APH fue un cromatógrafo de gases Agilent GC 6890 con detector FID (Ionización por llama) y un inyector automático (G2613A) (Figura 43). La separación se realizó con una columna DB-WAXtr (100% polietilenglicol, 60 m, 0,325 x 0,25 mm). Como gas portador se empleó helio a un flujo de 1,5 mL/min. La inyección de las muestras en estado líquido se realiza mediante un liner sin división de flujo (splitless) con lana de vidrio, un volumen de inyección de 1 µL y una temperatura del inyector de 250 ºC. El gradiente de temperatura empleado fue: 2 min a 50 ºC, una rampa de 15 ºC/min hasta los 150 ºC, una rampa de 5 ºC/min hasta los 200 ºC y una rampa de 15 ºC/min hasta los 240 ºC lo que hace un tiempo completo de análisis de 41,3 min. La temperatura del FID fue de 260 ºC. El sistema se controló mediante el software MSD Chemstation E.02.00.493.



Figura 43: Agilent GC 6890 con detector FID.

La identificación de AGCC en las muestras de fermentación colónica de manzana-APH se realizó utilizando una solución estándar de FAMQ-004 AccuStandard conteniendo ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico, valérico, caproico y heptanoico (Tabla 12). La cuantificación se realizó utilizando un mix estándar WSFA-2 Mix Supelco (Sigma Aldrich) que contenía ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, isovalérico y valérico. Los ácidos caproico y heptanoico se cuantificaron utilizando la curva de calibración del isovalérico.

Tabla 12: Identificación ácidos grasos de cadena corta en muestras de fermentación colónica de manzana-APH.

COMPUESTO (min)	FORMULA	g/mol	TR
Acético	$C_2H_4O_2$	60,05	11,92
Propiónico	$C_3H_6O_2$	74,08	12,78
Isobutírico	$C_4H_8O_2$	88,11	13,09
Butiríco	$C_5H_{10}O_2$	88,11	13,79
Isovalérico	$C_5H_{10}O_2$	102,13	14,30
Valérico	$C_5H_{10}O_2$	102,13	15,18
Cáprico	$C_6H_{12}O_2$	116,16	16,95
Heptanoico	$C_7H_{14}O_2$	130,18	18,32
Metilvalérico (IS)	$C_6H_{12}O_2$	116,16	16,09

Análisis por cromatografía de gases de AGCC en cebolla: Los esteres metílicos de los ácidos grasos (FAMEs) fueron separados utilizando una columna capilar de sílice fundida CP-Sil 88 de 100m x 0,25mm de diámetro interno y 0,2 µm de tamaño de poro (Chrompack, Middelburg, Países Bajos) en un cromatógrafo de gases Agilent modelo 6890N (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, EEUU) equipado con un detector de MS Agilent 5973N. Las condiciones cromatográficas de separación fueron las siguientes: la columna se mantuvo a 70 ºC durante 1 min tras la inyección, a continuación, se inicia una rampa de temperatura de 7 ºC/min hasta los 170 ºC y se mantuvo esta temperatura durante 55 min. Luego se inició una nueva rampa de temperatura de 10 ºC/min hasta alcanzar los 230 ºC que se mantuvo 10 min. El tiempo total de análisis fue de 76,3 min. La temperatura del inyector se fijó en 250 ºC. Como gas portador se utilizó helio con una presión de entrada a columna de 0,2 MPa. El volumen de inyección se fijó en 1 µL con un split ratio de 1:25. Las condiciones del detector de MS fueron las siguientes: la temperatura de la línea de transferencia fue de 250 ºC, la temperatura de la fuente 230 ºC y la temperatura del cuadrupolo 150 ºC. Como fuente de ionización se utilizó el impacto electrónico a 70 eV. El modo de adquisición seleccionado fue el total ion chromatrogram (TIC) y un escáner de masas de 40 a 500 m/z.

Para la identificación de los picos se comparó con los datos de la Biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología y con los datos obtenidos de una mezcla de patrones de ácidos grasos de cadena corta (C2:0, C3:0, C4:0, C5:0, C7:0, C8:0, C9:0) (Figura 44) de Applied Science Laboratories Inc (Nueva York, EEUU). Para la cuantificación se utilizaron factores respuesta calculados a partir de la mezcla de patrones

y del patrón interno C9:0 (50 µL, 1 mg/mL) añadido a las muestras antes del proceso de metilación. Estos análisis fueron realizados en colaboración con el Grupo de Biomarcadores Lipídicos en Alimentación y Salud del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-UAM-CSIC), Madrid (España).

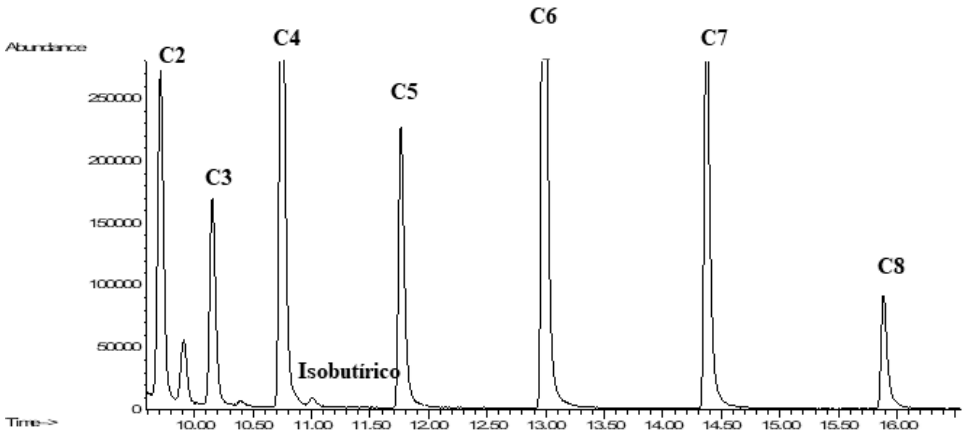


Figura 44: Cromatograma de patrones para la identificación de los ácidos grasos de cadena corta en muestra de colon descendente de cebolla-APH por GS-MS.

4.8. Actividad antioxidante.

4.8.1. Determinación mediante los ensayos DPPH•, ABTS•+, FRAP y Folin-Ciocalteu.

La actividad antioxidante de las muestras liofilizadas de manzana y cebolla (APH y no APH) se determinó utilizando 4 métodos, DPPH•, ABTS•+, FRAP y por el método de Folin-Ciocalteu para la determinación de fenoles totales (TP-FC). Los métodos DPPH• y ABTS•+ determinan la capacidad de las muestras de atrapar radicales libres. Los métodos FRAP y TP-FC evalúan la capacidad reductora de las muestras analizadas.

4.8.1.1. Capacidad secuestrante del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•).

La determinación de la actividad antioxidante por el método de secuestro del radical estable DPPH• se basa en la reducción de la absorbancia del radical DPPH• por compuestos antioxidantes. El radical DPPH• es un radical orgánico estable que presenta una fuerte coloración violeta y que en presencia de una sustancia antioxidante (donadora de un hidrógeno) se reduce, lo que da lugar a una disminución de la absorbancia y la aparición de un color amarillo pálido debido al grupo residual picrilo (Figura 45).

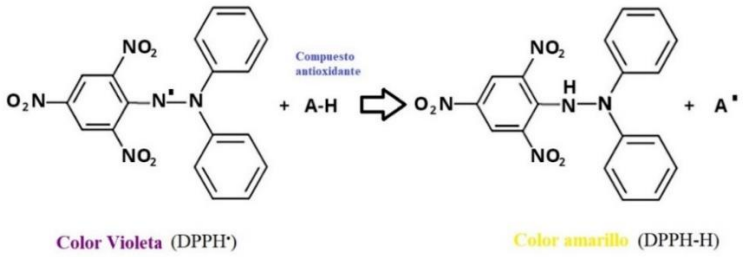


Figura 45: Secuestro del radical DPPH• por un compuesto antioxidante.

El ensayo se basó en el método descrito por Brand-Williams et al. (1995) adaptado para su lectura en microplaca de 96 pocillos. Para ello, 10 µL del extracto hidrometanólico de las muestras liofilizadas de manzana y cebolla (APH y no APH) se hizo reaccionar con 290 µL de una solución de 100 µM de DPPH• en metanol. La microplaca se dejó durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. El cambio de absorbancia fue medido a 515 nm (λmax DPPH•) en un espectrofotómetro con lector de microplacas (UV-vis) PowerWave XS BioTek (Agilent Technologies, Waldbroon, Alemania) (Figura 46). Los resultados se compararon con los de una curva de un patrón estándar de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox) que se trata de un análogo hidrosoluble de la vitamina E. Los resultados se expresaron como µmol de equivalentes de trolox por gramo de peso seco de muestra (µmol ET/g ps) como valor medio de cuatro repeticiones.



Figura 46: Espectrofotómetro con lector de microplacas (UV-vis) PowerWave XS BioTek.

4.8.1.2. Capacidad secuestrante del radical catión 2,2´-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato ($ABTS^{\bullet+}$).

La determinación de la capacidad antioxidante por el método del secuestro del radical catión 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) ($ABTS^{\bullet+}$) se basó en el método

descrito por Re et al. (1999) con una adaptación a microplaca de 96 pocillos. El radical $ABTS^{\bullet+}$ (7 mM) se obtiene tras la reacción de la sal de diamonio 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) con persulfato potásico (2,45 mM) durante una noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Se toman 1100 µL de la solución de $ABTS^{\bullet+}$ y se afora con etanol a 100 mL para obtener una absorbancia aproximada de 0,700 a 734 nm. El radical catiónico obtenido es un compuesto de color verde-azulado, estable y que pierde su coloración al ser estabilizado por una sustancia antioxidante (Figura 47). Del extracto hidrometanólico de las muestras de manzana y cebolla (APH y no APH), se toman 10 µL y se hace reaccionar con 290 µL de la solución de $ABTS^{\bullet+}$. La microplaca se incubó a 30 ºC durante 20 min y en oscuridad. La absorbancia de las muestras se midió a 734 nm. Los resultados se expresaron como µmol de equivalentes de trolox por gramo de peso seco de muestra (µmol ET/g ps) como valor medio de cuatro repeticiones.

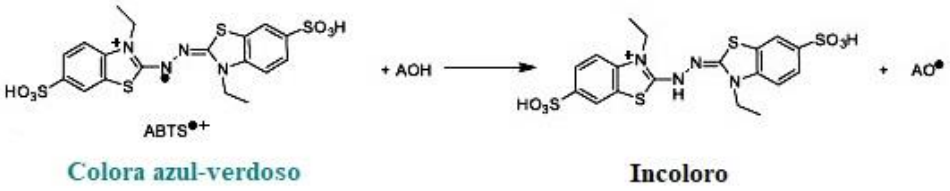


Figura 47: Estabilización del radical $ABTS^{\bullet+}$ por un compuesto antioxidante.

4.8.1.3. Capacidad reductora del ion férrico (FRAP).

La determinación de la actividad antioxidante mediante el ensayo de la capacidad reductora del ion férrico (Ferric Reducing Antioxidant Power-FRAP) se basó en el método publicado por Benzie y Strain (1996) con una adaptación para lectura en microplaca. Este método se basa en la capacidad que tiene una sustancia antioxidante de reducir el hierro férrico (Fe^{+3}) unido al 2,4,6, tripiridil-s-triazina (TPTZ) a ion ferroso a bajo pH, dando lugar a un complejo ferroso-TPTZ coloreado que absorbe a una longitud de onda de 593 nm (Figura 48). Para formar el reactivo FRAP, se preparó una solución 20 mM de cloruro férrico hexahidrato en agua, una solución 10 mM de TPTZ en HCl 40 mM y un tampón acetato (0,3 M, pH 3,6) y se mezclaron con una relación 10:1:1, v/v/v. El reactivo se preparó en el día y se mantuvo a 37 ºC hasta su uso. En la microplaca se colocan 10 µL de muestras (por cuadruplicado) y se mezclan con 290 µL del reactivo FRAP. La placa se incubó a 37 ºC durante 20 min en oscuridad. La absorbancia se midió a 593 nm y se utilizó

una curva de calibración con diferentes concentraciones de trolox. Los resultados se expresaron como µmol de equivalentes de trolox por gramo de peso seco de muestra (µmol ET/g ps) como valor medio de cuatro repeticiones.

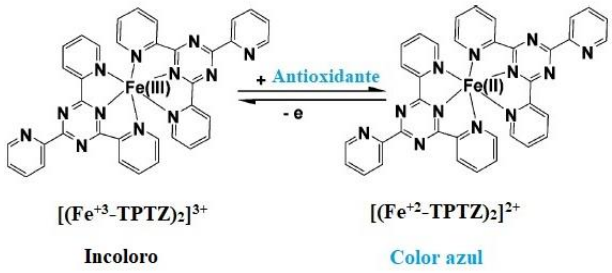


Figura 48: Mecanismo de acción del método FRAP.

4.8.1.4. Fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (TP-FC).

La determinación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin a pH básico dando lugar a una coloración azul determinada espectrofotométricamente a 765 nm. El reactivo Folin es una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico formando entre sí el ácido fosfomolibtúngstico de color amarillo que puede ser reducido por los grupos fenólicos para dar lugar a un complejo de coloración azul cuya intensidad se relacionará con el contenido en compuestos fenólicos (Figura 49).

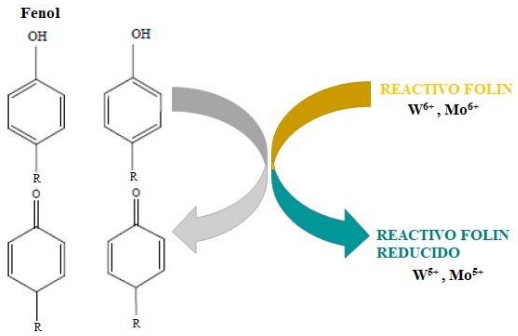


Figura 49: Mecanismo de acción del reactivo Folin-Ciocalteu.

La determinación de la actividad antioxidante por el método de Folin-Ciocalteu se realizó en base al método publicado por Singleton y Rossi (1985) con una adaptación al método de lectura en microplaca. Para ello, se utilizaron los extractos hidro-metanólicos de las muestras liofilizadas de manzana y cebolla. El método seguido fue el siguiente: 200 µL del extracto se hizo reaccionar con 2000 µL de una dilución 1:4 del reactivo Folin en agua

(v/v). La mezcla se agitó y se dejó reaccionar durante 5 min en oscuridad. Pasado ese tiempo, se añadieron 800 µL de una solución de carbonato sódico saturado. La mezcla se volvió a agitar y se dejó reaccionar durante 1 h en oscuridad. Pasado ese tiempo, 300 µL de la solución se colocó en la microplaca para su lectura a 760 nm en el espectrofotómetro de placas. Los datos se cuantificaron en base a una recta patrón de ácido gálico. Los resultados se expresaron como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de peso seco de muestra (mg EAG /g ps) como valor medio de cuatro repeticiones.

4.8.2. Modulación de la actividad lipoxigenasa, xantina-oxidasa y catalasa.

4.8.2.1. Inhibición de la actividad lipoxigenasa.

La lipoxigenasa (LOX) es una enzima implicada en el metabolismo oxidativo de los lípidos y en la formación de hidroperóxidos y otras especies oxidativas reactivas (ROS) implicadas en procesos inflamatorios y desarrollo de tumores. La medida de la capacidad inhibitoria de la LOX por los extractos hidrometanólicos de los ingredientes de manzana y cebolla (APH y no APH) y sus correspondientes digeridos obtenidos de las distintas fases de la digestión gastrointestinal *in vitro*, se ha realizado según los procedimientos descritos en varias publicaciones con algunas modificaciones (Gawlik-Dziki, 2012, Gawlik-Dziki, 2014, Sari *et al*., 2017).

La actividad LOX se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Ultrospec 4300 pro, Amersham Biosciences, UK, Ltd.) midiendo el incremento de la absorbancia a 234 nm cada 2 s durante un periodo de 5 min y a una temperatura de 25 ºC. La mezcla de reacción estaba formada por 100 µL de los extractos hidrometanólicos de las muestras (o 100 µL de metanol en el blanco) y 100 µL de una solución de lipoxigenasa (34160 U/mL) en tampón borato 200 mM a pH 9. A esta mezcla de reacción se añadieron 2,8 mL de una solución de ácido linoleico (250 µM) en el mismo tampón borato. El ácido linoleico se dejó previamente 15 min a temperatura ambiente para favorecer su oxidación. Las medidas se realizaron por cuadriplicado. Se calculó el % de inhibición según la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición enzimática (\%)} = \frac{\text{(A- B)-(C-D)}}{\text{(A-B)}} \text{ X } 100$$

A= Absorbancia del blanco a los 5 min de reacción
B= Absorbancia del blanco al inicio de la reacción
C= Absorbancia de la muestra a los 5 min de reacción
D= Absorbancia de la muestra al inicio de la reacción

Se calculó el IC_{50} o concentración de la muestra necesaria para reducir un 50% la actividad de la enzima.

4.8.2.2. Inhibición de la actividad xantina oxidasa.

La enzima xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de hipoxantina y xantina para formar ácido úrico, que por acumulación en las articulaciones da lugar al proceso inflamatorio conocido como gota. La actividad XO también está relacionada con la formación de especies oxigenadas reactivas causantes de daño en los tejidos vivos dando lugar a distintas patologías relacionadas con el envejecimiento, la inflamación y procesos cancerígenos.

La actividad de la XO se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Ultrospec 4300 pro, Amersham Biosciences, UK, Ltd.) midiendo el incremento de la absorbancia a 290 nm (formación de ácido úrico) cada minuto durante un periodo de 10 minutos y a una temperatura de 25 ºC. La metodología utilizada se basa en los procedimientos descritos por Gawlik-Dziki *et al*. (2017). La mezcla de reacción estaba formada por 1,8 mL de tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,5), 1,0 mL de solución de xantina 150 mM en el mismo tampón y 0,1 mL de los extractos hidrometanólicos de las muestras. Después de un periodo de incubación de 10 min a 25 ºC (hasta medida constante a 290 nm) se añadieron 0,1 mL de una solución de xantina oxidasa (EC 1.17.3.2) (0,1 U/mL) (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EEUU) en el mismo tampón y se procedió a su lectura en el espectrofotómetro a 290 nm. Se realizó también la medida de un blanco (con enzima y sin muestra inhibidora). Las determinaciones se realizaron por cuadriplicado. Se calculó el porcentaje de inhibición de la XO teniendo en cuenta la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición Enzimática (\%)} = 1 - \frac{\Delta A_{290}\ \text{nm /min muestra}}{\Delta A_{290}\ \text{nm/min blanco}} \text{ X } 100$$

ΔA_{290nm} muestra = incremento lineal de la absorbancia por min a 290 nm de las muestras (pendiente)
ΔA_{290nm} test = incremento lineal de la absorbancia del blanco por min a 290 nm (pendiente)

Se calculó el IC_{50} o cantidad de la muestra (mg de peso seco) necesaria para reducir un 50% la actividad de la enzima.

4.8.2.3. Efecto sobre la actividad catalasa.

La catalasa (CAT) es una enzima antioxidante que está implicada en numerosos mecanismos de defensa de la célula frente al daño oxidativo. CAT cataliza la conversión del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y O_2. La actividad CAT se determinó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Ultrospec 4300 pro, Amersham Biosciences, UK, Ltd.) midiendo la absorbancia a 240 nm (desaparición del H_2O_2) cada 30 s durante un periodo de 5 min y a una temperatura de 25 ºC. La determinación de la actividad CAT se realizó según los trabajos publicados por Gawlik-Dziki (2012) y Mitic-Culafic *et al*. (2016) con algunas modificaciones.

En primer lugar, se preparó una solución de 0,02 M H_2O_2 en tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7). Se midió la absorbancia de esta solución a 240 nm y se ajustó hasta conseguir una absorbancia entre 0,550-0,520. La mezcla de reacción consistió en 2,8 mL de la solución de H_2O_2 y100 µL del extracto hidrometanólico de las muestras (o 100 µL del tampón en el blanco). A continuación, se añadieron 100 µL de la solución de catalasa en el mismo tampón (100 U/mL) y se inició la lectura de las absorbancias a 240 nm.

Se determinó el porcentaje de actividad CAT residual que queda en presencia de las muestras estudiadas según la siguiente ecuación:

$$\%\text{Actividad enzimática residual} = \frac{\Delta A_{240}\ \text{nm/min muestra}}{\Delta A_{240}\ \text{nm/min blanco}}\ \text{X } 100$$

ΔA_{240nm} muestra= incremento de la absorción por min a 240 nm de la muestra (pendiente)

ΔA_{240nm} blanco = incremento en la absorción por min a 240 nm del blanco (pendiente)

Se calculó el IC_{50} o concentración de la muestra necesaria para mantener el 50% la actividad de la enzima.

5. ESTADÍSTICA.

En general, en los artículos que forman parte del Capítulo IV resultados se llevó a cabo un primer análisis estadístico de varianzas (ANOVA) unifactorial, comparando las medias de las muestras (manzana o cebolla) para los diferentes tratamientos (no tratada o tratada por altas presiones hidrostáticas), entre el mismo tratamiento y diferentes fases de digestión (no digerido, fase oral, fase de digestión gástrica, fase de digestión intestinal y fracción bioaccesible) y entre distintos tratamientos y misma fase de digestión. El test de Levene se utilizó para verificar la homogeneidad de las varianzas. Las diferencias significativas se obtuvieron mediante las pruebas de contrastes *post hoc*, Tamhane T2 (varianzas iguales no asumidas) y Tukey-b (varianzas iguales asumidas). La prueba t de Student se utilizó para comparar pares de medias y determinar la significación estadística (p<0,05) entre las variables. Las correlaciones de las variables se obtuvieron a través del análisis de correlación de Pearson. Los análisis se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics versión 23 (SPSS Inc., IBM, EEUU). En general, los resultados obtenidos se representan como media ± desviación estándar del análisis por triplicado de cada experimento (2 por muestra).

De forma complementaria, en el artículo 3 del Capítulo IV resultados, se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para estudiar la influencia de los efectos principales por separado (fases de digestión y tratamiento, fases de digestión y matriz alimentaria y matriz alimentaria) y los efectos de la interacción (fases de digestión x tratamiento, fases de digestión x matriz alimentaria y matriz alimentaria). Los análisis se realizaron con el programa Statgraphics Plus 5.1 (Statistical Graphics Corporation, Inc., Rockville, MD, EEUU). Los resultados se presentaron como media ± desviación estándar.

En el artículo 5 del Capítulo IV resultados se llevó a cabo un análisis de componentes principales (PCA) de la matriz de datos obtenidos mediante HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS utilizando el software MetaboAnalyst 4.0 (MetaboAnalystR package). Se utilizó como método de escalado Pareto y se realizó una transformación logarítmica.

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS

Artículo 1:

Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple 'Golden Delicious' from different geographical origin

Irene Fernández-Jalao, Concepción Sánchez-Moreno, Begoña De Ancos

Innovative Food Science and Emerging Technologies 51 (2019) 20–31

DOI: 10.1016/j.ifset.2018.06.002

Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple 'Golden Delicious' from different geographical origin

Irene Fernández-Jalao [a], Concepción Sánchez-Moreno [a], Begoña De Ancos [a, *]

[a]Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain.

*Corresponding author: Tel.: +34 915492300; fax: +34 915493627. E-mail address: ancos@ictan.csic.es (B. De Ancos).

ABSTRACT

The influence of high-pressure processing (HPP) (400, 500 and 600 MPa at 35 ºC for 5 min) on different classes of phenolic compounds and antioxidant activity (AA) of 'Golden Delicious' apple from two different growing regions, northeaster of Spain (lowland climate) (S-apples) and north of Italy (mid-mountain climate) (I-apples) was investigated. Total hydroxycinnamic acids, total dihydrochalcones and total flavan-3-ols content were higher in S-apple (untreated and HPP-treated) than in I-apples and total flavonols content was higher in I-apples. HPP affected phenolic compounds and AA depending on the apple geographical origin. 400 MPa/35ºC/5 min increased total flavonols (30%) and maintained total phenolic compounds determined by HPLC (TP-HPLC) in S-apples. The higher increase of TP-HPLC (54%) was achieved when I-apple was treated at 600 MPa. Untreated and HPP I-apples displayed higher AA than S-apples. HPP (400 and 600 MPa) increased AA in I-apple. Positive correlations were found between TP-HPLC and AA (TP-FC, $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP) in both Italian and Spanish apples.

Keywords: Apple, HPP (high-pressure processing), phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity

Industrial relevance: The apples of cultivar 'Golden Delicious' are one of the most consumed fruits in the UE. High-pressure processing (HPP) of these fruits acquires great importance to obtain ingredients and apple functional foods highly demanded by consumers. For this, it is necessary to know the process variables and plant material that favor greater extraction of phenolic compounds and antioxidant activity characteristics. This paper provides useful results to help fruit processor to select the appropriate HPP conditions and the geographical origin of 'Golden Delicious' apple to obtain apple-based products with high content on different classes of phenolic compounds with beneficial health effects.

Highlights

- HPP affected phenolic compounds of 'Golden Delicious' apples depending on geographical origin.
- 400 MPa increased flavonols and flavan-3-ols in Spanish GD-apples.
- 600 MPa increased all classes of phenolic compounds in Italian GD-apple.
- HPP Italian GD-apple exhibited higher antioxidant activity than Spanish GD-apple.

1. Introduction

Apples (*Malus domestica*) are one of the most consumed fruits in the European Union (EU). The total apple production in 2016 in the EU was 11779 mt being the most important cultivars 'Golden Delicious' (2406 mt), 'Gala' (1314 mt) and 'Idared' (965 mt) (Forecast, 2016). Due to their high consumption, apples and their processing products such as juices are a good source of soluble fiber and dietary phenolic compounds which are mostly responsible for the beneficial health effects of this fruit (Konopacka et al., 2010). The main groups of phenolic compounds found in apple are flavonoids such as flavonols (quercetin and its glycosides), flavan-3-ols ([-]-epicatechin, [+]-catechin, procyanidins) and dihydrochalcones (phloridzin and phloretin), as well as hydroxycinnamic acids which are mainly represented by chlorogenic acid (Awad, de Jager, & van Westing, 2000). Diets rich in flavonoids have been associated with a risk reduction of cardiovascular disease (Wang, Ouyang, Liu, & Zhao, 2014; Bondonno, Bondonno, Ward, Hodgson, & Croft, 2017) and some types of cancer (Woo & Kim, 2013) that could be related to their anti-inflammatory properties (Gil-Cardoso et al., 2016). Hydroxycinnamic acids have been found in most fruits and vegetables and have been investigated due to their high antioxidant potential and anti-inflammatory properties and their protective effect against cardiovascular diseases, certain types of cancer, diabetes and Alzheimer's disease, among others (El-Seedi et al., 2012). When assessing the beneficial effects of apple consumption, it should be noted that the composition of phenolic compounds of apple products depends on different factors such as cultivar, ripening stage, agricultural practices, environmental factors, growing region, post-harvest conditions and also the type of fruit processing and the extraction method employed (Kevers, Pincemail, Tabart, Defraigne, & Dommes, 2011). Lamperi et al. (2008) showed that growing region for the same variety mostly affected the phenolic composition on apple peel whereas for apple pulp no significant differences were detected.

Environmental factors such as lower temperature and a better exposure to light during maturity and harvest time might improve the content of total phenolic and total flavonoids in apple peel (Gonzalez-Talice, Yuri, & del Pozo, 2013; Musacchi & Serra, 2018). Also, the extraction procedures could provide significant differences in the phenolic composition of apple products**.** Polyphenols solubility depends on different factors such as chemical structure, solvent polarity, the complexity and chemical composition of the food matrix (Naczk & Shahidi, 2004). Polar solvents such as methanol or acetone are traditionally used in the extraction of phenolic compounds. The addition of water to organic solvents seems to increase the solubility of these compounds (Rajbhar, Dawda, & Mukundan, 2015). However, the use of buffer solutions like phosphate-buffered saline (PBS) instead of organic solvent could provide more realistic information on the proportion of phenolic compounds that could be actually extracted at the physiological level, for example, during the simulation of a gastrointestinal digestion of plant foods that is the initial phase to study the bioaccessibility and bioavailability of nutrients and bioactive compounds (Gawlik-Dziki, 2012).

The processing and storage of apples can produce important losses of nutrients and bioactive compounds due to the action of food enzymes such as polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) that are involved in different detrimental reactions such as the oxidation of phenolic compounds. Therefore, to ensure safe apple products with high sensorial, nutritional and functional quality, appropriate processing technologies that minimally affect the bioactive compounds such as phenolic compounds are required. Several alternative preservation technologies to thermal treatments have been developed in the last years, include both novel thermal technologies such as microwave, radio frequency and ohmic heating, and non-thermal technologies that use physical methods for microbial and enzyme inactivation such as high-pressure processing (HPP), pulsed electric fields,

ultrasonic waves, high-intensity pulsed light, irradiation, ultraviolet light and others (Sun, 2005). HPP consist in the application of pressure (100-900 MPa) to the food alone or in combination with low temperatures (0-50ºC) in a short time (from few seconds to several minutes) (Rastogi et al., 2007). HPP of fruit and vegetable products has been revealed as a useful tool to control microbial growth (Georget et al., 2015) and the activity of quality-degrading enzymes (Terefe, Buckow, & Versteeg, 2014) extending their shelf-life and quality as well as preserving their nutritional and functional characteristics avoiding the harmful effects of traditional thermal technologies (Oey, Van der Plancken, Van Loey, & Hendrickx, 2008). HPP causes changes in the plant food matrix which may results on improved extractability and bioaccessibility of bioactive compounds (Rodríguez-Roque, de Ancos, Sánchez-Moreno, Cano, Elez-Martínez, & Martín-Belloso, 2015). This behaviour has been also observed for apple-based products treated by HPP (juices and purées). Baron, Denes, & Durier (2006) observed significantly increases of hydroxycinnamic acids, catechins and procyanidins content in 'Judaine' apple juice after a HPP treatment at 400 MPa at 20 ºC for 10 min. Also, HPP at 500 MPa/25 ºC /3 min applied to 'Fuji' apple juice maintained the vitamin C and the antioxidant capacity and increased by 39% the total phenolic content (Kim et al. 2012). Similar results were found by Abid, et al. (2014) that observed a significantly increase of total phenolic compounds, total flavonoids and total flavonols contents and antioxidant capacity of an apple juice after a HPP at 450 MPa/25 ºC/10 min. Landl, Abadias, Sarraga, Viñas, and Picouet (2010), determined that vitamin C and total phenolic content in an acidified 'Granny Smith' apple purée was unaffected after HPP at 400 MPa/20 ºC/5 min employing an industrial-scale high pressure system. In general, HPP is an efficient process to reduce the microbial count (McKay, Linton, Stirling, Mackle, & Patterson, 2011) and to maintain or increase the bioactive compounds, antioxidant properties and the sensory characteristics of apple-based products (Yi et al.,

2017). Also physicochemical characteristics (pH, soluble solids and acidity), bioactive compounds (ascorbic acid and total phenolic compounds) and antioxidant capacity of HPP apple juice (430 MPa/7 min) remained unchanged during the shelf-life period studied of 34 days at 4 ºC (Juarez-Enriquez, Salmerón-Ochoa, Gutierrez-Mendez, Ramaswamy, & Ortega-Rivas, 2015). However, HPP apple-based products might have a limited shelf-life caused by undesirable colour and flavour changes due to residual enzyme activities (> 55%), mainly polyphenoloxidase (PPO) and peroxidase (POD) (Yi et al., 2017). In general, pressures higher than 400 MPa in combination with temperature (>35-40 ºC) has a synergic effect achieving higher PPO inactivation than 600 MPa at room temperature (Bukow, Weiss, & Knorr, 2009).

The aim of this study was to determine the effect of high-pressure processing (400, 500 and 600 MPa at 35 ºC for 5 min) on different phenolic compounds families and antioxidant activity of 'Golden Delicious' apples grown in two different European regions, Aragón in the Northeastern of Spain (lowland climate) and North of Italy (mid-mountain climate). Also, the efficiency of an aqueous-organic solvent *vs*. PBS for the extraction of different classes of phenolic compounds in apples was studied.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Methanol and acetonitrile (HPLC-grade) were supplied by Lab-Scan (Dublin, Ireland). Formic acid, sodium carbonate anhydrous, ethanol absolute (PRS), hydrochloric and acetic acid glacial were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium acetate trihydrate was from Merck (Darmstadt, Germany). Folin-Ciocalteu´s phenol reagent, iron (III)chloride anhydrous, 2,4,6-Tris-(2-pyridyl)-5-Triazine (TPTZ), 2,2´-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt ($ABTS^{\bullet+}$), 6- Hydroxy-2,5,7,8-

tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox), 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$), potassium persulfate, gallic acid, phosphate buffered saline (PBS), chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, quercetin, quercetin-3-O-glucoside, (-)-epicatechin (+)-catechin, procyanidin B2, phloretin and phloridzin dihydrate were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

2.2. Plant material

'Golden Delicious' apples from two different European regions, Aragón in Northeastern Spain (lowland climate) and North of Italy (mid-mountain climate) were purchased in a local supermarket in Madrid, Spain. These apples have been selected due to they are widely consumed in Spain and represent two different environmental and agricultural conditions for the same apple cultivar. Approximately 12 kg of each type of 'Golden Delicious' apples (Spanish and Italian) were selected according to uniform size and color and absence of external damages and stored at 4 °C until use. Four different batches of approximately 3 kg were prepared for each type of apple. One corresponded to the control (untreated) and the other three were separated to be processed by different HPP conditions. The apples of each batch were washed, divided into quarters without core, cut into pieces of 2 cm wide with skin and quickly packed in portions of 200 g of cut apple of each batch in very low permeability plastic bags (BB4L, Cryovac, Barcelona, Spain) and sealed with light vacuum. The packaged samples were kept at 4 ºC for 1 hour maximum before being processing by HPP.

2.3. Physicochemical and chemical parameters.

The physicochemical and chemical parameters of both Spanish and Italian apples are shown in Table 1. The water content (%), total soluble solids content (ºBrix) and the pH and acidity were determined according to the methodologies described by Plaza et al.

(2012). The determination of pectin content was performed according to the method described by Canteri-Schemin, Fertonani, Waszczynskyj, & Wosiacki, (2005). The extraction and analysis by HPLC-DAD of total vitamin C and ascorbic acid was carried out using the methodology described by Vázquez-Gutiérrez et al. (2013).

2.4. High-pressure processing (HPP) and lyophilization

Two bags of packed apples were placed into a high hydrostatic pressure vessel with a 2950 mL capacity where water was used as pressure-transmitting medium. Working temperature range was between -10 ºC to 60 ºC and the maximum pressure was 900 MPa (High pressure Iso-Lab System, Model FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power LTD., Essex, UK). Samples were treated at 400, 500 and 600 MPa for 5 min and a maximum temperature of 35 ºC during all treatments. The rates of compression and decompression were 3 MPa/s. A computer program controlled the pressure, time and temperature during the process. Untreated and HPP-treated samples were immediately frozen using liquid nitrogen and stored at -80 ºC until lyophilization (100 mTorr, -90 ºC) (model Lyoalfa, Telstar S.A, Barcelona, Spain). Lyophilized samples were pulverized in an ultracentrifugal grinder ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Germany) to obtain a fine powder (final size particle $\leq$ 0.5 mm) and maintained at -20 ºC until they were analyzed.

2.5. Extraction procedure

Two extraction methods were assayed. One method was an extraction with a traditional organic solvent solution for phenolic compounds (methanol/water, 80:20, v/v) and the other was the extraction with phosphate-buffered saline (PBS) at pH 6.8. The use of PBS as solvent extraction tries to mimic the physiological conditions of release of phenolic compounds from food matrix during the digestion process.

Lyophilized-pulverized apple samples (1 g of each untreated and HPP-treated) were homogenized with 12.5 mL of methanol/water (80:20, v/v) or 10 mL of PBS in a ultrahomogenizer at 8000 rpm for 4.5 min (model ES-270, Omni International Inc., Gainesville, VA, USA). In the hydro-methanolic extraction, the mixtures were centrifuged (7320 *g*, 4 ºC, 15 min) using a refrigerated centrifuge (Thermo Scientific Sorvall, mod. Evolution RC, Thermo Fischer Scientific Inc., USA). The pellet was re-extracted with 12.5 mL of methanol/water (80:20, v/v) and centrifuged again. Finally, the two supernatants were combined, evaporated at 40 ºC using a vacuum evaporator, reconstituted with 10 mL of methanol and stored at -20 ºC until the corresponding analysis were carried out. In the PBS extraction, after homogenization at 8000 rpm for 4.5 min, the samples were shaken at 37 ºC for 30 min and centrifuged (7320 *g*, 4ºC, 15 min). The pellet was re-extracted with 10 mL of PBS and centrifuged again. The two supernatant were combined and the total volume was annotated. Extraction of samples was done in duplicated.

2.6. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS-QTOF analysis of phenolic compounds.

The separation and identification of apple phenolic compounds was achieved using a high-performance liquid chromatography system coupled with UV-vis diode array detector (HPLC-DAD) and high-performance liquid chromatography–electrospray ionization-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (HPLC-ESI-QTOF-MS) according to the procedure described by Jakobek, García-Villalba, and Tomas-Barberán (2013). The analysis were performed in an Agilent 1200 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany), comprised of a quaternary pump (G1311A) with an integrated degasser (G1322A), thermostated automatic injector (G1367B), thermostated column module (G1316A), a diode detector array (DAD) (G1315B) and hybrid mass spectrometer quadrupole-time of flight via an electrospray ionization source (ESI) with JetStream technology (Agilent G6530A Accurate Mass Q-TOF LCMS, Waldbronn, Germany).

Separation was carried out on a reverse phase C_{18} Hypersil ODS stainless steel column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (Teknokroma, Barcelona, Spain) kept at 30 ºC. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in Milli-Q-water (A) and acetonitrile (B). Separation was carried out in 35 min under the following conditions: 0 min, 95% A; 20 min, 70% A; 30 min, 70% A; 35 min, 20% A; 40 min, 95% A. The column was equilibrated for 5 min prior to each analysis. Aliquots of extracts were filtered through a 0.45 μm membrane filter (Ref. E0034, Análisis Vínicos, Ciudad Real, Spain) before injection. The mobile phase flow rate was 1 mL/min and the injection volume was 20 μL. The compounds were monitored at 280 nm (flavan-3-ols and dihydrochalcones), 360 nm (flavonoids) and 320 nm (hydroxycinnamic acids), while mass spectra was acquired with electrospray ionization and the TOF mass analyzer in negative mode over the range *m/z:* 100-1000. Ultrahigh pure nitrogen was used as the collision gas and high-purity nitrogen as the nebulizing gas. The capillary voltage was set at 3500 V and fragmentor, 100 V. The ESI Jetstream parameters were: nitrogen pressure and flow-rate on the nebulizer at 45 psi and 10 L/min, respectively, with a drying gas temperature of 350 ºC; sheath gas temperature, 350 ºC; sheath gas flow, 11 L/min; and MS/MS collision energies was set at 20 V.

The data was acquiring and processing using Masshunter Qualitative Analysis B.07.00 software. The MS and MS/MS data were processed through MasshunterWorkstation software (version B.04.00, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Besides the observed MS and MS/MS spectra and data obtained by QTOF-MS analysis, the main tools for phenolic compounds identification were the interpretation of the observed MS/MS spectra in comparison with those found in the literature and several online databases (Phenol-Explorer [28], ChemSpider, MassBank, Spectral Database for Organic Compounds), and also the comparison of chromatographic behavior, DAD (UV-Vis) data and mass

spectral data generated by authentic standards (when it was possible) or related structural compounds.

The quantification of phenolic compounds was performed by HPLC-DAD using an Agilent 1100 series HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) consisting of a quaternary pump (G1311A), a solvent degasser (G1379A), a thermostatted autosampler (G1329A), a column compartment (G1316A) and photodiode array detector (DAD) (G1315B). The column and chromatographic conditions were the same as those used for separation and identification phenolic compounds by HPLC-ESI-MS-QTOF. Data acquisition and analysis were carried out using the Agilent Chemstation. Quantification was carried out by the integration of the peaks on UV-vis chromatograms at 360 nm for flavonols, at 320 nm for hydroxycinnamic acids and at 280 nm for flavan-3-ols and dihydrochalcones. Calibration curves of five points were established for each phenolic compound standard available: chlorogenic acid (from 1 to 250 µg/mL), *p*-coumaric acid (from 0.6 to 5 µg/mL), quercetin (Q) aglycone (from 0.5 to 16 µg/mL), quercetin-3-glucoside (from 0.4 to 550 µg/mL), quercetin-3-galactoside (from 0.6 to 36 µg/mL), (+)-catechin (from 1.6 to 50 µg/mL), (-)-epicatechin (from 0.8 to 200 µg/mL), procyanidin B2 (from 2 to 200 µg/mL), phloretin (from 0.8 to 50 µg/mL) and phloridzin dihydrate (from 0.4 to 50 µg/mL). The linear regression with correlation coefficient higher than 0.996 was obtained for each standard compounds. Detection limits (LODs) and quantification limits (LOQs) for each standard compound was determined as the lowest concentration that yielded a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively (LOD and LOQ): chlorogenic acid (0.021 and 0.071 µg/mL), *p*-coumaric acid (0.008 and 0.026 µg/mL), quercetin (0.024 and 0.079 µg/mL), quercetin-3-glucoside (0.001 and 0.004 µg/mL), quercetin-3-galactoside (0.006 and 0.022 µg/mL), (+)-catechin (0.050 and 0.170 µg/mL), (-)-epicatechin (0.048 and 0.161 µg/mL), procyanidin B2 (0.060 and 0.200 µg/mL), phloretin (0.005 and 0.016

μg/mL) and phloridzin dihydrate (0.06 and 0.021 μg/mL). Others compounds were quantified "as equivalent" using phenolic compounds of the same family with similar UV-vis spectrum. HPLC analysis of each sample was done in duplicated and the concentration was expressed as μg per gram of dry weight of lyophilized-pulverized apple samples (μg/g dw).

2.7. Antioxidant activity determinations

2.7.1. Total phenolic content (TP-FC)

TP-FC was performed in the hydro-methanolic extracts according to the Folin-Ciocalteu´s phenol procedure previously described by Singleton & Rossi (1965), including an adaptation for a 96-microplate (Bobo-García, Davidov-Pardo, Arroqui, Virseda, Marín-Arroyo, & Navarro, 2015). Absorbance was measured at 760 nm in a spectrophotometric microplate reader (PowerWave XS, Bio Teck, Vicenza, Italy). Quantification was achieved using a gallic acid external standard calibration curve in the range from 0 to 300 μg/mL. Total phenolic content in the hydro-methanolic extracts of both apples was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry weight of lyophilized-pulverized apple samples (mg GAE/g dw).

2.7.2. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH$^{\bullet}$) scavenging capacity assay

DPPH$^{\bullet}$ was prepared and assayed in the hydro-methanolic extracts according to the method described by Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995) including an adaptation of the method to 96-well microplate format. Absorbance was measured at 515 nm in a microplate reader. All samples were run in quadruplicate. Results were compared with a standard curve prepared with 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) (range from 0 to 500 μM), and expressed as μmol of trolox equivalents (TE) per gram of dry weight of lyophilized-pulverized apple samples (μmol TE/g dw).

2.7.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The total antioxidant powder of the hydro-methanolic extracts of samples was also evaluated by following the FRAP assay described by Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang, & Rice-Evans (1999) including an adaptation to 96-well microplate format. All samples were run in quadruplicate at 593 nm. Results were compared with a standard curve prepared with trolox (range from 0 to 500 µM) and expressed as µmol of trolox equivalents (TE) per gram of dry weight of lyophilized-pulverized apple samples (µmol TE/g dw).

2.6.4. 2,2´-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) scavenging capacity assay

This assay was carried out in the hydro-metanolic extracts of samples according to the method described by Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995). ABTS radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) was produced by reacting ABTS with potassium persulfate ($K_2S_2O_8$). Absorbance was measured at 734 nm in the spectrophotometric microplate reader. Results were compared with a curve of trolox (range from 0 to 500 µM) and expressed as µmol of trolox equivalents (TE) per gram of dry weight of lyophilized-pulverized apple samples (µmol TE/g dw).

2.7. Statistical analysis

The results shown represent mean values ± standard deviation of three replicates obtained in at least two separate experiments. One-way (type of sample) ANOVA was conducted followed by the Tamhane's T2 (equal variances not assumed) and Tukey's b (equal variances assumed) *post hoc* tests and Student's t test were used to compare pairs of means and determine statistical significance at the $p \leq 0.05$ level. The correlations within

307 variables were examined by Pearson correlation. All analyses were performed by using the
308 IBM SPSS Statistics 23 Core System (SPSS Inc, an IBM Company, USA).

309 **3. Results and discussion**

310 *3.1. Physicochemical and chemical parameters.*

311 The physiochemical and chemical characteristics of fresh apples showed few
312 differences between the two origins, Spain (Aragón) and Italy (North). In general, the
313 weight (g), size (mm) and water content (%) of Italian apples were higher than Spanish
314 apples. However, no significant differences were observed for pH, acidity, and pectin,
315 vitamin C and ascorbic acid contents between apples of the two different origins. Only the
316 total soluble solid content (TSS) of Spanish apples was higher than in apples from Italy
317 that could indicate a more maturity stage for Spanish apples (Ornelas-Paz et al., 2018).

Table 1. Physicochemical and chemical parameters of fresh 'Golden Delicious' apples from two different European regions, Aragón in the Northeastern of Spain (lowland climate) and North of Italy (mid-mountain climate).

	'Golden Delicious' Apples	
Parameters	**Spain (Northestern)**	**Italy (North)**
Fruit weight (g)	195.5 ± 9.3^{a}	237.3 ± 14.8^{b}
Size (mm)	$70\text{-}80^{a}$	$80\text{-}85^{b}$
Water content (%)	81.9 ± 0.3^{a}	83.7 ± 0.5^{b}
Total soluble solids (°Brix)	13.3 ± 1.1^{b}	11.6 ± 0.5^{a}
Ph	3.6 ± 0.04^{a}	3.5 ± 0.3^{a}
Acidity (g citric acid/ 100 g fw)	0.13 ± 0.01^{a}	0.12 ± 0.01^{a}
Pectin content (g/100 g fw)	0.45 ± 0.1^{a}	0.51 ± 0.1^{a}
Vitamin C (mg/100 g fw)	12.4 ± 0.9^{a}	11.2 ± 0.4^{a}
Ascorbic acid (mg/100 g fw)	7.7 ± 0.8^{a}	8.0 ± 0.9^{a}

Values are mean ± standard deviation (n=4); fw= fresh weight; Different small letter indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between apple origins.

3.2. Effect of high-pressure processing (HPP) on different phenolic compound families

The phenolic compound profile of untreated 'Golden Delicious' apple (GD-apple) from Spain is shown in the HPLC-DAD chromatograms (Fig. 1). Table 2 summarizes the phenolic compounds separated and identified by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS-QTOF in the hydro-methanolic extracts of untreated GD-apples from Spain. Seven flavonol compounds, four hydroxycinnamic acids derivatives, five flavan-3-ols and two dihydrochalcones compounds were identified (Table 2). The phenolic profile was similar for apples of both geographical origins, Spain and Italy, and also it was similar to those described in the literature for apples 'Golden Delicious' (Alarcón-Flores, Romero-González, Vidal, & Frenich, 2015).

Also, the qualitative phenolic composition identified in the PBS extracts of the two GD-apples was similar to that obtained in the hydro-methanolic extracts (chomatogram not shown). However, significant quantitative differences in the phenolic composition were found between apples of different geographical origin (Spain and Italy) (Table 3) and between the extracts obtained with two different solvents (PBS and methanol/water 80:20) using GD-apples of the same origin (Fig. 2). The effect of two different solvents in the extraction of different classes of apple phenolic compounds has been studied for total flavonols, total hydroxycinnamic acids, total flavan-3-ols and total dihydrochalcones. The total content of each family of phenolic compounds was obtained as the sum of individual compounds determined by HPLC-DAD (Fig. 2).

The effect of HPP (400, 500 and 600 MPa for 5 min at 35 ºC) on the main phenolic compounds families of GD-apples of two different geographical origin (Spain and Italy) determined by HPLC-DAD has been discussed below.

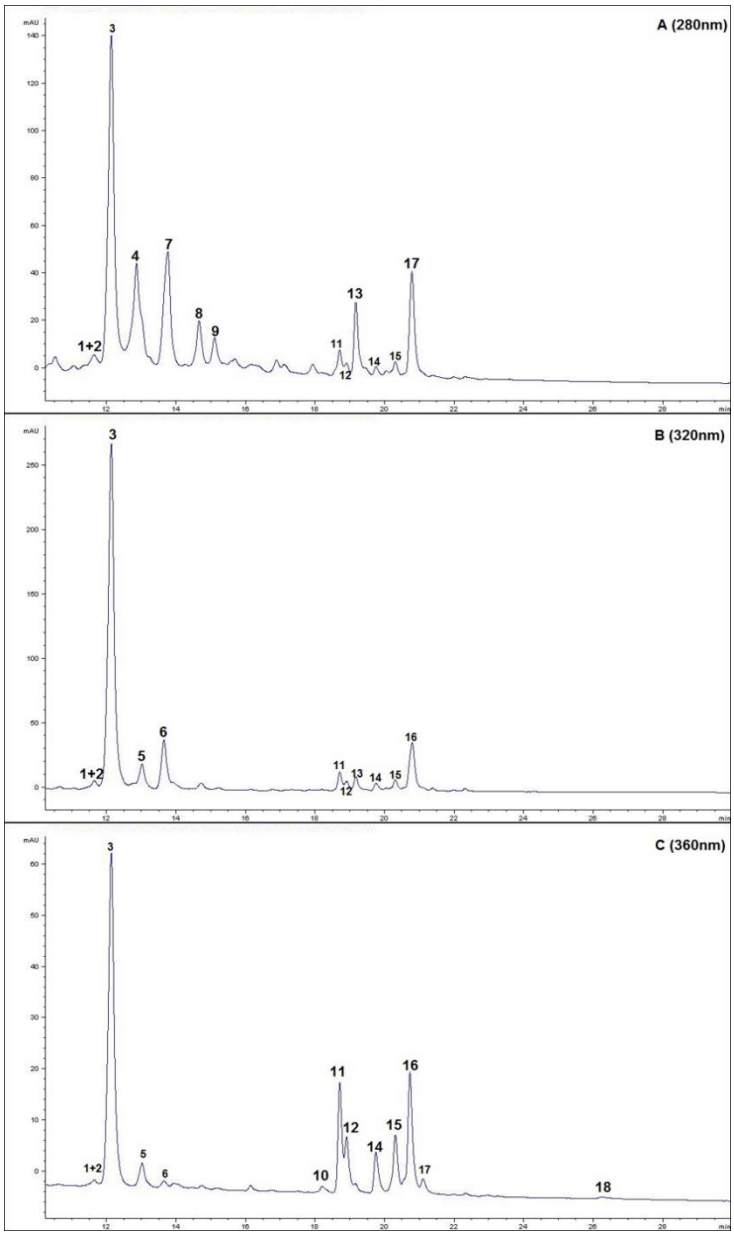


Fig.1. HPLC-DAD chromatograms of 'Golden Delicious' apple from Spain (Aragón) at 280 nm (A), 320 nm (B), 360 nm (C). Peaks: (1) (+)-catechin, (2) neochlorogenic acid, (3) chlorogenic acid, (4) procyanidin B2, (5) cryptochlorogenic acid, (6) coumaroyl quinic acid, (7) (-)-epicatechin, (8) trimer of epicatechin, (9) dimer of epicatechin, (10) Q-3-Rutinoside, (11) Q-3-Galactoside, (12) Q-3-Glucoside, (13) phloretin-2'-xyloglucoside, (14) Q-3-Arabinoside, (15) Q-3-Xyloside, (16) Q-3-Rhamnoside, (17) phloridzin, (18) quercetin. More details about peaks identification are provided in Table 2.

Table 2. Identification of phenolic compounds in 'Golden Delicious' apples by HPLC-DAD and HPLC-ESI-QTOF-MS analysis.

Family	Compound name	Peak[a] nº	Formula	tR (min)	λ_{max} (nm)	Molecular weight (M)	Major ESI peak *m/z* $[M-H]^-$ and fragments
Flavonols	Q-3-Rutinoside	10	$C_{27}H_{30}O_{16}$	18.13	260, 356	610.52	609.51, 239, 600
	Q-3-Galactoside	11	$C_{21}H_{20}O_{12}$	18.60	256, 356	464.1	463.09, 301
	Q-3-Glucoside	12	$C_{21}H_{20}O_{12}$	18.82	256, 354	464.1	463.09, 301
	Q-3-Arabinoside	14	$C_{20}H_{18}O_{11}$	19.65	256, 354	434.08	433.08, 301
	Q-3-Xyloside	15	$C_{20}H_{18}O_{11}$	20.23	256, 354	434.08	433.08, 301
	Q-3-Rhamnoside	16	$C_{21}H_{18}O_{11}$	20.66	256, 352	448.1	447.1, 301
	Quercetin	18	$C_{15}H_{10}O_7$	26.15	256, 370	302.05	301.04, 137, 153, 229
Hydroxycinnamic acids	Neochlorogenic acid	2	$C_{16}H_{18}O_9$	11.42	220, 300, 326	354.1	353.09, 191
	Chlorogenic acid	3	$C_{16}H_{18}O_9$	11.87	220, 300, 326	354.1	353.09, 191
	Cryptochlorogenic acid	5	$C_{16}H_{18}O_9$	12.76		354.1	353.09, 191
	Coumaroyl quinic acid	6	$C_{16}H_{18}O_8$	13.38	226, 310	338.1	337.09, 163, 173
Flavan-3-ols	Catechin	1	$C_{15}H_{14}O_6$	11.34	280	290.08	289.07, 179, 245, 271
	Procyanidin B2	4	$C_{30}H_{26}O_{12}$	12.64	280	578.14	577.13, 289, 407, 425, 451
	Trimer	8	$C_{45}H_{42}O_{18}$	14.50	280	865.20	
	Dimer	9	$C_{30}H_{28}O_{12}$	15.00	280	577	
	Epicatechin	7	$C_{15}H_{14}O_6$	13.56	280	290.08	289.07,179, 245, 271
Dihydrochalcones	Phloretin-2-xyloglucoside	13	$C_{26}H_{32}O_{14}$	19.08	228, 286	568.18	567.17, 239, 487
	Phloridzin	17	$C_{21}H_{24}O_{10}$	20.69	224, 284	436.14	435.13, 273

Peak nº, number in HPLC-DAD chromatograms in Figure 1.

341 *3.2.1. Flavonols*

342 Flavonols in Spanish and Italian GD-apples represented 7.5 % and 11 % of total
343 phenolic compounds determined by HPLC-DAD (3492.59 and 3032.01 µg/g dw,
344 respectively) (Table 3). This result agrees with flavonols percentage (6-15 %) previously
345 reported for apples (Vrhovsek, Rigo, Tonon, & Mattivi, 2004). Quercetin (Q) and its
346 glycosides derivatives are the most studied class of flavonoids in apples (Lee & Mitchell,
347 2012). The main quercetin glycosides separated, identified and quantified were Q-3-
348 rutinoside, Q-3-galactoside, Q-3-glucoside, Q-3-arabinoside, Q-3-xyloside and Q-3-
349 rhamnoside (Table 2). The two major flavonols found in both untreated Spanish and Italian
350 apples were Q-3-rhamnoside (83.52 and 97.12 µg/g dw, respectively) and Q-3-galactoside
351 (62.42 and 97.36 µg/g dw, respectively). These results were in agreement with previous
352 data reported in the literature for 'Golden Delicious' apple (Lee, Kim, Kim, Lee, & Lee,
353 2003)

354 HPP affected both individual (Table 3) and total flavonols content (Fig. 2) depending on
355 apple origin and extraction solvent. Regarding individual flavonols in the hydro-
356 methanolic extracts of GD-apple from Spain (S-apple), only HPP at 400 MPa produced a
357 significant ($p \leq 0.05$) increase (22-35%) of Q-3-galactoside, Q-3-glucoside, Q-3-
358 arabinoside, Q-3-xyloside and Q-3-rhamnoside. HPP at 500 MPa maintained the initial
359 concentration of the majority of Q-glycosides but decreased Q-3-galactoside (33%) and Q-
360 3-rutinoside (40%). HPP at 600 MPa decreased ($p \leq 0.05$) the concentration of all the
361 flavonols, being higher the decline (46-53%) in those flavonols with high molecular weight
362 and number of hydroxyl groups (Q-3-rutinoside, Q-3-galactoside and Q-3-glucoside) than
363 in the others (15-23% for Q-3-arabinoside, Q-3-xyloside and Q-3-rhamnoside).

Table 3. Concentration of phenolic compounds (μg/g dw) of untreated and HPP-treated 'Golden Delicious' apples from two different European regions[a].

Compounds	Spain (Aragón)				Italy (North)			
	Untreated	HPP-400	HPP-500	HPP-600	Untreated	HPP-400	HPP-500	HPP-600
Flavonols								
Q-3-Rutinoside	6.45±1.3^{cA}	7.03±0.3^{cA}	3.88±0.1^{bA}	3.20±0.1^{aA}	7.64±0.2^{bB}	9.48±0.5^{cB}	5.64±0.2^{aB}	14.40±1.3^{dB}
Q-3-Galactoside	62.42±6.0^{cA}	84.15±0.9^{dA}	41.52±2.5^{bA}	29.38±0.3^{aA}	97.36 ± 0.5^{aB}	140.57±2.9^{cB}	107.30±2.2^{bB}	201.55±14.8^{dB}
Q-3-Glucoside	34.49±1.4^{cA}	42.14±0.7^{dA}	26.06±1.4^{bA}	18.69±0.2^{aA}	33.18±0.9^{bA}	44.69±0.9^{cB}	30.10±1.0^{aB}	59.14±4.2^{dB}
Q-3-Arabinoside	26.48±0.8^{bA}	34.38±0.2^{cA}	25.81±1.2^{abA}	22.27±0.2^{aA}	35.22±0.1^{aB}	42.74±0.5^{cB}	37.70±0.4^{bB}	55.88±2.3^{dB}
Q-3-Xyloside	40.45±1.5^{bA}	53.34±0.3^{cA}	37.94±1.5^{bA}	31.25±0.2^{aA}	61.79±0.4^{aB}	77.14±0.4^{cB}	66.24 ±0.3^{bB}	104.03±5.4^{dB}
Q-3-Rhamnoside	83.52±2.3^{bA}	110.89±1.0^{cA}	83.53±4.0^{bA}	71.17±0.3^{aA}	97.12±0.5^{aB}	119.32±2.5^{cB}	103.49±1.2^{bB}	155.99±5.1^{dB}
Quercetin	7.31±0.33^{bA}	6.61±0.15^{aA}	BLQ	BLQ	8.72±0.13^{bB}	6.69±0.19^{aA}	6.91±0.18^{a}	7.13±0.03^{a}
Hydroxycinnamic acids								
Neochlorogenic acid	33.67±2.13^{bA}	30.60±0.45^{aA}	32.30±0.79^{abB}	32.27±0.91^{abA}	41.26±1.56^{bB}	38.07±1.76^{aB}	36.02±0.87^{abA}	42.86±0.50^{bB}
Chlorogenic acid	626.00±6.8^{cB}	348.75±5.0^{aA}	477.42±28.9^{bA}	535.13±1.0^{cA}	592.64±19.5^{bA}	491.09±27.7^{aB}	509.05±26.4^{aB}	775.47±15.4^{cB}
Cryptochlorogenic acid	63.59±0.8^{bB}	57.10±1.8^{aB}	55.68±1.1^{aB}	54.52±2.4^{aB}	45.14±5.1^{abA}	37.80±1.6^{aA}	41.74±2.3^{abA}	47.42±3.5^{bA}
Coumaroyl quinic acid	34.67±0.6^{cA}	28.68±0.3^{aA}	28.04±1.3^{abA}	30.35±0.1^{bA}	35.63±1.9^{aA}	33.06±2.0^{aB}	34.73±2.5^{aB}	53.65±2.6^{bB}
Flavan-3-ols								
Catechin	27.22±2.39^{abA}	26.41±0.48^{aA}	30.05±1.68^{bA}	29.95±0.69^{bA}	34.01±1.68^{aB}	38.35±2.37^{bB}	34.78±1.38^{aB}	44.22±0.66^{cB}
Procyanidin B2	915.48±3.8^{cB}	950.20±7.4^{dB}	839.30±5.4^{bB}	793.68±8.9^{aA}	745.14±25.9^{bA}	603.05±35.8^{aA}	671.83±15.7^{aA}	1035.72±30.9^{cB}
Trimer	338.34±12.7^{abB}	348.02±2.8^{bB}	305.68±4.6^{aB}	313.07±5.9^{aA}	283.33±18.7^{aA}	298.55±22.5^{aA}	289.10±1.9^{aA}	480.57±16.3^{bB}
Dimer	277.64±14.9^{abB}	294.60±6.7^{bA}	266.48±14.3^{abA}	252.61±6.3^{aA}	114.57±4.7^{aA}	299.21±27.8^{bA}	264.99±2.6^{bA}	391.57±7.6^{cB}
Epicatechin	763.01±18.4^{cB}	730.83±9.3^{cB}	635.94±13.7^{aA}	682.67±17.4^{bA}	678.85±19.9^{aA}	583.55±38.1^{aA}	651.47±21.7^{aA}	985.84±18.3^{bB}
Dihydrochalcones								
Phloretin-2-xyloglucoside	39.51±0.3^{cB}	35.81±0.8^{bB}	33.99±1.3^{abB}	32.99±0.5^{aA}	28.26±0.6^{bA}	28.05±1.6^{abA}	24.26±0.9^{aA}	42.61±3.3^{cB}
Phloridzin	112.34±1.4^{bB}	113.58±1.3^{bB}	94.76±3.5^{aA}	89.80±0.9^{aA}	92.13±2.9^{bA}	78.77±2.95^{aA}	105.49±2.1^{cB}	153.69±1.9^{dB}
TOTAL	3492.59±36.9^{cB}	3303.14±23.9^{bB}	3018.40±41.1^{aA}	3023.01±44.83^{aA}	3032.01±28.2^{aA}	2970.18±170.9^{aA}	3020.85±50.8^{aA}	4651.75±39.2^{bB}

[a]Data are expressed as the mean ± SD (n=4). Different small letters within row and apple origin (Italy or Spain) indicate significant differences (p<0.05) among HPP treatments. Different capital letters within row and treatment indicate significant differences (p<0.05) between apple origin. HPP treatments: 400, 500 and 600 MPa at 35ºC for 5 min. BLQ means below limit of quantification

In GD-apple from Italy (I-apple), all the HPP produced an increase of the Q-glycosides in the hydro-methanolic extracts (Table 3). HPP at 400 MPa on I-apple produced similar effect than on S-apple resulting in an increase of all Q-glycosides (21-44%). On the contrary, HPP at 600 MPa increased the concentration of all the flavonols studied, being this increase higher in Q-3-rutinoside, Q-3-galactoside and Q-3-glucoside (78-107 %) than in Q-3-arabinoside, Q-3-xyloside and Q-3-rhamnoside (31-68%).

The effect of HPP on Q-glycosides depended on the GD-apple origin and the parameters of treatment as has been reported for other food matrices such as onion. Thus, González-Peña, Colina-Coca, Char, Cano, de Ancos, and Sánchez-Moreno (2013), showed that HPP at 400 MP and 600 MPa/25 ºC/5 min increased significantly (p<0.05) up to 38% the major Q-glycosides in onion powder. In other study, HPP at 400 MPa/40 ºC/5 min improved the concentration of Q-3-rutinoside (47%) and quercetin (34-40%) in milk and soymilk fruit beverages (Rodríguez-Roque et al., 2015).

Total flavonols content (sum of individual flavonols determined by HPLC-DAD) in the hydro-methanolic extract was 31% higher in the untreated I-apple (341.05 µg/g dw) than in the Spanish one (261.11 µg/g dw) (Fig. 2). In both apples, the extraction with PBS was 30% and 47% lower than in the hydro-methanolic extracts of Spanish and Italian apples, respectively. No significant differences in total flavonols content (Italy, 179.95 µg/g dw and Spain, 184.29 µg/g dw) were found between the PBS extracts of GD-apples from two different origins (Fig. 2).

HPP increased total flavonols in the hydro-methanolic extracts of I-apples mainly at 600 MPa (75.4%) meanwhile total flavonols in S-apples only increased after 400 MPa (30%). This trend was similar to that observed for the major individual Q-glycosides in each type of GD-apple (Table 3). Also, significant total flavonols increase by 26% was observed in apple juice treated at 450 MPa/25 ºC/10 min (Abid et al., 2014). Different effect was

observed in the PBS extracts. Thus, HPP (from 400 to 600 MPa) decreased total flavonols concentration (from 33% to 72%) in the PBS extracts of S-apple while in the I-apple total flavonol declined by 39% at 400 MPa but increased by 7% at 600 MPa. I-apple treated at 500 and 600 MPa presented higher total flavonol content (146 and 266%, respectively) than S-apples in the PBS extracts (Fig 2).

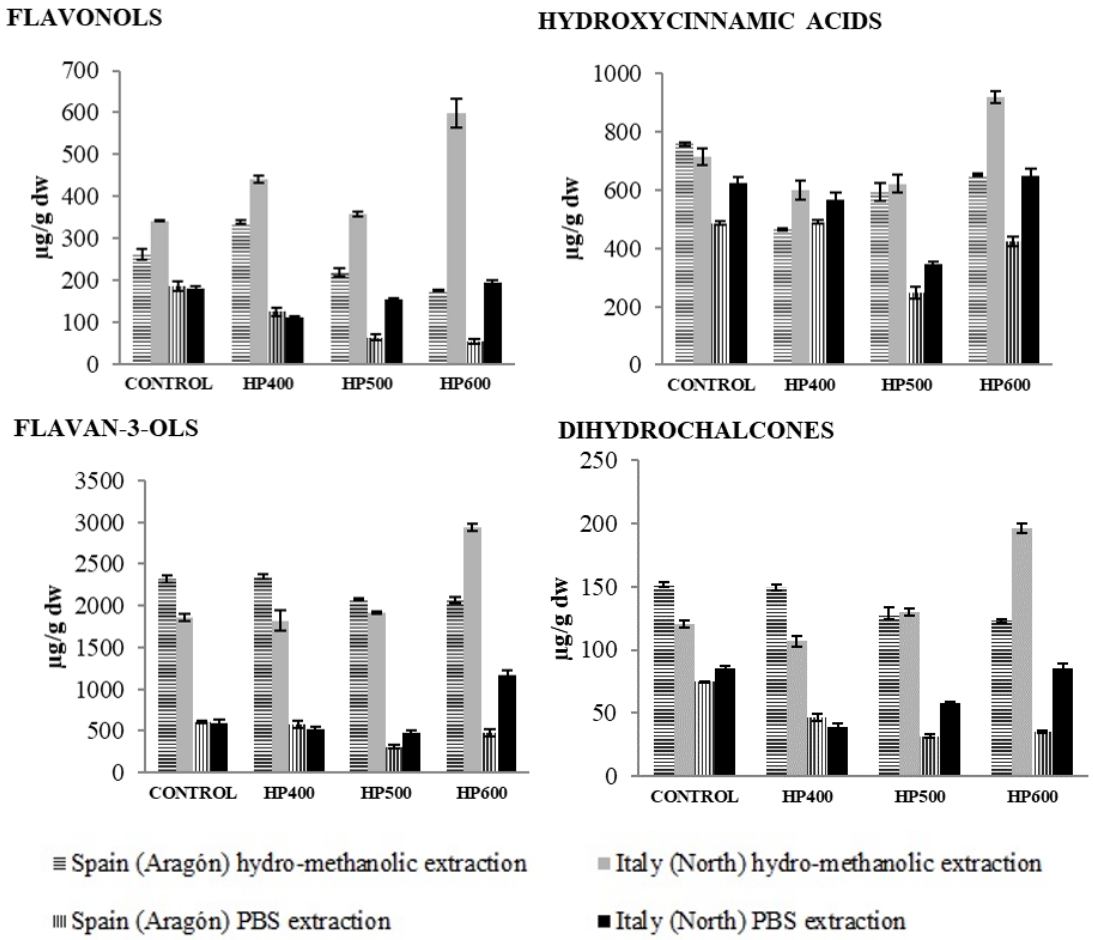


Fig 2. Effect of HPP and extraction solvent on total flavonols, total hydroxycinnamics acids, total flavan-3-ols and total dihydrochalcones in apples 'Golden Delicious' from two different origins, Aragón in Spain (lowland climate) and North of Italy (mid-mountain climate). Bars with horizontal lines correspond to 'Golden Delicious' apple from Spain and hydro-methanolic extraction. Bars with vertical lines correspond to 'Golden Delicious' apple from Spain and PBS extraction. Grey bars correspond to 'Golden Delicious' apple from Italy and hydro-methanolic extraction. Black bars correspond to 'Golden Delicious' apple from Italy and PBS extraction. The results are expressed as µg/g of dry weight.

395 The results obtained in the present study showed that the increase of individual or total
396 flavonol content observed in HPP plant-derived products could be due to this treatment,
397 producing changes in the membrane permeability and disruption of cell walls and cell
398 organelles and favoring the release of phenolic compounds from tissues improving their
399 extractability (González-Peña et al., 2013; Vázquez-Gutiérrez et al., 2013; Rodríguez-
400 Roque et al., 2015). This effect caused by HPP depends on the treatment parameters and
401 the composition of food matrix (Oey et al., 2008; Barba, Esteve & Frigola, 2012). The
402 decrease of flavonol compounds after certain HPP treatments observed in the present study
403 could be attributed to the existence of residual polyphenoloxidase and peroxidase activity.
404 The inactivation of these enzymes depends on the intensity and duration of HPP, the
405 combination with low or mild temperature, the characteristics of food matrix (pH, sugar
406 content, etc.) and the resistance of the enzyme to pressure (Koutchman, Popovic, Ros-
407 Polski & Popielarz, 2016). Also, the extraction with PBS significantly reduced the amount
408 of flavonols extracted when compared with an organic solvent such as methanol/water
409 (80:20, v/v). Therefore, flavonols presented a lower solubility in PBS than in aqueous
410 methanol. The extraction with an organic solvent seemed to be the best choice to extract a
411 greater amount of these compounds. These results are in agreement with those reported by
412 Vijayalaxmi, Jayalakshmi, and Sreeramulu (2015).

413 *3.2.2. Hydroxycinnamic acids*

414 Hydroxycinnamic acids (HA) derivatives were present in significant concentrations in
415 both apples, representing approximately 23% of total apple polyphenols (Table 3).
416 Chlorogenic acid (5-*O*-caffeoyl quinic acid) was the major HA found in the Spanish and
417 Italian untreated apples (626.0 and 592.64 µg/g dw, respectively). This result is consistent
418 with previous results reported for pulp, peel or whole apple (Tsao, Yang, Christopher, Zhu,
419 & Zhu, 2003; Wojdylo, Oszmianski, & Laskowski, 2008). Two chlorogenic acid isomers

were identified in all the samples as neochlorogenic acid (3-*O*-caffeoyl quinic acid) and cryptochlorogenic acid (4-*O*-caffeoyl quinic acid). Cryptochlorogenic acid showed a higher value in the S-apple than in I-apple (63.59 vs 45.14 µg/g dw). However, neochlorogenic acid content was higher in the untreated I-apple than in S-apple (41.26 vs 33.67 µg/g dw). Other hydroxycinnamic acid derivative found in both GD-apples identified as coumaroyl quinic acid showed similar concentration in both apples (34.67 and 35.63 µg/g dw, respectively). These compounds have also been described in other studies on apples (Marks, Mullen, & Crozier, 2007).

All the HPP assayed produced a significant decrease of the main HA-derivatives in S-apple (hydro-methanolic extracts). The decrease of chlorogenic acid was less as the intensity of HPP increased from a decline of 44% at 400 MPa to 14% after 600 MPa. Cryptochlorogenic acid, neochlorogenic acid, coumaroyl quinic acid showed similar decrease for all the HPP assayed (4-19%) and, in general, no significant differences were found between the three HPP treatments for each compound. In the I-apple, HPP at 400 MPa and 500 MPa did not affect the HA-derivatives except for cholorogenic acid that decreased significantly (14-17%). In contrast, HPP at 600 MPa resulted in an increase in the concentration of most of the HA-derivatives in I-apple: Chlorogenic acid (31%), neochlorogenic acid (4%) and coumaroyl quinic acid (51%). Thus, different behavior for HA-derivatives was observed for the same HPP but depending on the GD-apple origin. Baron et al. (2006) reported the increase by 31% of HA-derivatives in 'Judaine' apple juice after HPP at 400/20 ºC/10 min, meanwhile no significant changes were observed with 5 min of treatment. The decrease or increase of HA-derivatives content in apple-derived products due to HPP could be the result of two opposite effects as it was previously explained for flavonol compounds. One effect could be the increase of the release of phenolic compounds linked to the food matrix caused by the detrimental effects of HPP on

445 the cell structures (Kim et al., 2012; González-Peña et al., 2013; Vázquez-Gutiérrez et al.,
446 2013; Abid et al., 2014). The other effect could be the loss of phenolic compounds due the
447 action of residual enzyme activity (polyphenoloxidase and peroxidase). Both effects
448 depend on the HPP parameters, the combination with low or mild temperature and also the
449 characteristics of food matrix (Barba, Esteve & Frigola, 2012; Koutchman et al., 2016).
450 Regarding to total hydroxycinnamic acids (THA), significant differences were observed
451 between apple origins, solvent extraction and HPP assayed (Fig 2.). Untreated Spanish and
452 Italian apples showed similar THA content (757.94 and 714.67 µg/g dw, respectively) in
453 the hydro-methanolic extract that was significant higher than in PBS extract (486.96 vs
454 622.59 µg/g dw, respectively).
455 In S-apple, all the HPP assayed caused a significant drop of THA observing the largest
456 decrease at 400 MPa (38%) and the lowest at 600 MPa (14 %). In the I-apple, HPP at 400
457 MPa and 500 MPa decreased THA (13-16%), meanwhile 600 MPa produced a significant
458 increase (29%) (Fig. 2).
459 In the PBS extracts, the effect of HPP was almost similar to that found for the hydro-
460 methanolic extracts in both apples (Fig. 2). HPP I-apple treated at 500 and 600 MPa
461 presented higher THA content (40 and 54 %, respectively) than S-apples in the PBS
462 extracts.

463 *3.2.3. Flavan-3-ols*

464 Total flavan-3-ols was the major family of phenolic compounds representing
465 approximately 65% of the total phenolic compounds in GD-apples. This result was in
466 agreement with data found in previous studies (Vrhovsek et al., 2004). The major
467 compound was the dimer procyanidin B2, in both Spanish and Italian apples (915.48 and
468 745.14 µg/g dw, respectively), followed by the monomer epicatechin (763.01 and 678.85
469 µg/g dw, respectively). Procyanidin B2 is composed by two molecules of epicatechin

470 which explain the good correlation between the high content of epicatechin and the high
471 content of procyanidin B2 in these apples (Ceymann, Arrigoni, Scharer, Nising, & Hurrell,
472 2012). Other flavan-3-ols derivatives were identified on the basis of their UV spectra and
473 denominated as trimer and dimer of epicatechin. Also, catechin was identified in all
474 samples albeit at lower concentrations (Table 3).

475 HPP affected in a different way the flavan-3-ols derivatives in the two GD-apples
476 studied (hydro-methanolic extracts). For S-apple, treatments at 500 and 600 MPa
477 significant (p<0.05) decreased epicatechin (17 and 10%, respectively) and its trimer (10-
478 7.5%) and dimer (4-9%) derivatives. Procyanidin B2 concentration only was increased by
479 4% after HPP at 400 MPa. In contrast to S-apple, the concentration of epicatechin and its
480 trimer and dimer derivatives in the I-apple increased 45, 70 and 240%, respectively, after
481 treatments at 600 MPa, meanwhile 400 and 500 MPa did not modify the initial
482 concentration. Also, HPP at 600 MPa significant increased 39% the procyanidin B2
483 whereas 400 and 500 MPa produced a significant reduction in its concentration (19 and
484 10%, respectively).

485 Total flavan-3-ols (TF-3-O) in the hydro-methanolic extract of untreated S-apple
486 (2321.69 µg/g dw) was 20% higher than in the untreated I-apple (1855.90 µg/g dw). PBS
487 extracted 26.2 % and 32% less TF-3-O than aqueous methanol in the S-apple and I-apple,
488 respectively, resulting in a similar concentration for both apples (607.79 and 594.71 µg/g
489 dw). The effect of HPP on TF-3-O in the hydro-methanolic extracts of both apples was
490 similar to that described for procyanidin B2.

491 In the PBS extracts, HPP at 400 MPa did not modify TF-3-O of both apples meanwhile
492 500 MPa decreased TF-3-O significantly, 49 and 20 % in the Spanish and Italian apples,
493 respectively. Only I-apple treated at 600 MPa showed a significant increase in TF-3-O that
494 was 53.8% and 97.3% for the hydro-methanolic and PBS extracts, respectively (Fig. 2). In

the PBS extracts, I-apple treated at 500 and 600 MPa presented higher TF-3-O content (53 and 147 %, respectively) than S-apples.

In general, the results of the present study showed that flavan-3-ols was scarcely affected by HPP. Flavan-3-ols can be affected by processing which may cause epimerization, degradation and de-polymerization of oligomers and polymers (Aron & Kennedy, 2008). Some previous studies have shown to increase or maintain the content of flavan-3-ols after different HPP. Thus, Andrés, Mateo-Vivaracho, Guillamon, Villanueva, & Tenorio (2016) applied two high pressure treatments (550 and 650 MPa for 3 min at 20 ºC) in soy-smoothies and observed that epicatechin concentration was not affected by HPP at 550 MPa whereas catechin was stable only with the treatment at 650 MPa.

3.2.4. Dihydrochalcones

Dihydrochalcones represented approximately 4% of the total phenolic compounds quantified in the present study (Table 3). Similarly, Vrhovsek et al. (2004) observed that dihydrochalcones represent between 2-6% of total apple polyphenols. Two compounds were identified and quantified in all of samples, phloridzin and phloretin-2'-xyloglucoside. In the present study, phloridzin in the Spanish and Italian apples (112.34 and 92.13 µg/g dw, respectively) was present in a major concentration than phloretin-2'-xyloglucoside (39.51 and 28.26 µg/g dw, respectively). These results are in agreement with previous reported by Chinnici, Bendini, Gaiani, and Riponi (2004). HPP effects on dihydrochalcones depended on the origin of GD-apple. Thus, HPP at 500 and 600 MPa decreased significantly the concentration of phloretin-2'-xyloglucoside (14-16%) and phloridzin (16-20%) in the S-apple. In the I-apple, HPP at 400 and 500 MPa affected phloretin-2'-xyloglucoside in a similar way as in the S-apple. However, I-apple treated at 600 MPa increased 50.8% and 66.8% the phloretin-2'-xyloglucoside and phloridzin content, respectively. Suarez-Jacobo, Rufer, Gervilla, Guamis, Roig-Sagues, and Saldo

520 (2011) did not observe significant changes in the content of phloretin-2'-xyloglucoside and
521 phloridzin of apple juice after applying different HPP (100, 200, 300 MPa at 4 and 20ºC).
522 Also, Baron et al. (2006) described that dihydrochalcones in an apple juice were not
523 modified after different HPP (200-400 MPa, 5-10 min at 20 ºC). However, He, et al.
524 (2016) observed a decrease on the content of phloridzin in apple juice after applying a
525 treatment of 250 MPa for 10 min.

526 Total dihydrochalcones (TDC) in the hydro-methanolic extract of untreated S-apple
527 (151.85 µg/g dw) was 21% higher than in the untreated I-apple (120.39 µg/g dw) (Fig. 2).
528 PBS extracted 51% and 30% less TDC than methanol in the S-apple and I-apple,
529 respectively, resulting higher concentration in the I-apple (84.90 µg/g dw) than in S-apple
530 (74.46 µg/g dw). The different HPP assayed affected TDC in the hydro-methanolic extract
531 in a similar way as in phloridzin that was previously described.

532 Regarding PBS extracts, all the HPP assayed significantly decreased TDC in the S-
533 apple: 38% (400 MPa) and 55% (500 and 600 MPa). TDC in the PBS extracts of I-apple
534 was reduced 55 and 32% after HPP at 400 and 500 MPa, respectively. HPP at 600 MPa did
535 not modify the TDC of untreated sample. I-apple treated at 500 and 600 MPa presented
536 higher TDC content (82 and 143%, respectively) than S-apples in PBS extracts.

537 In conclusion, the results related with solvent extraction have shown that hydro-
538 methanolic solvent showed better efficiency than PBS in the extraction of all the phenolic
539 compounds analyzed in GD-apples. In the apples of the two origins, the hydro-methanolic
540 solvent increased about 2.8, 3.3, 2 and 1.4 times the extraction of total flavonols, total
541 flavan-3-ols, total dihydrochalcones and total hydroxycinnamic acids, respectively, in
542 comparison with PBS.

543 *3.3. Antioxidant activity (AA)*

HPP could affect the antioxidant activity (AA) of plant-derived foods to the same extent that affects the antioxidant compounds contained in the plant matrix. Thus, HPP may cause changes in the food matrix such as cell walls disruption, which affect to the extraction and concentration of antioxidants compounds (Vázquez-Gutiérrez, et al., 2013; Roldán-Marín, Sánchez-Moreno, Lloria, de Ancos, & Cano, 2009). However, other parameters such as the environmental and agricultural conditions, the type of fruit and cultivar studied may also affect the level of antioxidants (Musacchi & Serra, 2018).

The effect of HPP on the hydrophilic AA of GD-apple of two different geographical origins was evaluated by four different methods (TP-FC, $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP) and the results are shown in Table 4. TP-FC and FRAP were used to quantify the sample´s reducing capacity and $DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$ determine the radical scavenging capacity of the apple products. These analyses were done using the hydro-methanolic extracts of untreated and HPP-treated apples.

3.3.1. Total phenolic content (TP-FC)

TP-FC value in untreated I-apple (4.18 mg GAE/g dw) was higher than in S-apple (3.42 mg GAE/g dw). These results agree with those found by Lamperi, et al. (2008) which show that the growing area affects the TF-FC in the peel of 'Golden Delicious' apples. TP-FC significantly increased (41.7%) in I-apple after 600 MP/35 ºC/5 min. On the contrary, all the HPP (400, 500 and 600 MPa) assayed produced a TP-FC decrease (between 14 and 47%) in S-apple. Landl et al. (2010) reported that HPP at 400 MPa did not affect the total polyphenolic compounds in a 'Granny Smith' purée, whereas it was affected at 600 MPa. Other authors showed significant increase of TP-FC in apple juice caused by HPP treatments (Baron et al., 2006; Abid et al., 2014). Some authors suggest that reduction of TP-FC after HPP might be associated with the remaining activity of polyphenoloxidase (PPO) (Koutchman et al., 2016).

Table 4. Antioxidant activity (TP-FC, DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$ and FRAP) in 'Golden Delicious' apples from two different European regions processed by HPP.

Origin/ Treatment		Total Phenolic Compounds (TP-FC) (mg GAE/g dw)	DPPH$^{\bullet}$ (µmol TE/g dw)	ABTS$^{\bullet+}$ (µmol TE/g dw)	FRAP (µmol TE/g dw)
Italy (North)	Untreated	4.18±0.1^{aB}	22.14±1.2^{abA}	32.85±1.5^{aA}	26.98±0.9^{bB}
	HPP-400	4.40±0.1^{bB}	22.83±0.8^{bA}	32.83±2.1^{aB}	26.20±2.2^{abB}
	HPP-500	4.16±0.3^{abB}	21.00±0.8^{aB}	31.20±1.2^{aB}	23.48±1.3^{aB}
	HPP-600	5.92±0.3^{cB}	30.01±2.0^{cB}	39.14±0.9^{bB}	30.58±0.8^{cB}
Spain (Aragón)	Untreated	3.42±0.2^{dA}	24.56±1.0^{dB}	33.92±2.9^{dA}	19.57±1.7^{cA}
	HPP-400	2.93±0.1^{cA}	20.66±3.0^{cA}	25.33±1.6^{cA}	16.65±2.1^{bA}
	HPP-500	1.82±0.1^{aA}	11.37±1.4^{aA}	14.62±2.2^{aA}	10.25±1.5^{aA}
	HPP-600	2.65±0.1^{bA}	15.31±1.1^{bA}	21.89±1.6^{bA}	15.44±2.4^{bA}

[a] Data are expressed as the mean ± SD (n=4). Different small letters within column and apple origin indicate significant differences ($p \leq 0.05$) among treatments. Different capital letters within column and treatment indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between apple origins. HPP treatments: 400, 500 and 600 MPa at 35 ºC for 5 min.

569

570 3.3.2. *Ferric reducing antioxidant power (FRAP)*

571 FRAP value in untreated I-apple (26.98 µmol TE/g dw) was higher than in S-apple
572 (19.57 µmol TE/g dw) (Table 4). The effect of the three HPP assayed on AA determined
573 by FRAP showed the same trend than in AA analyzed by TP-FC. In fact, a positive
574 correlation was found between FRAP and TP-FC for S-apples and I-apples (r^2=0.885 and
575 r^2=0.749, respectively) (Tables 5 and 6). Thus, HPP at 400 and 500 MPa slightly modified
576 the AA determined by FRAP in the I-apple but increased significantly after 600 MPa
577 (13%). Also, in S-apple all the HPP assayed showed a significant decrease of FRAP values
578 between 15-21% (400-600 MPa) being up to 48% after 500 MPa.

579 Antioxidant activity determined by FRAP depended on plant food matrix and HPP
580 parameters. Thus, HPP (100-600 MPa for 1-3 min) applying to fresh onions showed higher
581 AA (by FRAP) when pressure applied increased (Vázquez-Gutiérrez et al., 2013). Also, in
582 onion powder (HPP and lyophilized), HPP at 200 and 400 MPa increased AA (by FRAP)
583 by 15 % (González-Peña et al., 2013).

584 *3.3.3. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH$^{\bullet}$) scavenging capacity*

585 AA determined by DPPH$^{\bullet}$ was significantly higher in the S-apple (24.56 µmol TE/g
586 dw) than in the I-apple (22.14 µmol TE/g dw). HPP effects on AA (DPPH$^{\bullet}$) depended on
587 the apple origin and the treatment parameters. In I-apple, HPP at 600 MPa increased AA
588 about 30% respect to the untreated sample. On the contrary, all the HPP assayed with S-
589 apple produced significant AA decrease (16-54%). González-Peña et al. (2013) showed
590 that AA (by DPPH$^{\bullet}$) of powdered onion (200, 400 and 600 MPa for 5 min at 25 ºC) did not
591 change in comparison with the untreated sample. However in fresh onion, when pressure
592 applied increased (100-600 MPa for 1-3 min) higher AA value (by DPPH$^{\bullet}$) was
593 determined (Vázquez-Gutiérrez et al., 2013).

594 *3.3.4. 2,2´-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation (ABTS$^{\bullet+}$)*
595 *scavenging capacity*

596 Antioxidant activity determined by ABTS$^{\bullet+}$ was similar for both S-apple and I-apple
597 (33.92 and 33.92 µmol TE/g dw) (Table 4). A positive correlation was found between
598 ABTS$^{\bullet+}$ and DPPH$^{\bullet}$ for both Spanish and Italian apples (r^2=0.889 and r^2=0.836,
599 respectively) (Tables 5 and 6). Thus, I-apple treated at 400 and 500 MPa maintained the
600 initial AA value (by ABTS$^{\bullet+}$) while HPP at 600 MPa increased AA about 20%. On the
601 contrary, all the HPP assayed with S-apple produced significant decline of AA values (25-
602 57%).

HPP affected AA depending on plant food matrix and treatment parameters. Different HPP (100-600 MPa for 1-3 min) applying to fresh onions did not show changes in AA (by $ABTS^{\bullet+}$) (Vázquez-Gutiérrez et al., 2013). However, in onion powder treated at 200 and 400 MPa increased AA (by $ABTS^{\bullet+}$) by 14.9% and 25.4%, respectively (González-Peña et al., 2013).

In general, the AA measure by four different methods (TP-FC, FRAP, $ABTS^{\bullet+}$ and $DPPH^{\bullet}$) of GD-apples depended on the HPP conditions and the origin of the GD-apple (Table 4). Untreated I-apple exhibited higher AA measured by TP-FC and FRAP meanwhile untreated S-apple showed higher AA determined by $ABTS^{\bullet+}$ and $DPPH^{\bullet}$. Therefore, I-apples seemed to have more reducing capacity than S-apples, and the latter more radical scavenging capacity than I-apples. These differences could be related to the different quantitative composition of phenolic compounds found in Italian and Spanish GD-apples. Thus S-apples showed major content of total hydroxycinnamic acids, total flavan-3-ols and total dihydrochalcones and I-apples higher content of total flavonols (Fig. 2).

All the HPP assayed produced a significant decrease ($p \leq 0.05$) of AA measured by the four methods (TP-FC, FRAP, $ABTS^{\bullet+}$and $DPPH^{\bullet}$) in S-apple, meanwhile HPP at 600 MPa/35 ºC/5 min significantly increased AA in I-apple. The differences observed between Spanish and Italian apples support the theory that antioxidant activity depends on food matrix (chemical and biochemical composition and microstructure) and HPP parameters (McInerney, Seccafien, Stewart, & Bird, 2007; Sánchez-Moreno, et al., 2009).

The statistical correlations among total phenolic compounds calculated as the sum of all the phenolic compound families (flavonols, dihydroxycinnamic acids, flavan-3-ols and dihydrochalcones) determined by HPLC-DAD (TP-HPLC) and antioxidant activity (AA) is shown in Table 5 and Table 6 for Spanish and Italian apples (untreated and HPP-

628 treated), respectively. In S-apples, positive correlations (r^2 = 0.723-0.889) were found
629 between total phenolic compounds families (TP-HPLC) and AA measured by TP-FC,
630 $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP (Table 5). Also in untreated and HPP I-apple were found
631 positive correlation between TP-HPLC and AA values (r^2 = 0.755-0.945) (Table 6).

Table 5. Pearson´s correlation coefficients (r^2) among total phenolic compounds determined by HPLC (TP-HPLC) and antioxidant activity (TP-FC, $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP for untreated and HPP-treated 'Golden Delicious' apple from Spain (Aragón).

	TP-FC	$DPPH^{\bullet}$	$ABTS^{\bullet+}$	FRAP
TP-HPLC	0.826	0.886	0.889	0.723
TP-FC	1	0.915	0.929	0.885
$DPPH^{\bullet}$		1	0.924	0.889
$ABTS^{\bullet+}$			1	0.865
FRAP				1

p value for Pearson´s correlation coefficient <0.01

Table 6. Pearson´s correlation coefficients (r^2) among total phenolic compounds determined by HPLC (TP-HPLC) and antioxidant activity (TP-FC, $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP for untreated and HPP-treated 'Golden Delicious' apple from Italy (North).

	TP-FC	$DPPH^{\bullet}$	$ABTS^{\bullet+}$	FRAP
TP-HPLC	0.945	0.913	0.893	0.755
TP-FC	1	0.915	0.860	0.749
$DPPH^{\bullet}$		1	0.836	0.760
$ABTS^{\bullet+}$			1	0.795
FRAP				1

p value for Pearson´s correlation coefficient <0.01

632 **4. Conclusions**

633 HPP produced different effects on phenolic compounds and antioxidant activity
634 depending on 'Golden Delicious' apple growing region, high-pressure processing
635 conditions and type of solvent employed in the extraction. The use of HPP as a tool to
636 obtain functional apple-based products by increasing the extraction of different classes of
637 phenolic compounds requires a case-by-case study to help select the apple cultivar and

growing region that best responds to specific HPP conditions. In the present study, the best HPP treatment for Spanish GD-apple was 400 MPa/35 ºC/5 min due to the significant increase of the total flavonols content (30%) achieved meanwhile total flavan-3-ols and dihydrochalcones were scarcely affected. The Italian GD-apple treated at 600 MPa/35 ºC/5 min was the best combination to achieve significant increases of total flavonols (75%), total hydroxycinnamics acids (29%), total flavan-3-ols (58%), total dihydrochalcones (63%), total phenolic compounds (54%) determined by HPLC (TP-HPLC) and antioxidant activity (AA) measured by different methods (TP-FC, $DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP). Significant positive correlations (r^2 > 0.723) were found between all the AA determinations and TP-HPLC in Italian and Spanish GD-apples. In terms of solvent extraction, an aqueous methanol solvent showed better efficiency than the PBS in the extraction of all classes of phenolic compounds in GD-apples.

Acknowledgements

This study has been funded by the Spanish projects AGL2013-46326-R and AGL2016-76817-R (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness). We are grateful to the Analysis Service Unit facilities of ICTAN for the analysis of Chromatography and Mass Spectrometry.

References

Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Wu, Z. W., Khan, M. A., & Zeng, X. X. (2014). Synergistic impact of sonication and high hydrostatic pressure on microbial and enzymatic inactivation of apple juice. *LWT-Food Science and Technology, 59*(1), 70-76.

Alarcón-Flores, M. I., Romero-González, R., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2015). Evaluation of the presence of phenolic compounds in different varieties of apple by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods, 8*(3), 696-709.

Andrés, V., Mateo-Vivaracho, L., Guillamon, E., Villanueva, M. J., & Tenorio, M. D. (2016). High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. *LWT-Food Science and Technology, 69*, 123-130.

668 Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2008). Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological
669 activity. *Molecular Nutrition & Food Research, 52*(1), 79-104.
670 Awad, M. A., de Jager, A., & van Westing, L. M. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid
671 levels in apple fruit: characterisation of variation. *Scientia Horticulturae, 83*(3-4),
672 249-263.
673 Barba, F.J., Esteve, M.J., & Frígola, A. (2012). High pressure treatment effect on
674 physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: A review.
675 *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 11*(3), 307-322.
676 Baron, A., Denes, J. M., & Durier, C. (2006). High-pressure treatment of cloudy apple
677 juice. *LWT-Food Science and Technology, 39*(9), 1005-1013.
678 Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a
679 measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry, 239*(1),
680 70-76.
681 Bobo-García, G., Davidov-Pardo, G., Arroqui, C., Virseda, P., Marín-Arroyo, M. R., &
682 Navarro, M. (2015). Intra-laboratory validation of microplate methods for total
683 phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison
684 with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and*
685 *Agriculture, 95*(1), 204-209.
686 Bondonno, N.P., Bondonno, C.P., Ward, N.C., Hodgson, J.M., & Croft, K.D. (2017). The
687 cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds.
688 *Trends in Food Science & Technology, 69*, 243-256.
689 Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free-radical method to
690 evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-*
691 *Wissenschaft & Technologie, 28*(1), 25-30.
692 Bukow, R., Weiss, U., & Knorr, D. (2009). Inactivation kinetics of apple polyphenol
693 oxidase in different pressure-temperature domains. *Innovative Food Science and*
694 *Emerging Technologies, 10*, 441-448.
695 Canteri-Schemin, M. H., Fertonani, H. C. R., Waszczynskyj, N., & Wosiacki, G. (2005).
696 Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and*
697 *Technology*, 48(2), 259-266.
698 Ceymann, M., Arrigoni, E., Scharer, H., Nising, A. B., & Hurrell, R. F. (2012).
699 Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by
700 measuring the polyphenol profile. *Journal of Food Composition and Analysis,*
701 *26*(1-2), 128-135.
702 Chinnici, F., Bendini, A., Gaiani, A., & Riponi, C. (2004). Radical scavenging activities of
703 peels and pulps from cv. Golden Delicious apples as related to their phenolic
704 composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(15), 4684-4689.
705 El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Goransson, U., Bohlin, L., Borg-
706 Karlson, A. K., & Verpoorte, R. (2012). Biosynthesis, natural sources, dietary
707 intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic
708 acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(44), 10877-10895.
709 European Apple and pear crop Forecast. Polandfruits trade cooperation platform. (2017).
710 http://polandfruits.pl/news/622/european-apple-and-pear-crop-forecast-august-
711 2017. Accessed 11 January 2018.
712 Gawlik-Dziki, U. (2012). Changes in the antioxidant activities of vegetables as a
713 consequence of interactions between active compounds. *Journal of Functional*
714 *Foods, 4*(4), 872-882.
715 Georget, E., Sevenich, R., Reineke, K., Mathys, A., Heinz, V., Callanan, M., Rauh, C., &
716 Knorr, D. (2015). Inactivation of microorganisms by high isostatic pressure

processing in complex matrices: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 27*, 1-14.
Gil-Cardoso, K., Ginés, I., Pinent, M., Ardévol, A., Blay, M., & Terra, X. (2016). Effects of flavonoids on intestinal inflammation, barrier integrity and changes in gut microbiota during diet-induced obesity. *Nutrition Research Reviews*, *29*, 234–248.
González-Peña, D., Colina-Coca, C., Char, C. D., Cano, M. P., de Ancos, B., & Sánchez-Moreno, C. (2013). Hyaluronidase inhibiting activity and radical scavenging potential of flavonols in processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*(20), 4862-4872.
Gonzalez-Talice, J., Yuri, J. A., & del Pozo, A. (2013). Relations among pigments, color and phenolic concentrations in the peel of two Gala apple strains according to canopy position and light environment. *Scientia Horticulturae*, *151*, 83-89.
He, Z. Y., Tao, Y. D., Zeng, M. M., Zhang, S., Tao, G. J., Qin, F., & Chen, J. (2016). High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect in vitro bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. *Food Chemistry, 200*, 107-116.
Jakobek, L., García-Villalba, R., & Tomas-Barberán, F. A. (2013). Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *Journal of Food Composition and Analysis, 31*(2), 199-211.
Juarez-Enriquez, E., Salmeron-Ochoa, I., Gutierrez-Mendez, N., Ramaswamy, H. S., & Ortega-Rivas, E. (2015). Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. *LWT-Food Science and Technology*, *62*(1), 915-919.
Kim, H. K., Leem, K. H., Lee, S., Kim, B. Y., Hahm, Y. T., Cho, H. Y., & Lee, J. Y. (2012). Effect of high hydrostatic pressure on immunomodulatory activity of cloudy apple juice. *Food Science and Biotechnology*, *21*(1), 175-181.
Kevers, C., Pincemail, J., Tabart, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2011). Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. J*ournal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*(11), 6165-6171.
Konopacka, D., Jesionkowska, K., Kruczynska, D., Stehr, R., Schoorl, F., Buehler, A., Egger, S., Codarin, S., Hilaire, C., Holler, I., Guerra, W., Liverani, A., Donati, F., Sansavini, S., Martinelli, A., Petiot, C., Carbo, J., Echeverria, G., Iglesias, I., & Bonany, J. (2010). Apple and peach consumption habits across European countries. *Appetite, 55*(3), 478-483.
Koutchman, T., Popovic, V., Ros-Polski, V., & Popielarz, A. (2016). Effects of ultraviolet light and high-pressure processing on quality and health-related constituents of fresh juice products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *15*,844-867.
Lamperi, L., Chiuminatto, U., Cincinelli, A., Galvan, P., Giordani, E., Lepri, L., & Del Bubba, M. (2008). Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6536-6546.
Landl, A., Abadias, M., Sarraga, C., Vinas, I., & Picouet, P. A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple puree product. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 11*(4), 557-564.
Lee, J., & Mitchell, A. E. (2012). Pharmacokinetics of quercetin absorption from apples and onions in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*(15), 3874-3881.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(22), 6516-6520.

Marks, S. C., Mullen, W., & Crozier, A. (2007). Flavonoid and hydroxycinnamate profiles of English apple ciders. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(21), 8723-8730.

McInerney, J. K., Seccafien, C. A., Stewart, C. M., & Bird, A. R. (2007). Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 8*(4), 543-548.

McKay, A. M., Linton, M., Stirling, J., Mackle, A., & Patterson, M. F. (2011). A comparative study of changes in the microbiota of apple juice treated by high hydrostatic pressure (HHP) or high pressure homogenisation (HPH). *Food Microbiology, 28*(8), 1426-1431.

Musacchi, S., & Serra, S. (2018). Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae, 234*, 409-430.

Naczk, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A, 1054*(1-2), 95-111.

Oey, I., Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends in Food Science & Technology, 19*(6), 300-308.

Ornelas-Paz, J.J., Quintana-Gallegos, B.M., Escalante-Minakata, P., Reyes-Hernández, J., Pérez-Martínez, J.D., Rios-Velasco, C., & Ruiz-Cruz, S. (2018). Relationship between the firmness of 'Golden Delicious' apples and the physicochemical characteristics of the fruits and their pectin during development and ripening. *Journal of Food Science and Technology, 55*(1), 33-41.

Plaza, L., Colina, C., de Ancos, B., Sanchez-Moreno, C., & Cano, M. P. (2012). Influence of ripening and astringency on carotenoid content of high-pressure treated persimmon fruit *(Diospyros kaki* L.), *Food Chemistry, 130*, 591-597.

Rajbhar, K., Dawda, H., & Mukundan, U. (2015). Polyphenols: methods of extraction. *Scientific Reviews and Chemical Communications, 5*(1), 1-6.

Rastogi, N. K., Raghavarao, K., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47*(1), 69-112.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine, 26*(9-10), 1231-1237.

Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods, 14*, 33-43.

Roldán-Marín, E., Sánchez-Moreno, C., Lloria, R., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2009). Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology, 42*(4), 835-841.

Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Plaza, L., Elez-Martínez, P., & Cano, M. P. (2009). Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49*(6), 552-576.

Singleton, V. L. & Rossi, J. L. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, *16*, 144–158.

Suarez-Jacobo, A., Rufer, C. E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagues, A. X., & Saldo, J. (2011). Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry, 127*(2), 447-454.

Sun, D.-W. (2005). *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier Academic Press, London, UK.

Terefe, N. S., Buckow, R., & Versteeg, C. (2014). Quality-related rnzymes in fruit and vegetable products: effects of novel food processing technologies, Part 1: High-pressure processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 54*(1), 24-63.

Tsao, R., Yang, R., Christopher, J., Zhu, Y., & Zhu, H. H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(21), 6347-6353.

Vázquez-Gutiérrez, J. L., Plaza, L., Hernando, I., Sánchez-Moreno, C., Quiles, A., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2013). Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. *Food & Function, 4*(4), 586-591.

Vijayalaxmi, S., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2015). Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, *52*(5), 2761-2769.

Vrhovsek, U., Rigo, A., Tonon, D., & Mattivi, F. (2004). Quantitation of polyphenols in different apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52*(21), 6532-6538.

Wang, X., Ouyang, Y. Y., Liu, J., & Zhao, G. (2014). Flavonoid intake and risk of CVD: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *British Journal of Nutrition*, *111*(1), 1-11.

Wojdylo, A., Oszmianski, J., & Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidant activity of new and old apple varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(15), 6520-6530.

Woo, H. D., & Kim, J. (2013). Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, *19*(7), 1011-1019.

Yi, J. J., Kebede, B. T., Dang, D. N. H., Buve, C., Grauwet, T., Van Loey, A., Hu, X. S., & Hendrickx, M. (2017). Quality change during high pressure processing and thermal processing of cloudy apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, *75*, 85-92.

Artículo 2:

Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonols and antioxidant activity during gastrointestinal digestion

Irene Fernández-Jalao, Concepción Sánchez-Moreno, Begoña De Ancos

Journal of Food Engineering 213 (2017) 60-68

DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2017.02.015

Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonols and antioxidant activity during gastrointestinal digestion

Irene Fernández-Jalao, Concepción Sánchez-Moreno, Begoña De Ancos*

Department of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), C/ José Antonio Novais 10, Madrid 28040, Spain

* Corresponding author. Tel.: +34 915492300; fax: +34 915493627.

E-mail addresses: ancos@ictan.csic.es (B. De Ancos).

ABSTRACT:

A dynamic *in vitro* gastrointestinal model (GID) was used to evaluate the effect of high-pressure processing (HPP) and food matrix on bioaccessibility and antioxidant activity (AA) of onion flavonols. A dietary supplement of quercetin was also submitted to GID. HPP (400 MPa/25 ºC/5 min) combined with freeze-drying produced a significant increase of major onion flavonols, Q-3,4'-DiGlu (5%), Q-4'-Glu (30%), Iso-3,4'-DiGlu (5%) and Q-3-Glu (14%). Onion flavonols concentration decreased gradually through GID. The most bioaccessible flavonols were quercetin-diglucosides (23-96%) and the less were quercetin-monoglucosides (5-23%) and quercetin-aglycone (6-10%). Although GID phases of HPP-onion presented higher total flavonol content (9-16%) than control-onion, the bioaccessibility of total flavonols in both samples were similar (~17.63%) and significant higher than that of quercetin dietary supplement (0.028%). Then, onion matrix affected positively flavonol bioaccessibility. Significant positive correlations were found between total flavonol and AA determined by $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP and between TP-FC and $DPPH^{\bullet}$ during GID.

KEYWORDS: bioaccessibility, quercetin, onion, dynamic *in vitro* gastrointestinal digestion

Highlights

- HPP improved onion flavonols extractability during GID
- Bioaccessible fraction had lower flavonols and AA than non-digested onion.
- Quercetin diglucosides showed better bioaccessibility than the aglycone
- HPP maintained total onion flavonol bioaccessibility
- Positive correlation between flavonols and AA during GID were found.

1. Introduction

Onion (*Allium cepa* L.*)* is one of the most consumed vegetables in the world and has been widely proposed as a natural source of bioactive compounds (flavonoids, especially flavonols) with a protective effects against cardiovascular, degenerative pathologies and certain types of cancer (Roldan-Marín et al., 2012). Onion is recognized as the major dietary source of the flavonol quercetin as its aglycone or as *O*-glycosylated derivatives (Guo and Bruno, 2015; Lee and Mitchell, 2012). The benefits attributed to quercetin and quercetin glycosides consumption on human health (*e.g.* antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic and cardioprotective effects) (Erlund, 2004; Guo and Bruno, 2015) explain the great interest in increasing the intake of this bioactive compound within the human diet. Also, numerous quercetin derived products obtained from onions are available as commercial healthy dietary supplements (nutraceuticals) (Tomé-Carneiro and Visioli, 2016). It is well known that type and level of bioactive compounds such as phenolic compounds can vary markedly between species, cultivar, climatic, agronomic, harvest and postharvest conditions such as food processing (Williams et al. 2013). High-pressure processing (HPP) has been proposed as an alternative to traditional thermal processing technologies to obtain safe, nutritive fresh-tasting plant derived products avoiding the degradation of nutrients and bioactive compounds as well as inhibiting microbial growth and enzyme activity (Ferrari et al., 2010; Mujica-Paz et al., 2011; Rastogi et al., 2007; Sánchez-Moreno et al., 2009). Moreover, some authors have stated that the application of HPP treatments to plant foods such as onion, persimmon, apple, fruit juices, beverages, among others, has the potential to modify food matrix producing a major extractability and bioaccessibility of bioactive compounds with the result of food products with increased health-related properties (Briones-Labarca et al., 2011; Hernández-Carrion et al., 2014; Plaza et al., 2012; Rodríguez-Roque et al., 2015; Sánchez-Moreno et al., 2005; Vázquez-

Gutiérrez et al., 2013). Regarding onions, Vázquez-Gutiérrez et al. (2013) found a significant increase between 21-66% of total phenol extracted in pieces of onion treated at 300 and 600 MPa due to the changes produced in membrane permeability and disruption of cells walls favoring the release of phenolic compounds linked to them. These results are in agreement with those previously reported by Roldan-Marín et al. (2009). Also, González-Peña et al. (2013), observed a significant increase of 69.6% and 63.2% for quercetin-4'-glucoside and quercetin-3,4'-diglucoside, respectively, in onion pieces treated at 400 MPa/25 ºC/5 min and subsequently freeze-dryed and pulverized. Other studies have shown that the increase in the extraction and bioaccessibility of phenolic acids and total flavonoids in fruit juices treated by HPP was significant reduced when these juices were blended with milk or soymilk in comparison with the addition of water (Barba et al., 2012; Cilla et al., 2012; Rodríguez-Roque et al., 2015). Milk and soymilk proteins reduced the bioaccessibility of phenolic compounds due to interaction between them and the proteins. Therefore, the effect of HPP on bioactive compounds and on their bioaccessibilty depends on the intensity of treatment and the food matrix composition (Rodríguez-Roque et al., 2015).

Freeze-drying is recognized as a good process for maintaining the nutritional value and bioactive compounds of plant derived products, including onions, for long-term storage (Pérez-Gregorio et al., 2010). The combination of HPP plus freeze-drying and pulverization is a useful process to obtain onion functional ingredients easy to use for the consumers and food industry with the add value of their potential biological activity such as ameliorating hypercholesterolaemia and related effects, among others (Colina-Coca et al., 2014; González-Peña et al., 2014, 2015).

In terms of evaluation the biological activity of onion products is much more important to know the fraction of these compounds potentially available for further intestinal

absorption (bioaccessibility) than the quantification of these compounds in the food matrix (Carbonell-Capella et al., 2014; Fernández-García et al., 2009). It is widely accepted that *in vitro* digestion models represents a good system to understand the interaction food matrix-bioactive compounds during human gastrointestinal digestion (GID) and to determine their bioaccessibility obtaining results that are well correlated to those obtained *in vivo* digestion systems (Bouayed et al., 2011). In addition, *in vitro* digestion methods can be operated in a static o dynamic mode. The dynamic models achieve more accurately the control of digestion parameters such as pH, temperature, peristaltic movements, enzymatic solutions, digestion fluids, gastric and intestinal emptying and chyme transit time (Villemejane et al., 2016).

The aim of this study was to evaluate the effect of high-pressure processing and food matrix (onion-flavonols vs. quercetin dietary supplement) on the stability and bioaccessibility of flavonols and antioxidant activity (AA) through a simulated gastrointestinal digestion using a dynamic model.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

2.1.1. Polyphenols and antioxidant activity analysis

Methanol and acetonitrile (HPLC-grade) were supplied by Lab-Scan (Dublin, Ireland). Formic acid, sodium carbonate anhydrous, ethanol absolute (PRS), hydrochloric and acetic acid glacial were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Sodium acetate trihydrate was from Merck (Darmstadt, Germany). Folin-Ciocalteu´s phenol reagent, iron (III)chloride anhydrous, 2,4,6-tris-(2-pyridyl)-5-triazine (TPTZ), 2,2´-azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$),

potassium persulfate, gallic acid, quercetin, quercetin-3-glucoside, quercetin-3,4′-diglucoside and isorhamnetin-3-glucoside were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

2.1.2. Simulated gastrointestinal digestion

Citrate buffer (pH 6, C-999), α-amylase (from Aspergillus oryzae, A-9857), pepsin (from porcine gastric mucosa, P-7012), trypsin (from bovine pancreas, T-8253), pancreatin (from porcine pancreas, P-7012) and bile (porcine bile extract, B-8631) were purchased from Sigma (St Louis, USA). Lipase (Rhizopus lipase, F-AP15) was obtained from Amano Enzyme, Inc. (Nagoya, Japan).

2.2. Raw material

Raw onions (*Allium cepa* L. var. *cepa*, 'Recas') from Carabaña, Madrid (Spain) were purchased in a Madrid local supermarket and storage at 4°C (two days later). The raw onions had the following characteristics: Average weight (g), 210.8±17; Moisture (%), 89.0±0.4; Soluble solids (ºBrix), 7.4±0.3; pH, 5.3; Acidity (g of citric acid/100 g fw), 0.07±0.004. Commercial nutraceutical of quercetin from onion in capsules of 500 mg (Solaray, Nutraceutical Corp. USA) was purchased in a Madrid local pharmacy. The onions were hand-peeled, cut into 10 mm cubes, packaged (200 g) in very low gas permeability plastic bags (BB4L, Cryovac, Barcelona, Spain) and vacuum sealed. Approximately half of the onion was immediately frozen with liquid nitrogen and lyophilized (Lyophilizator model Lyoalfa, Telstar S.A, Barcelona, Spain) (0.13 mbar, -90 ºC). Lyophilized samples were pulverized using an ultracentrifugal grinder ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Germany) obtaining a fine powder (particle size ≤ 0.5 mm) and maintained at -20ºC until analysis.

2.3. High-pressure processing (HPP)

131 The rest of the packaged onion was treated in a high hydrostatic pressure unit with
132 a 2950 mL capacity, temperature range between -10ºC to 60ºC and a maximum pressure of
133 900 MPa (High pressure Iso-Lab System, Model FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power
134 LTD., Essex, UK). Two bags of packaged onion were placed into the vessel of the pressure
135 unit filled with pressure medium (water) and treated at 400 MPa with a holding time of 5
136 min and a maximum temperature of 25ºC. The compression rate was 500 MPa/min and the
137 decompression was instantaneous. A computer program controlled the pressure, time and
138 temperature during the process. HPP conditions were selected based on previous studies
139 (González-Peña et al., 2013). After high-pressure processing samples were immediately
140 frozen using liquid nitrogen, lyophilized and pulverized as indicated above.

141 *2.4. In vitro dynamic gastrointestinal digestion*

142 *2.4.1. Dynamic gastrointestinal digester description*

143 A dynamic gastrointestinal digester (DGD) was used to digest onion powder
144 samples (control and HPP) and quercetin dietary supplement. The DGD is a multi-
145 compartmental, dynamic and computer-controlled system developed at AINIA
146 Technologic Center (Valencia, Spain) (Viadel Crespo, 2012) based on others described in
147 previously published studies (Blanquet-Diot et al., 2009; Villemejane et al., 2016). The
148 digester consists of two successive serial compartments simulating stomach and small
149 intestine, respectively (Fig.1). Each compartment is formed by two glass units with a
150 flexible silicone wall jacket inside. The whole system is computer controlled through an
151 operator panel and programmable logic controller. Heated water to 37 ± 1 ºC is pumped
152 through the space between the glass and silicone jacket to maintain the constant body
153 temperature in all the system. Peristaltic movements produced in both compartments
154 stomach and small intestine, are simulated by alternate compression and relaxation of the

flexible silicone walls following changes in the water pressure. The food received in the stomach compartment is mixed with gastric electrolytes and enzymes and is referred as digest or chyme. The transit of the chyme is controlled by an exponential formula ($f= 1-2-(t/t^{1/2})\beta$, where f, t, $t^{1/2}$, and β represent the fraction of the food delivered, the emptying time, the half-emptying time, and a coefficient describing the shape of the curve, respectively (Villemejane et al., 2016). The stomach emptying was programmed by a slow chyme transit ($t^{1/2}$= 70 min and β=2) and also the small intestine emptying was done by slow transit ($t^{1/2}$= 160 min and β=1.6). The chyme transit was regulated by opening or closing the peristaltic valve pumps that connect the compartments.



Fig. 1. *In vitro* dynamic gastrointestinal digester.

The digestion process included several consecutive enzymatic treatments. Thus, simulated saliva secretions (α-amylase), simulated gastric secretions (pepsin and lipase) at acid pH, and simulated intestinal secretions (biliary and pancreatic secretion) at neutral pH were introduced into compartments by computer-controlled pumps. The pH is continuously controlled in the stomach (following a specific pH change during the gastric digestion: from pH 5 to pH 2) and small intestine (pH 6.5 - 7) compartments by secretions of 1 M hydrochloric acid and 1 M sodium bicarbonate, respectively. Thus, the volume, the

pH of the chyme and the digestive secretions introduced in each compartment are computer-controlled. All the parameters selected to conduct the *in vitro* digestion were selected to reproduce the gastrointestinal conditions of a healthy human adult after intake of a solid meal. The total *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion was performed during 360 min (from 0 to 120 min in the stomach and from 0 to 360 min in the small intestine) at 37 ºC in absence of light and under anaerobic conditions by injecting nitrogen gas in the system.

2.4.2. In vitro gastrointestinal digestion procedure

In vitro digestion process was performed on 27 g of freeze-dried and powdered onion (untreated and HPP-treated) and 0.0705 g of quercetin from a pool of five capsules of a commercial dietary supplement (Fig.2). *In vitro* digestion of each sample was done in duplicate. The experiments began combining the onion powder with artificial saliva contained 9600 units of α-amylase, 30 mL of citrate buffer (pH 6), and 100 mL of electrolyte solution (NaCl, $CaCl_2$ and $NaHCO_3$). Milli-Q water was added to the mixture up to final weight of 300 g. This mixture was homogenized for two minutes and bubbled with nitrogen gas for ten minutes and then introduced in the gastric compartment representing the stomach, and the gastrointestinal digestion was started. Previously to digestion process, gastric secretions (10 mL) and intestinal secretions (60 mL) were added to the stomach and small intestine, respectively. During the digestion, gastric secretions (hydrochloric acid, gastric electrolytes solution, gastric lipase and pepsin) were added to the stomach and intestinal secretions (sodium bicarbonate, intestinal electrolytes solution, pancreatin, bile and trypsin) were added to the small intestine.

To monitor the release of individual polyphenols from onion products at different stages of digestion, aliquots from the artificial saliva treatment (buccal phase), gastric

digest at 120 min and intestinal digest from 0 to 360 min were separated and acidified to pH 2. Then, these aliquots were frozen and stored at -20 ºC until its analysis. The rest of the intestinal digest at pH 2 was centrifuged (Sigma Laboratory Centrifuge at 6K15) at 3890 g at 4 ºC for 60 min and the supernatant were separated. This supernatant represents the bioaccessible fraction of the product sample according to previously described procedure (Cilla et al., 2012). The bioaccessible fraction was immediately frozen and stored at -20 ºC until its analysis.

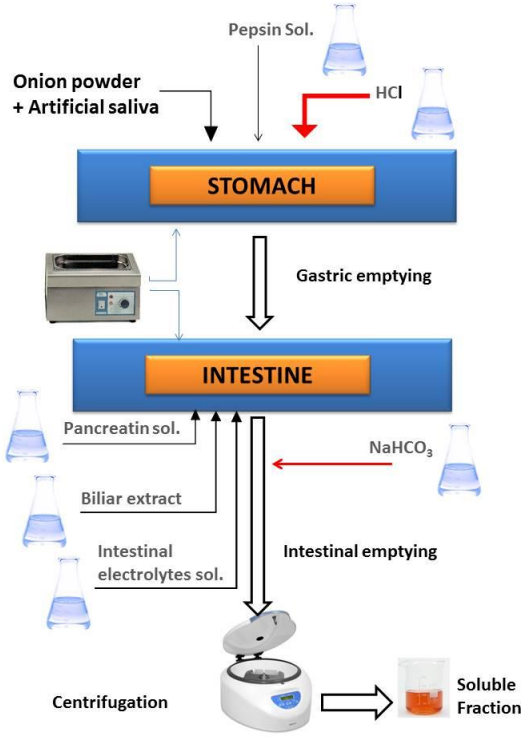


Fig.2. Diagram of the *in vitro* gastrointestinal digestion procedure.

2.4.3. Bioaccessibility calculations

Bioaccessibility defined as the portion of bioactive compounds that is released from the food matrix into the gastrointestinal tract and thus become available for intestinal absorption (Carbonell-Capella et al., 2014) was determined using the next equation and expressed as percentage:

Bioccessibility (%) = (bioaccessible fraction / non-digested) x 100

where: bioaccessible fraction = concentration of flavonols in the bioaccessible fraction; non-digested = concentration of flavonols in the non-digested sample.

2.5. Extracts preparation from non-digested and digested products

Lyophilized onion (1g), non-digested control and HPP-treated, were extracted with 12.5 mL of methanol/water (80:20, v/v) in an ultrahomogenizer at 8000 rpm for 4.5 min (model ES-270, Omni International Inc., Gainesville, VA, USA). The mixtures were centrifuged at 8000 g, 4°C and 15 min, using a refrigerated centrifuge (Thermo Scientific Sorvall, mod. Evolution RC, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). The pellets were re-extracted with 12.5 mL of extraction solvent and centrifuged again. The two supernatants were combined and concentrated to approximately 2 mL using a rotatory evaporator at 40 ºC. Methanol was added to reach a final volume of 10 mL and the extracts were stored at -20 °C until analysis. Extraction of samples was done in duplicated.

Aliquots (10 g) from different phases of GID were lyophilized and extracted with 10 mL of methanol (1.5 mL for bioaccessible fraction). The mixture was vigorously stirred in a vortex for 2 min and centrifuged at 8000 g at 4°C for 15 min, using a refrigerated centrifuge. The supernatant was separated and stored at -20 °C until analysis.

2.6. Analysis of flavonols

The separation, identification and quantification of flavonols were carried out by HPLC-DAD according to the procedure described by González-Peña et al. (2013). The quantification was achieved using standards calibration curves of quercetin, quercetin-3-glucoside, quercetin-3,4′-diglucoside and isorhamnetin-3′-glucoside in the range from 0.4 to 550 µg/mL. All the samples were analyzed in duplicate and expressed as µg/g dry weight (dw).

2.7. Analysis of antioxidant activity

2.7.1 Total phenolic content (TP-FC)

Total phenolic determination was performed according to the Folin-Ciocalteu´s procedure previously described (González-Peña et al., 2013). Briefly, 0.2 mL of diluted samples were placed into test tubes with 1.2 mL of Folin-Ciocalteu reagent diluted with water (1:4) and then mixed in a vortex during 15 s. After 5 min, 0.8 mL of sodium carbonate saturated was added, and vortex 15 s. After incubation in the dark for 60 min, 0.3 mL of the reaction mixture were placed in a microplate well in quadruplicate. Absorbance was measured at 750 nm in a spectrophotometric microplate reader model PowerWave XS, Bio Teck (Vicenza, Italy). Quantification was achieved using a gallic acid external standard calibration curve in the range from 0 to 300 µg/mL. Total phenolic content was expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g dw.

2.7.2 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical ($DPPH^{\bullet}$) scavenging assay.

$DPPH^{\bullet}$ was prepared and assayed according to the method previously described (Gónzalez-Peña et al., 2013). Absorbance was measured at 515 nm in a microplate reader. All samples were run in quadruplicate. Results were compared with a standard curve prepared with 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox), and expressed as µmol trolox equivalents (TE)/g dw.

2.7.3.2,2´-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) scavenging assay

According to the method previously described (González-Peña et al., 2013), ABTS radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) was produced by reacting ABTS with potassium persulfate ($K_2S_2O_8$) in darkness at room temperature for 12-16 h before use. The $ABTS^{\bullet+}$ solution was diluted with ethanol to an absorbance of 0.7 ± 0.2 at 734 nm. Then, 10 µL of diluted sample was mixed with 290 µl of 7 mM $ABTS^{\bullet+}$. After 20 min in darkness at 30ºC,

absorbance was measured at 730 nm in a spectrophotometric microplate reader (PowerWave XS, Bio Teck, Vicenza, Italy). This method included an adaptation of the method to 96-well microplate format. Results were compared with a curve of trolox and expressed as µmol TE/g dw.

2.7.4. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The total antioxidant powder of samples was evaluated by following the FRAP assay including an adaptation to 96-well microplate format according to the method previously described (González-Peña et al., 2013). All samples were run in quadruplicate at 593 nm. Results were compared with a standard curve prepared with trolox and expressed as µmol TE/g dw.

2.8. *Statistical analysis*

The results shown represent mean values ± standard deviation of three replicates obtained in at least two separate experiments. One-way (type of sample) ANOVA was conducted followed by the Tamhane's T2 (equal variances not assumed) and Tukey's b (equal variances assumed) post hoc tests and Student's t test were used to compare pairs of means and determine statistical significance at the $p \leq 0.05$ level. The correlations within variables were examined by Pearson correlation. All analyses were performed by using the IBM SPSS Statistics 22 Core System (SPSS Inc, an IBM Company, USA).

3. Results and discussion

3.1. Flavonol content and bioaccessibility

In the present study, the release of major flavonols from control (untreated) and HPP-onion was monitored during the different phases of a dynamic *in vitro* gastrointestinal digestion, i.e. buccal phase (BP), gastric digest (GD), intestinal digest (ID) and

bioaccessible fraction (BF) (Table 1). Previously the majority onion flavonols were identified and quantified by HPLC-DAD. Flavonol profile of control onion powder (non-digested) is shown in the HPLC-DAD chromatogram recorded at 360 nm (Fig.3). Eight compounds were identified based on retention time, UV-visible absorption maxima and data reported in the literature (González-Peña et al., 2013). The two major flavonols were quercetin-3,4′-diglucoside (Q-3,4'-DiGlu) (58%) and quercetin-4′-glucoside (Q-4'-Glu) (32.5%). The rest of flavonols represented between 8 and 9% were isorhamnetin-4′-glucoside (Iso-4'-Glu) followed by quercetin, quercetin-3-glucoside (Q-3-Glu), isorhamnetin-3,4′-diglucoside (Iso-3,4'-DiGlu), quercetin-7,4′-diglucoside (Q-7,4'-DiGlu) and quercetin-3,7,4′-triglucoside (Q-3,7,4'-TriGlu) (Table 1). HPP-onion powder showed similar flavonol profile. HPP (400 MPa/25 ºC/5 min) significantly increased ($p < 0.05$) the concentration of the major onion flavonols which was 5% for Q-3,4'-DiGlu, 30% for Q-4'-Glu, 5% for Iso-3,4'-DiGlu and 14% for Q-3-Glu. In the present study, the increase in the concentration of Q-4'-Glu and Q-3,4'-DiGlu in HPP-onion was much lower than that described by González-Peña et al. (2013), which was 63.2% and 69.6%, respectively. This different result may be due to the different raw onion employed which was from different crop location and harvest year. These results agree with those reports for other authors that show that HPP are able to increase the extraction of phenolic compounds due to the changes produced by this treatment in the food matrix such as cell wall disruption and this effect is very depend on the food matrix composition (Queiroz et al., 2010; Rodríguez-Roque et al., 2015; Roldan-Marín et al., 2009; Vázquez-Gutiérrez et al., 2013).

In general, the effect of GID digestion on individual flavonols concentration in HPP-onion was comparable to that observed in control onion. The concentration of onion flavonols decreased gradually from buccal phase (BP) to intestinal digest (ID) in both samples (control and HPP) (Table 1).

Table 1. Concentration of flavonols (µg/g dw) in the different phases of gastrointestinal digestion of onion (control and HPP).

Compound	Treatment[a]	Non-digested	Buccal Phase (BP)	Gastric Digest (GD)	Intestinal Digest (ID)	Bioaccessible Fraction (BF)
Quercetin-3-glucoside	Control	101.95 ± 1.0^{dA}	105.88 ± 4.0^{dA}	93.22 ± 5.4^{cA}	80.01 ± 4.8^{bA}	22.93 ± 1.6^{aA}
	HPP	116.30 ± 0.4^{dB}	111.77 ± 2.4^{cB}	92.43 ± 5.8^{bA}	90.06 ± 1.5^{bB}	24.26 ± 3.6^{aA}
Quercetin-4′-glucoside	Control	2819.23 ± 46.0^{cA}	2933.55 ± 159.8^{cA}	3998.823 ± 75.1^{dA}	2571.20 ± 60.0^{bA}	136.05 ± 1.7^{aA}
	HPP	3659.63 ± 8.1^{cB}	3835.6 ± 43.2^{cdB}	4615.65 ± 577.5^{cdA}	3029.56 ± 317.0^{bB}	225.45 ± 41.0^{aB}
Quercetin-3,4′-diglucoside	Control	5056.71 ± 6.4^{dA}	3847.96 ± 86.3^{cA}	2187.24 ± 258.0^{bA}	1971.09 ± 212.7^{bA}	1266.92 ± 165.4^{aA}
	HPP	5321.74 ± 9.1^{dB}	4091.45 ± 46.4^{cB}	2194.23 ± 118.2^{bA}	2142.47 ± 122.0^{bA}	1257.62 ± 42.0^{aA}
Quercetin-7,4′-diglucoside	Control	46.74 ± 0.6^{bA}	42.84 ± 2.9^{bA}	54.66 ± 2.5^{cA}	32.20 ± 0.3^{aA}	32.56 ± 2.4^{aA}
	HPP	63.19 ± 0.3^{cdB}	59.14 ± 6.6^{cB}	66.14 ± 6.6^{cdB}	49.28 ± 1.8^{bB}	39.95 ± 4.6^{aB}
Quercetin-3,7,4′-triglucoside	Control	28.03 ± 1.8^{cA}	8.98 ± 0.1^{bA}	3.98 ± 0.7^{aA}	9.46 ± 0.68^{bA}	5.98 ± 0.9^{aA}
	HPP	27.79 ± 0.8^{cA}	9.48 ± 0.3^{bB}	4.19 ± 0.1^{aA}	11.10 ± 0.67^{bB}	10.25 ± 3.8^{bA}
Quercetin	Control	137.52 ± 34.7^{bB}	169.96 ± 18.8^{bA}	310.13 ± 13.9^{dA}	205.11 ± 21.2^{cA}	8.10 ± 0.3^{aA}
	HPP	82.97 ± 18.6^{bA}	143.79 ± 29.7^{cA}	322.07 ± 41.8^{eA}	214.86 ± 33.5^{dA}	8.69 ± 2.4^{aA}
Isorhamnetin-4′-glucoside	Control	355.75 ± 3.0^{dA}	309.79 ± 13.8^{cA}	305.55 ± 15.9^{cA}	213.83 ± 5.2^{bA}	19.52 ± 0.1^{aA}
	HPP	373.12 ± 6.4^{dB}	334.62 ± 24.6^{cdA}	313.37 ± 14.4^{cA}	221.96 ± 5.2^{bA}	34.97 ± 14.1^{aA}
Isorhamnetin-3,4′-diglucoside	Control	105.41 ± 1.7^{eA}	84.58 ± 8.4^{dA}	78.34 ± 5.4^{cA}	53.91 ± 2.2^{bA}	47.52 ± 0.4^{aA}
	HPP	106.51 ± 1.2^{cdA}	91.19 ± 8.5^{cA}	77.63 ± 2.0^{bA}	58.83 ± 0.1^{aB}	102.4 ± 42.3^{cdB}

[a] Control, untreated; HPP, high-pressure processing. Data are expressed as the mean (µg/g dw) ± SD (n=4). NF=not found. Different small letter in a row for the same compound and treatment (control or HPP) indicate significant differences ($p < 0.05$) among the different phases of gastrointestinal digestion (ANOVA and posterior Tamhane´s T2 and Tukey´s b post hoc test were applied). Different capital letters in a column for the same compound and digestion phase indicate significant differences ($p < 0.05$) among treatments (control and HPP) (Student´s test).

In the buccal phase simulation (BP), the concentration of most flavonols in control- and HPP-onion decreased significantly ($p < 0.05$) compared with the non-digested samples, except Q-4'-Glu that maintained its initial concentration. This result may be due to the less water-soluble phenolic compounds such as quercetin derivatives were poorly extracted in the hydrophilic conditions of the simulated BP (Gawlik-Dziki, 2012). Moreover, quercetin aglycone concentration in BP of HPP-onion increased by 73% in comparison with the non-digested sample (Table 1). The hydrolysis of quercetin gylcosides into the corresponding aglycone as consequence of the reaction with human saliva (BP) has been previously observed (Kahle et al., 2011).

In the gastric digest (GD) of control- and HPP-onion, the most of flavonols significantly decreased their concentration compared to non-digested samples. Thus, Q-3,4'-DiGlu decreased its concentration in GD approximately 58% in both samples (control and HPP), meanwhile Q-4'-Glu showed a significantly ($p < 0.05$) increase in control- (42%) and HPP-onion (26%) (Table 1). In the present study, the concentration of quercetin aglycone increasing progressively through the gastrointestinal digestion due to the hydrolysis of quercetin glycosides reaching a maximum in the acid conditions of GD. The quercetin concentration in the GD phase of control and HPP-onion was more than two and four times, respectively, than the initial concentration of their corresponding non-digested samples (Table 1). Bouayed et al. (2012) observed that apple quercetin glycosides were resistant to acid hydrolysis occur in the GD and reached the small intestine intact. Other authors have indicated that the low pH and gastric enzymes could hydrolyze the protein and carbohydrates bound to flavonoids improving the extractability of these compounds (Saura-Calixto et al., 2007). Rodríguez-Roque et al. (2013) and Tagliazucchi et al. (2010) showed that quercetin concentration diminished under gastric conditions, in blended fruit juice and grapes, respectively. Therefore, taking into account the above mentioned, the

329 stability of quercetin glycosides in the acidic conditions of GD depends on the food matrix
330 that contains them.

331 The intestinal digestion (ID) of control- and HPP-onion resulted in a significant ($p <$
332 0.05) reduction in the concentration of the majority onion flavonols compared with GD
333 (24-36%) (Table 1). Several authors reported that quercetin and other phenolic compounds
334 decrease its concentration under intestinal conditions (Rodríguez-Roque et al., 2014b). The
335 reduction of flavonols concentration in the ID may be related to the formation of
336 complexes with other dietary constituents (fibre, proteins and iron) (Quiros-Sauceda et al.,
337 2014).

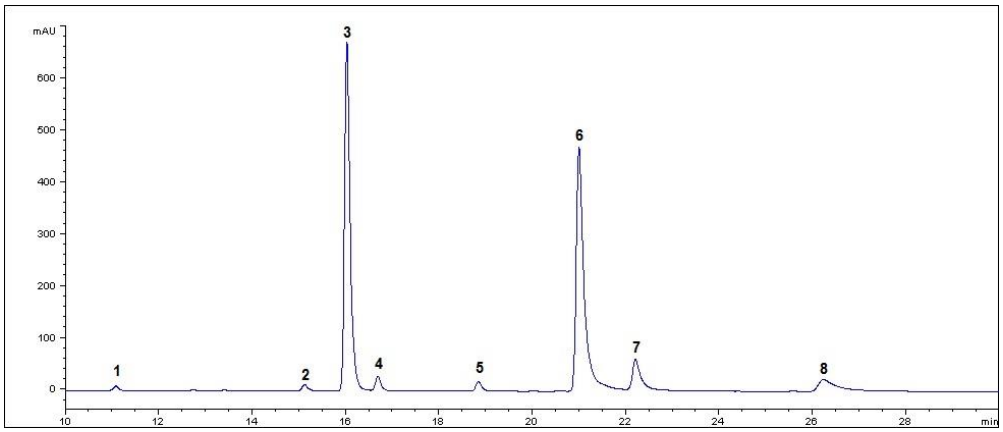


Fig.3. HPLC-DAD chromatogram at 360 nm of control onion. Peaks: (1) quercetin-3,7,4′-triglucoside, (2) quercetin-7,4′-diglucoside, (3) quercetin-3,4′-diglucoside, (4) isorhamnetin-3,4′-diglucoside, (5) quercetin-3-glucoside, (6) quercetin-4′-glucoside, (7) isorhamnetin-4′-glucoside, (8) quercetin.

338 In order to exert their bioactivity, flavonols have first to be bioaccessible, i.e. release
339 from the food matrix, solubilise and reach the GID phase known as bioaccessible fraction
340 (BF). All individual flavonols identified in the non-digested onion samples (control and
341 HPP) were also found in their respective bioaccessible fractions (BF), albeit at 30-95%
342 lower concentration than in the non-digested samples.

Table 2. Bioaccessibility (%) of individual and total flavonols in control and HPP-onion in comparison with a dietary supplement of quercetin

	Control[a]	HPP[a]	Dietary Supplement
Quercetin-3-glucoside	22.49	20.85	
Quercetin-4′-glucoside	4.82	6.16	
Quercetin-3,4′-diglucoside	25.05	23.63	
Quercetin-7,4′-diglucoside	69.65	63.22	
Quercetin-3,7,4'-triglucoside	21.34	36.88	
Quercetin	5.89	10.47	0.028
Isorhamnetin-4′-glucoside	5.49	9.37	
Isorhamnetin-3,4′-diglucoside	45.08	96.14	
Total flavonols	**17.79**	**17.47**	**0.028**

[a] Control, untreated; HPP, high-pressure processing

343 Table 2 show the bioaccessibility of individual flavonols from control- and HPP-onions.
344 The higher bioaccessibility (%) was found in the quercetin diglucosides in both samples
345 (control and HPP) such as Q-7,4'-DiGlu (69.65% and 63.22%), Q-3,4'-DiGlu (25.05% and
346 23.63%) and Iso-3,4'-DiGlu (45.08% and 96.14%). Q-3,7,4'-TriGlu showed a good
347 bioaccessibility in both control (21%) and HPP-onion (37%). The lower bioaccessibility
348 was found in the monoglucosides derivatives Q-4'-Glu, Iso-4'-Glu and quercetin. In
349 general, quercetin glycosides derivatives presented higher absorption efficiency than its
350 aglycone (Manach et al., 2004). In the present study, quercetin showed a bioaccessibility
351 of 5.9 and 10.5 % in control and HPP-treated onion, respectively (Table 2). Similar
352 quercetin bioaccessibility was found in blended fruit juice-milk beverage and fruit juice
353 (11.0% and 13 %, respectively) (Rodríguez-Roque et al., 2014a). In that case, the BF was
354 obtained by dialysis, meanwhile in the present study the BF was obtained by
355 centrifugation. Centrifugation or filtration of the intestinal phase has been considered

adequate methods to estimate the bioaccessibility of bioactive compounds (Bérmudez-Soto et al., 2007).

Fig. 4A shows the evolution of total flavonols in control- and HPP-onion through the dynamic gastrointestinal digestion (GID). In general, the concentration of total flavonols in the different GID phases of HPP-onion was higher than in the control-onion (Fig.4A). The release of total flavonols in onion (control and HPP) during a GID has been compared with the effect of GID on a commercial dietary supplement of quercetin extracted from onion (without food matrix) in order to determine the effect of food matrix on total flavonols bioaccessibility (Fig. 4B). Figure 4 shows a progressive decrease in total flavanol concentration through the digestion of both, onion samples and quercetin dietary supplement. Total flavonol concentration was 13% higher in non-digested HPP-onion than in control-onion (Fig. 4A). Moreover, a significant higher total flavonol concentration between 9-16% was detected in the GID phases of HPP-onion compared with control-onion. Total flavonols release was around 25% lower in the ID than GD in comparison with the non-digested samples (control and HPP). Nevertheless, the bioaccessibility of total flavonols was similar in both control and HPP-onion (17.5 and 17.8%, respectively) (Table 2). Similar results were found by Rodriguez-Roque et al. (2014b) that determined a 18% of bioaccessibility for total phenolic acids in a fruit juice-milk beverage (Rodríguez-Roque et al., 2014b). However, the GID of dietary supplement of quercetin produced a dramatic decrease of 90% and 97% of the quercetin extracted in the GD and ID, respectively in comparison with the non-digested product (Fig 4B). In fact, the bioaccessibility of the quercetin dietary supplement was very low (0.028%) in comparison with the bioaccessibility of quercetin and total flavonols in control-onion (5.89% and 17.79%) and HPP-onion (10.47% and 17.47%) (Table 2). Therefore, onion matrix affected

positively the bioaccessibility of flavonols in comparison with a quercetin obtained from onions and commercialized as a dietary supplement.

It is expected that flavonols present in the ID phase of onion or quercetin dietary supplement that do not reach the bioaccessible fraction would pass into the large intestine where could exert a beneficial effect on intestinal microbiota an in consequence on human health.

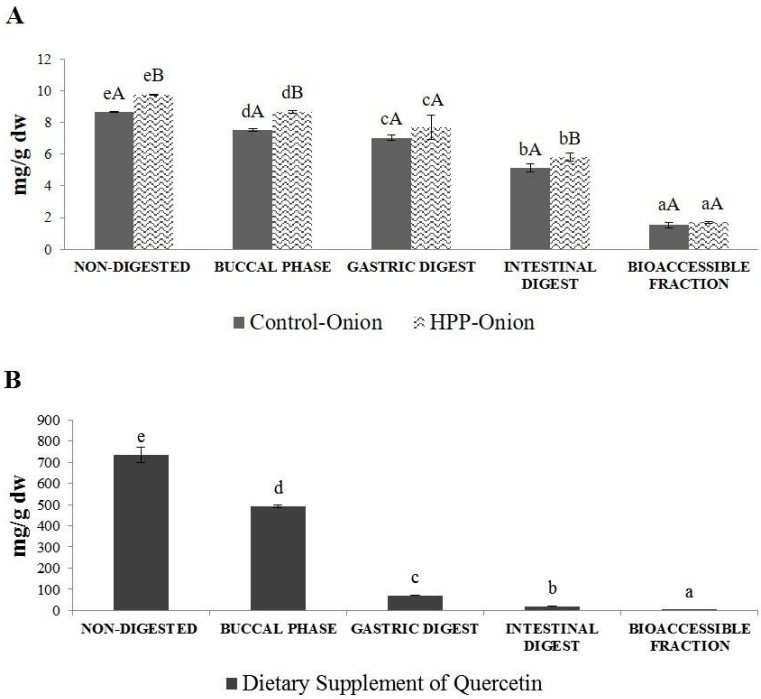


Fig.4. Effect of gastrointestinal digestion on total flavonols content in control and high-pressure processed onion. Different small letter indicates significant differences ($p < 0.05$) for the same compound and onion sample (control or HP-treated) among the different phases of digestion (ANOVA and posterior Tamhane´s T2 and Tukey´s b post hoc test were applied). Different capital letters for the same compound and phase of digestion indicate significant differences ($p < 0.05$) between control and HP-treated onion (Student´s test).

3.2. Antioxidant activity

Onion flavonols are known to be potent antioxidants in addition to have other beneficial effects on human health (González-Peña et al., 2013; Roldán-Marín et al., 2012). The antioxidant activity (AA) was evaluated by four different methods, total phenols by

391 Folin Ciocalteu (TP-FC), DPPH$^{\bullet}$ radical scavenging assay, ABTS$^{\bullet+}$ radical cation
392 scavenging assay and FRAP assay. In the present study, non-digested HPP-onion powder
393 (400 MPa/25 ºC/5 min) showed similar AA values than control-onion by the ABTS$^{\bullet+}$ and
394 FRAP assays while AA significant increased 6% by TP-FC (Table 3). However, González-
395 Peña et al. (2013) showed that onion powder processed by the same HPP treatment
396 presented different AA results. These authors found a significant increase of AA
397 determined by ABTS$^{\bullet+}$ (25.4%) and FRAP (15%) assays and a significant decrease of AA
398 analysed by DPPH$^{\bullet}$. This different behavior observed for the same vegetal (onion) and
399 HPP treatment could be due to differences in the food matrix as consequence of the
400 different origin of raw onions used in both studies. Other studies showed a significant
401 increase of AA values in plant products treated by HPP such as green beans and apples,
402 among others (Briones-Labarca et al., 2011; McInerney et al., 2007).

403 Antioxidant activity (AA) values of the different phases of GID of control and
404 HPP-onion are shown in Table 3. In general, the AA was higher in GID phases of HPP-
405 onion than in control onion. Significant statistical positive correlations were found between
406 total flavonol content (Fig. 4) and antioxidant values (Table 4). Total flavonols content was
407 positively correlated with AA values of ABTS$^{\bullet+}$ ($R = 0.838$, $p < 0.01$) and FRAP ($R =$
408 0.794, $p < 0.01$). Also, a significant positive correlation was found between total TP-FC
409 and DPPH$^{\bullet}$ ($R=0.974$, $p < 0.01$) (Table 4). These results have demonstrated that flavonols
410 released during simulated GID of control- and HPP-onion could be able to reduce free
411 radicals by hydrogen donation, as assessed by ABTS$^{\bullet+}$ and DPPH$^{\bullet}$ assays, or by electron
412 donation, as assessed by the FRAP assay. Also, the different GID phases have
413 demonstrated important reducing capacity by TP-FC assay which was correlated with
414 DPPH$^{\bullet}$ assay (Table 3) (Huang et al., 2005).

415 The AA values in the buccal phase (BP) were similar to those found in the non-
416 digested onion, except in ABTS$^{\bullet+}$ assay which were lower. The GD showed significant
417 higher ($p < 0.05$) AA values compared with non-digested onion, except in ABTS$^{\bullet+}$ assay
418 which were lower. Similar results, were reported by Wootton-Beard et al. (2011) where
419 FRAP values of gastric phase of 23 vegetables juices were significantly ($p < 0.05$) higher
420 than those of non-digested values.

421 In the present study, the higher AA values determined by ABTS$^{\bullet+}$ and FRAP were
422 found in the gastric digest (GD) meanwhile the intestinal digest (ID) showed the higher
423 AA values determined by DPPH$^{\bullet}$ and TP-FC (Table 3).

Table 3. Antioxidant activity of different phases of gastrointestinal digestion of onion (control and HPP).

Antioxidant Activity	Treatment[a]	Non-digested	Buccal Phase (BP)	Gastric Digest (GD)	Intestinal Digest (ID)	Bioaccessible Fraction (BF)
DPPH$^{\bullet}$[b]	Control	8.24±0.26^{bB}	8.52±0.73^{bA}	10.84±0.66^{cA}	20.46±1.93^{dA}	4.55±0.34^{aA}
(μmol TE/g dw)	HPP	7.45±0.84^{aA}	10.37±1.5^{bB}	13.22±1.47^{cB}	22.82±1.41^{dB}	6.64±0.8^{aB}
ABTS$^{\bullet+}$[c]	Control	29.14±1.41^{dA}	10.94±1.25^{bA}	14.94±1.00^{cA}	13.45±2.13^{bcA}	3.5±0.39^{aA}
(μmol TE/g dw)	HPP	28.42±0.88^{dA}	14.11±1.63^{bB}	20.07±1.79^{cB}	17.14±4.06^{bcB}	3.57±0.44^{aA}
FRAP[d]	Control	19.26±3.58^{bA}	18.96±1.13^{bA}	26.17±2.02^{cA}	16.38±3.81^{bA}	5.17±0.25^{aA}
(μmol TE/g dw)	HPP	18.66±0.5^{bA}	23.48±1.95^{cdB}	30.06±4.84^{dA}	19.91±3.23^{bcA}	5.52±0.45^{aA}
TP-FC[e]	Control	4.17±0.05^{bA}	4.34±0.13^{bA}	4.91±0.14^{cA}	7.41±0.11^{dA}	3.73±0.1^{aA}
(mg/g dw)	HPP	4.43±0.06^{bB}	4.44±0.22^{abA}	5.06±0.12^{cB}	8.66±0.31^{dB}	4.22±0.09^{aB}

[a]Control, untreated; HPP, high-pressure processing. Data are expressed as the mean ± SD (n=4). Different small letter in the same row indicate significant differences ($p < 0.05$) for the same determination and onion sample (control and HPP) among the different phases of gastrointestinal digestion (ANOVA and posterior Tamhane´s T2 and Tukey´s b post hoc test were applied). Different capital letters in the same column for the same determination and digestion phase indicate significant differences ($p < 0.05$) between control onion and HPP-onion (Student´s test). [b]DPPH$^{\bullet}$, Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; [c]ABTS$^{\bullet+}$, 2,2´-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation; [d]FRAP, Ferric reducing antioxidant power; [e]TP-FC, Total phenolic content determined by Folin-Ciocalteu method.

424

425 The AA value may be affected by pH due to the transition from acid conditions (pH
426 2) in GD to neutral or slightly basic environment (pH 6.5-7) in the ID may result in a better
427 extraction of antioxidant compounds caused by a deprotonation of hydroxyl moieties
428 present in the aromatic rings of phenolic compounds (Bouayed et al., 2011). FRAP assay
429 was conducted in a pH 3.6, which may explain the major AA in GD determined by this
430 method.

Table 4. Pearson´s Correlation Coefficients (R) among total flavonols and antioxidant activities (TP-FC, DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$ and FRAP) in different gastrointestinal digestion phases of onion (control and HPP).

	TP-FC	DPPH$^{\bullet}$	ABTS$^{\bullet+}$	FRAP
Total flavonols	-0.26 [b]	0.089 [b]	0.838 [a]	0.794 [a]
TP-FC[c]	1	0.974 [a]	0.087 [b]	0.205 [b]
DPPH$^{\bullet}$[d]		1	0.145 [b]	0.367 [b]
ABTS$^{\bullet+}$[e]			1	0.595 [b]
FRAP[f]				1

[a] *p* value for Pearson´s correlation coefficient <0.01; [b] *p* value for Pearson´s correlation coefficient > 0.01; [c]TP-FC, Total phenolic content determined by Folin-Ciocalteu method; [d] DPPH$^{\bullet}$, Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; [e]ABTS$^{\bullet+}$, 2,2´-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation; [f] FRAP, Ferric reducing antioxidant power .

431 The bioaccessible fraction (BF) presented significantly ($p < 0.05$) lower AA values
432 calculated by the four different methods assayed than the other GID phases and non-
433 digested samples. This result agrees with the lower flavonol content in BF compared with
434 the others GID phases (ID, GD, BP). The highest decreases (70-80%) of AA value in the
435 BF compared to non-digested onion were determined by ABTS$^{\bullet+}$ and FRAP assays.
436 Nevertheless, the lower decrease was observed in TP-FC that was about 5% for control-
437 onion and 11% for HPP-onion. Previous results showed higher decreases of 55% in the AA
438 value in the BF of apple product determined by TP-FC assay (Bouayed et al., 2011).

439 In conclusion, the AA values in the bioaccessible fraction (BF) of onion products
440 (control and HPP) were significantly lower than those obtained in the non-digested

441 samples. These results support the importance to determine the AA in the BF obtained
442 after a simulated gastrointestinal digestion instead of in the non-digested product.

443 **4. Conclusions**

444 HPP (400 MPa/25 ºC/5 min) combined with freeze-drying produced a significant
445 increase ($p < 0.05$) of the major onion flavonols, 5% for Q-3,4'-DiGlu, 30% for Q-4'-Glu,
446 5% for Iso-3,4'-DiGlu and 14% for Q-3-Glu, meanwhile the others maintained the initial
447 concentration found in control-onion. In the present study the quercetin aglycone
448 concentration was increasing progressively through the gastrointestinal digestion due to the
449 hydrolysis of quercetin glycosides reaching a maximum in the acid conditions of GD
450 where the concentration of quercetin increased more than two times in control-onion and
451 four times in HPP-onion compared with their corresponding non-digested samples.

452 During gastrointestinal digestion, the concentration of individual and total onion
453 powder flavonols decreased gradually from buccal phase (BP) to intestinal digest (ID) in
454 both onion samples (control and HPP) and in the quercetin dietary supplement. All
455 individual flavonols identified in the non-digested onion samples (control and HPP) were
456 also found in their respective bioaccessible fractions (BF), albeit at much lower
457 concentrations (30-95%) than in the non-digested samples. In both samples (control and
458 HPP), the higher bioaccessibility was found in the quercetin diglucosides and the lower in
459 the quercetin monoglucosides and in the quercetin aglycone.

460 In general, the concentration of total flavonol in the different GID phases of HPP-
461 onion was higher than in the control-onion except in the bioaccessible fraction (BF) that
462 was similar and 82% lower than in the non-digested samples. Although, HPP increased the
463 extraction of major onion flavonols in non-digested onion and total flavonols in the GID
464 phases, the bioaccessibility of total flavonols in HPP was similar than in control. In fact,

total flavonols bioaccessibility from onion matrix (~17.7%) (control and HPP) was significant higher than in those determined in a dietary supplement of quercetin (0.028%) (without food matrix). Therefore, it seems that food matrix affected positively the bioaccessibility of flavonols.

Regarding antioxidant activity of digested onion, the higher AA values determined by $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP were found in the gastric digest (GD) meanwhile the intestinal digest (ID) showed the higher AA values determined by $DPPH^{\bullet}$ and TP-FC. A significant ($p < 0.05$) decrease of 70-80% and 5-11% in the AA of BF in comparison with non-digested samples were determined by $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP assays and by $DPPH^{\bullet}$ and TP-FC, respectively. Considering the total GID, significant statistical positive correlations were found between total flavonol content and antioxidant values determined by $ABTS^{\bullet+}$ ($R = 0.838$, $p < 0.01$) and FRAP ($R = 0.794$, $p < 0.01$). Also, a significant positive correlation was found between total TP-FC and $DPPH^{\bullet}$ ($R=0.974$, $p < 0.01$).

In conclusion, the flavonol content and AA values in the BF of onion products (control and HPP) were significantly lower than those obtained in the non-digested samples. These results support the importance of employing an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion to determine the flavonols concentration and their bioaccessibility in addition to antioxidant activity in the BF instead of in the non-digested product, in order to calculate more accurately the daily intake amount necessary to provide a healthy effect. Also, GID model allowed determining that flavonols inside the onion matrix were more bioaccessible than when they were outside of it (quercetin dietary supplement). However, further studies on food matrix composition must be performed to clarify what dietary onion constituents affect bioactive compounds bioaccessibility in order to validate the *in vitro* dynamic GID model.

Acknowledgements

This study has been funded by the Spanish project AGL2013-46326-R (Ministry of Economy and Competitiveness).

References

Barba, F.J., Esteve, M. J., Frígola, A., (2012). High pressures treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: A review. Comp. Rev. Food Sci. Food Saf., 11 (3), 307-322.

Blanquet-Diot, S., Soufi, M., Rambeau, M., Rock, E., Alric, M., (2009). Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic in vitro gastrointestinal system. J. Nutr. 139(5), 876-883.

Bouayed, J., Deusser, H., Hoffmann, L., Bohn, T., (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. Food Chem. 131(4), 1466-1472.

Bouayed, J., Hoffmann, L., Bohn, T., (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. Food Chem. 128(1), 14-21.

Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., Maureira, H., (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. Food Chem. 128(2), 520-529.

Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frigola, A., (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf. 13(2), 155-171.

Cilla, A.; Alegría, A., De Ancos, B.; Sánchez-Moreno, C., Cano, MP., Plaza, L., Clemente, G., Lagarda, M.J., Barberá, R., (2012). Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids and ascorbic acid from milk and soya-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. J. Agric. Food Chem. 60(29), 7282-7290.

Colina-Coca, C, Rodríguez-Alcalá L.M, Fontecha, J, González-Peña, D, De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., (2014). Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. Food Res. Int. 64, 546-552.

Erlund, I., (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin naringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. Nutr. Res. 24(10), 851-874.

Fernández-García, E., Carvajal-Lerida, I., Perez-Galvez, A., (2009). *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. Nutr. Res. 29(11), 751-760.

Ferrari, G., Maresca, Pl, Ciccarone, R., (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: pommegranate juice. J Food Eng. 100: 245-253.

Gawlik-Dziki, U., (2012). Changes in the antioxidant activities of vegetables as a consequence of interactions between active compounds. J. Funct. Food. 4(4), 872-882.

González-Peña, D., Colina-Coca, C., Char, C.D., Cano, M.P., de Ancos, B., Sanchez-Moreno, C., (2013). Hyaluronidase inhibiting activity and radical scavenging potential of flavonols in processed onion. J. Agric. Food Chem. 61(20), 4862-4872.

González-Peña, D., Angulo, J., Vallejo, S., Colina-Coca, C., De Ancos, B., Sánchez-Ferrer, C.F., Peiró, C., Sánchez-Moreno, C., (2014). High-cholesterol diet enriched with onion affects endothelium-dependent relaxation and NADPH oxidase activity in mesenteric microvessels from Wistar rats. Nutr. Metab. 57,11.

González-Peña, D., Dudzik, D, Colina-Coca, C., De Ancos, B., García, A., Barbas, C., Sánchez-Moreno, C., (2015). Evaluation of onion as a functional ingredient in the prevention of metabolic impairments associated to diet-induced hypercholesterolaemia using a multiplatform approach based on LC-MS, CE-MS and GC-MS. J. Func. Foods. 19, 363-375.

Guo, Y., Bruno, R.S., (2015). Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. J. Nutr. Biochem. 26(3), 201-210.

Hernández-Carrión, M., Vazquez-Gutierrez, J.L., Hernando, I., Quiles, A., (2014). Impact of high hydrostatic pressure and pasteurization on the structure and the extractability of bioactive compounds of persimmon "Rojo Brillante". J. Food Sci. 79(1), C32-C38.

Huang, D., Ou, B., Prior, R., (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. J. Agric. Food Chem. 53, 1841-1856

Kahle, K., Kempf, M., Schreier, P., Scheppach, W., Schrenk, D., Kautenburger, T., Hecker, D., Huemmer, W., Ackermann, M., Richling, E., (2011). Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols. Eur. J. Nutr. 50(7), 507-522.

Lee, J., Mitchell, A.E., (2012). Pharmacokinetics of quercetin absorption from apples and onions in healthy humans. J. Agric. Food Chem. 60(15), 3874-3881.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L., (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. Am. J. Clin. Nutr. 79(5), 727-747.

Mujica-Paz, H.,Valdez-Fragoso, A., Samson, C.T., Welti-Chanes, J.,Torres, J.A., (2011). High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. Food Bioprocess Tech. 4(6), 969-985.

McInerney, J.K., Seccafien, C.A., Stewart, C.M., Bird, A.R., (2007). Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 8(4), 543-548.

Pérez-Gregorio, R.M., García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J., Rodrigues, A.S., Almeida, D.P.F. (2010). Identification and quantification of flavonoids in traditional cultivars of red and white onions at harvest. J. Food Comp. Anal. 23, 592-598.

Plaza, L., Colina, C., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M.P., (2012). Influence of ripening and astringency on carotenoid content of high-pressure treated persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.). Food Chem. 130, 591-597.

Queiroz, C., Moreira, C.F.F., Lavinas, F.C., Lopes, M.L.M., Fialho, E., Valente-Mesquita, V.L., (2010). Effect of high hydrostatic pressure on phenolic compounds, ascorbic acid and antioxidant activity in cashew apple juice. High Pressure Res. 30(4), 507-513.

Quiros-Sauceda, A.E., Palafox-Carlos, H., Sayago-Ayerdi, S.G., Ayala-Zavala, J.F., Bello-Perez, L.A., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A., Gonzalez-Cordova, A.F., González-Aguilar, G.A., (2014). Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. Food Funct. 5(6), 1063-1072.

Rastogi, N.K., Raghavarao, KSMS, Balasubramaniam, V.H. , Niranjan, K., Knorr, D., (2007). Opportunities and challenges in high pressures processing of foods. Crit Rev Food Sci Nutr. 47, 69-112.

Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Grau, M.A., Elez-Martinez, P., Martin-Belloso, O., (2013). Changes in vitamin c, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. J. Agric. Food Chem. 61(8), 1859-1867.

Rodríguez-Roque, M.J., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M.P., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. J. Funct. Foods. 14, 33-43.

Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Grau, M.A., Elez-Martinez, P., Martin-Belloso, O., (2014a). In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk-based beverages. Food Res. Int. 62, 771-778.

Rodríguez-Roque, M.J., Rojas-Grau, M.A., Elez-Martinez, P., Martin-Belloso, O., (2014b). In vitro bioaccessibility of health-related compounds from a blended fruit juice-soymilk beverage: Influence of the food matrix. J. Funct. Food. 7, 161-169.

Roldán-Marín, E., Sánchez-Moreno, C., Lloria, R., de Ancos, B., Cano, M.P., (2009). Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. LWT-Food Sci. Technol. 42(4), 835-841.

Roldán-Marín, E., De Ancos, B., Cano, M.P., Sánchez-Moreno, C. (2012). Onion bioactive compounds and health effects. In C.B. Aguirre, L.M. Jaramillo (Eds.), *Onion Consumption and Health* (pp. 121-144). Nova Science Publishers, Inc. Hauppauge, Nueva York.

Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Plaza, L., Elez-Martinez, P., Cano, M.P., (2009). Nutritional Approaches and Health-Related Properties of Plant Foods Processed by High Pressure and Pulsed Electric Fields. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 49(6), 552-576.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martinez, P., De Ancos, B., Martin-Belloso, O., Cano, M.P. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. J. Agric. Food Chem. 53(11), 4403-4409.

Saura-Calixto, F., Serrano, J., Goni, I., (2007). Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. Food Chem. 101(2), 492-501.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., Conte, A., (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. Food Chem. 120(2), 599-606.

Tomé-Carneiro, J., Visioli, F. (2016). Polyphenol-based nutraceuticals for the prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence. Phytomedine, 23:1145-1174.

Vázquez-Gutiérrez, J.L., Plaza, L., Hernando, I., Sanchez-Moreno, C., Quiles, A., De Ancos, B., Cano, M.P. (2013). Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. Food Funct. 4(4), 586-591.

Viadel Crespo, B., Rivera Patiño, J.D., Navarro Fayos, M.T., Tenllado Llavador, I., Carreres Malonda, J.E., García Reverter, J., Blasco Piquer, M., Subirats Huerta, S., (2012). Equipo modular de digestión in vitro, Patent:ES 2 361 983 B1.

Villemejane, C., Denis, S., Marsset-Baglieri, A., Alric, M., Aymard, P., Michon, C., (2016). *In vitro* digestion of short-dough biscuits enriched in proteins and/or fibres using a multi-compartmental and dynamic system (2): Protein and starch hydrolyses. Food Chem. 190, 164-172.

Williams, D,J., Edwards, D., Hamerning, I., Jian, L., James, A.P., Johnson, S.K., Tapsell, L.C. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: a review. Food Res Int. 52: 323-33.

Wootton-Beard, P.C., Moran, A., Ryan, L., (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices

629 before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-
630 Ciocalteu methods. Food Res. Int. 44(1), 217-224.

Artículo 3:

Impact of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant capacity of apple treated by high-pressure processing

Irene Fernández-Jalao, Claudia Balderas, Concepción Sánchez-Moreno, Begoña De Ancos

Innovative Food Science and Emerging Technologies, 102486 (2020)

DOI:doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102486

Impact of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant capacity of apple treated by high-pressure processing

Irene Fernández-Jalao, Claudia Balderas, Concepción Sánchez-Moreno, Begoña De Ancos*

Department of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), C/ José Antonio Novais 10, Madrid 28040, Spain

* Corresponding author. Tel.: +34 915492300

E-mail addresses: ancos@ictan.csic.es (B. De Ancos).

ABSTRACT

The aim was to evaluated the effect of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion (GID) on the recovery index and bioaccessibility, the stability of phenolic compounds, and the changes in antioxidant capacity (AC) of apples 'Golden Delicious' treated by high-pressure processing (HPP-treated). All the phenolic compounds decreased during GID in untreated and HPP-treated apple and in consequence a decrease in the antioxidant capacity ($DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$, TP-FC and FRAP) and in the effect on the inhibitory capacity of lipoxygenase (LOX) and xanthine oxidase (XO) activities was also observed. The dynamic-GID increased the release of quercetin-aglycone and led to low quercetin-glycosides bioaccessibility (~10%). HPP-treated compared to untreated-apple presented higher recovery index for hydroxycinnamic acids (~67% and 52%) and higher bioaccessibility for hydroxycinnamic acids (40% and 31%) and dihydrochalcones (30% and 19.5%). The bioaccessible fraction of HPP-treated apple showed a high retention of the undigested AC: 24% ($DPPH^{\bullet}$), 14% ($ABTS^{\bullet+}$), 86% (TF-FC), 48% (FRAP) and the 68% and 100% of XO and LOX inhibitory capacities.

Keywords: HPP; quercetin glycosides; chlorogenic acid; LOX; XO; CAT

Industrial relevance: The consumer is willing to pay for added value in functional foods or ingredients that represent a substantial improvement in terms of quality of life and health. Therefore, functional food industries need to find valid methods to guarantee that the bioactive compounds present in the functional food or ingredient are effective and should do the biological action for which they were designed. The functional food industry relies more and more on the technology implemented in *in vitro* digestion models that simulate gastrointestinal digestion, to assess the bioaccessibility of bioactive compounds as the first step to investigate their bioavailability. The current study provides relevant information for the use dynamic gastrointestinal models instead of the more frequently employed static models to obtain more exact data about the bioaccessibility of phenolic compounds of a functional apple ingredient obtained by high-pressure processing of apples pieces with peels.

These results should provide realistic information to the functional food industry about the amounts should be consumed of a certain functional food or ingredient to achieve the promised biological effect. This information can suppose an added value to these functional foods which will revert in the economic improvement and the prestige of the food industry.

Highlights

- HPP increase total flavonols extracted in apples but not their bioaccessibility
- HPP increase hydroxycinnamic acids and dihydrochalcones bioaccessibility in apples
- HPP-treated apple bioaccessible phenolic compounds have great potential as antioxidants

1. Introduction

The apple (Malus domestica Borkh.) is one of the most consumed fruit worldwide (USDA, 2019) and represent a significant source of dietary bioactive compounds (Briones-Labarca, Venegas-Cubillos, Ortiz-Portilla, Chacana-Ojeda, & Maureira, 2011; Oszmiański, Lachowicz & Gamsjäger, 2020). The dietary intake of apples has been associated with lower risk of cardiovascular diseases (Bondonno, Bondonno, Ward, Hodgson, & Croft, 2017), cancer, type-2-diabetes, obesity and inflammatory disorders, among others (Boyer & Liu, 2004; Tu, Chen & Ho, 2017).

The main compounds responsible to these health-protecting effects of apple consumption are proposed to be the phenolic compounds (Serra et al., 2012) due to their antioxidant properties, their ability to neutralize free radicals and protect cells against oxidative stress (Zhang & Tsao, 2016). Moreover, phenolic compounds can exert indirect antioxidant capacity due to their effect protecting antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) or glutathione peroxidase (GPX), enzymes that play an important role in cell protection breaking down reactive oxidative species (ROS) such as hydroperoxides and superoxide ions (Tsao, 2010). In addition, phenolic compounds have been related to the decrease of the activity of enzymes that produce ROS such as xanthine oxidase (XO), lipoxygenase (LOX), cyclooxygenase (COX), among others (Gawlik-Dziki, 2012).

The qualitative and quantitative phenolic composition of apples depends largely on the variety, environmental and agricultural practises, preharvest and postharvest conditions and type of processing (Boyer & Liu, 2004). The application of high-pressure processing (HPP) on plant foods such as onion, apple, fruit juices, beverages, among others, could produce an increase of the extractability of phenolic compounds due to changes in the food

matrix and in the cell wall permeability (Xu, Zhu, & Yu, 2016), and in consequence their bioaccessibility could also be improved (Briones-Labarca et al., 2011). Different apple products, mainly apple juices, submitted to HPP treatments maintained or increased the amount of phenolic compounds extracted and their antioxidant capacity, although this effect depend on the HPP conditions and apple variety (Fernández-Jalao, Sánchez-Moreno, & De Ancos, 2019; Landl, Abadias, Sarraga, Vinas, & Picouet, 2010). HPP has been proposed as an alternative to the traditional thermal processing technologies to obtain safe, nutritive fresh-tasting plant-derive, avoiding the degradation of nutrients and bioactive compounds as well as inhibiting microbial growth and enzyme activity (Balasubramaniam, Barbosa-Cánovas, & Lelieveld, 2016).

In terms of evaluation of the biological activity of the phenolic compounds of apple products, is much more important to know the fraction potentially available for further intestinal absorption (bioaccessibility) than the quantification of these compounds in the food matrix. During the gastrointestinal digestion, the food components (included phenolic compounds) are constantly exposed to different physical (temperature), chemical (pH) and biochemical (enzymes) conditions. As consequence, the bioaccessibility, bioavailability and bioactivity of these compounds are affected. Bioavailabitliy is defined as the fraction of ingested bioactive compounds that are digested, absorbed and metabolized through normal pathways. Additionally, the bioaccessibility is the fraction which is released from the food matrix during the gastrointestinal digestion and becomes available for absorption (Carbonell-Capella et al., 2014). In general, phenolic compounds are poorly absorbed during the gastrointestinal digestion although their bioaccessibility could be influenced by their chemical structure and by other components of the food matrix, like proteins, lipids and carbohydrates, but also by the food processing (Bohn, 2014).

In recent years, the impact of gastrointestinal digestion on the stability and bioaccessibility of phenolic compounds and on the antioxidant activities of different plant derived foods such as grapes (Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010), apple (Bouayed, Deusser, & Hoffmann, 2012), fruit juices (Quan et al., 2018), wild blueberry (Correa-Betanzo et al., 2014), maqui berry (Lucas-Gonzalez et al., 2016), dried fruit pomace (Gouw, Jung, & Zhao, 2017), leafy vegetables (Gunathilake, Ranaweera, & Rupasinghe, 2020), among others, have been extensively studied using static *in vitro* models. The static models easily simulate the physiological conditions of the human gastrointestinal digestion, usually using a single set of initial conditions (pH, concentration of enzymes, bile salts, etc.) for each part of the gastrointestinal tract. However, this simple approach is often not a realistic simulation of the more complex *in vivo* conditions, where the biochemical environment encountered is constantly changing and physical parameters such as shear and grinding forces can have a large impact on the breakdown of larger food particles and the release of nutrients. For that reason, some dynamic models have been developed in the last years to better mimic the human gastrointestinal digestion (Thuenemann, 2015).

Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of the different phases of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion model on the stability, recovery index and bioaccessibility of phenolic compounds of high-pressure processing treated apple product (HPP-treated apple). In addition, consequent changes in total antioxidant capacity of apple products during the gastrointestinal digestion determined by different methodologies were also studied. To our knowledge, there is not report available on investigating the effect of a simulated gastrointestinal digestion using a dynamic model on the stability and bioaccessibilty of phenolic compounds and on the antioxidant capacity of HPP-treated apple products.

2. Materials and methods

2.1. Raw material and sample preparation

'Golden Delicious' apples produced in the Northeastern of Spain (lowland climate) were purchased from a local supermarket in Madrid, Spain. The physical and physicochemical characteristics of the apple fruits were calculated according to Fernández-Jalao et al. (2019): weight (201.52±16.25 g); size (78.33±1.53 mm); water content (81.94 ± 0.07%); pH (3.64 ± 0.05), soluble solids (13.18 ± 0.97 ºBrix) and titratable acidity (0.13 ± 0.005 % of malic acid). Approximately 12 kg of apples were selected according to uniform colour and size, absence of external damages and stored at 4 ºC. The apples were washed and cut into small pieces of about 2 cm with skin and without core. Two batches of apples cubes were separated, one group correspond to untreated apples and the other group to the samples submitted to high-pressure processing (HPP-treated apple). For each group, 200 g of apples pieces were packed into low permeability plastic bags (BB4L, Cryovac, Barcelona, Spain) and sealed with light vacuum. Untreated apples were frozen with liquid nitrogen and lyophilized at 0.1 mbar and -90 ºC (Lyoalfa, Telstar S.A, Barcelona, Spain). Lyophilized samples were pulverized using an ultracentrifugal grinder ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Germany) to obtain a fine powder (0.5 mm of particle size) that was stored at -20 ºC until their analysis.

2.2. High-pressure processing (HPP)

Two bags with 200 g of apple cubes were introduced in the pressure unit vessel (two bags for each cycle) filled with pressure medium (water) and treated at 400 MPa at 35 ºC during 5 min. The hydrostatic pressure unit was formed by a vessel of 1925 mL capacity and it was able to work to a maximum pressure of 800 MPa and a maximum temperature of 70 ºC (High Pressure Iso-Lab System, Model FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power

LTD., Essex, UK). The compression rate was 3 MPa/s and decompression rate instantaneous. Pressure, time and temperature were controlled by a computer program, being constantly monitored and recorded during the process. HPP at 400 MPa/35 ºC/5 min has been employed due to previous results showing that this treatment maintained or even increased the main apple phenolic compounds (Fernández-Jalao et al. 2019). HPP-treated apples were immediately frozen with liquid nitrogen, lyophilized, pulverized and maintained at -20 ºC.

2.3. Characterization of untreated and HPP-treated apple products

The physicochemical, chemical and biochemical and characteristics of untreated and HPP-treated apple powders are shown in Table 1. Titratable acidity, pH, total vitamin C and ascorbic acid were determined according to Fernández-Jalao et al. (2019). Total pectin content (%) and degree of esterification (DE) (%) were determined according to Canteri-Schemin, Fertonani, Waszczynskyj, & Wosiacki (2005). Sugars and organic acids content were analysed according to Colina-Coca et al. (2014). Polyphenoloxidase (PPO), peroxidase (PPO) activity and soluble proteins were determination according to Hernández and Cano (1998). Soluble, insoluble and total fibre (AOAC 991.43, 2012) were also determined.

2.4. *In vitro* dynamic gastrointestinal digestion of untreated and HPP-treated apple products: recovery index and bioaccessibility

A dynamic gastrointestinal digester (DGD) was used to digest apple powder samples (untreated and HPP-treated). The DGD is a multi-compartmental, dynamic and computer-controlled system developed at AINIA Technologic Center (Valencia, Spain) based on Villemejane et al. (2016). The digester consists of two successive serial compartments simulating stomach and small intestine, respectively. Each compartment is formed by two

glass units with a flexible silicone wall jacket inside. Heated water to 37 ± 1 ºC is pumped through the space between the glass and silicone jacket to maintain the constant body temperature in all the system. Peristaltic movements, produced in both compartments stomach and small intestine, are simulated by alternate compression and relaxation of the flexible silicone walls following changes in the water pressure. The food received in the stomach compartment is mixed with gastric electrolytes and enzymes and is referred as digest or chyme. The transit of the chyme is controlled by an exponential formula (f= $1\text{-}2^{-(t/t1/2)\beta}$, where f, t, t1/2, and β represent the fraction of the food delivered, the emptying time, the half-emptying time, and a coefficient describing the shape of the curve, respectively) (Villamejane et al., 2016). The stomach emptying was programmed by a slow chyme transit (t1/2= 70 min and β=2) and also the small intestine emptying was done by slow transit (t1/2= 160 min and β=1.6). The chyme transit was regulated by opening or closing the peristaltic valve pumps that connect the compartments. The whole system is computer controlled through an operator panel and programmable logic controller.

In vitro gastrointestinal digestion process was performed on 37.5 g of freeze-dried and powdered apple (untreated and HPP-treated). The experiments began combining the apple powder with artificial saliva contained 9600 units of α-amylase, 30 mL of citrate buffer (pH 6), and 100 mL of electrolyte solution (NaCl, $CaCl_2$ and $NaHCO_3$). Milli-Q water was added to the mixture up to final weight of 300 g. This mixture was homogenized for two minutes and bubbled with nitrogen gas for ten minutes and then introduced in the gastric compartment representing the stomach, and the gastrointestinal digestion was started. Previously to digestion process, 10 mL gastric secretions (hydrochloric acid, gastric electrolytes solution, gastric lipase and pepsin) and 60 mL of intestinal secretions (sodium bicarbonate, intestinal electrolytes solution, pancreatin, bile and trypsin) were added to the stomach and small intestine compartments, respectively. The pH is continuously controlled

in the stomach (from pH 5 to pH 2) and small intestine (from pH 6.5 to pH 7) compartments by secretions of 1 M hydrochloric acid and 1 M sodium bicarbonate, respectively. Thus, the volume, the pH of the chyme and the digestive secretions introduced in each compartment are computer-controlled. The total *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion was performed during 360 min (from 0 to 120 min in the stomach and from 0 to 360 min in the small intestine) at 37 ºC in absence of light and under anaerobic conditions by injecting nitrogen gas in the system.

To monitor the release of individual polyphenols from apple products at different stages of digestion, aliquots from the artificial saliva treatment (oral phase), gastric digest at 120 min and intestinal digest from 0 to 360 min were separated and acidified to pH 2. Then, these aliquots were frozen and stored at -20 ºC until its analysis. The rest of the intestinal digest at pH 2 was centrifuged (Sigma Laboratory Centrifuge at 6K15) at 3890 *g* at 4 ºC for 60 min and the supernatant were separated. This supernatant represents the bioaccessible fraction (BF) or soluble fraction according to procedure described in different studies (Tagliazucchi et al., 2010). Centrifugation has been recognized as valid systems to determine de compounds available for intestinal absorption (Alegría, Garcia-Llatas, & Cilla, 2015). The bioaccessible fraction was immediately frozen and stored at -20 ºC until its analysis. *In vitro* digestion of each sample was done in duplicate.

To evaluate the effect of food matrix (untreated and HPP-treated) and the different gastrointestinal phases on the phenolic compounds, two different indexes were studied: the recovery index (%) (by group of phenolic compounds) and bioaccessibility (%) (by groups and by individual phenolic compounds).

Recovery index (RIX) (%) allows to measure the amount of total phenolic compounds of the same group (flavonols, flavan-3-ols, hydroxycinnamic acids and dihydrochalcones)

present in the digest of the oral, gastric and intestinal phase (Ortega, Macia, Romero, Reguant, & Motilva, 2011).

Recovery index (DIX) (%) = (TPCd / TPCnd) x 100

TPCd = Concentration of total phenolic content of a family in the digest of each digestion phase

TPCnd = Concentration of total phenolic content of a family in sample before digestion

Bioaccessibility defined as the portion of phenolic compounds (PC) that is released from the food matrix into the gastrointestinal tract and thus become available for intestinal absorption was determined in the bioaccessible fraction (BF):

Bioaccessibility (%) = (PC_{BF} / PCnd) x 100

PC_{BF} = Concentration of a phenolic compound in the bioaccessible fraction

PCnd = Concentration of a phenolic compound in sample before digestion

2.5. Determination of phenolic compounds by HPLC-DAD-ESI-MS-QTOF

Untreated and HPP-treated apple powder samples before digestion (0.5 g) were extracted using a methanol/water solution (80:20, v/v) according to the procedure described by Fernández-Jalao et al. (2019). The results were expressed as µg per gram of dry basis (µg/g dry basis).

Aliquots (10 g) from different phases of GID were lyophilized and extracted with 10 mL of methanol/water (80:20, v/v) (1.5 mL for bioaccessible fraction). The mixtures were vigorously stirred in a vortex for 2 min and centrifuged at 8000 *g* at 4 °C for 15 min, using a refrigerated centrifuge. The supernatant was separated and stored at -20 °C until analysis. The results were expressed as µg per gram of dry basis (µg/g dry basis) referred to the product before digestion.

The separation, identification and quantification of phenolic compounds by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS-QTOF was carried out according to the methodology described by Fernández-Jalao et al. (2019).

2.6. Antioxidant capacity analysis

The antioxidant capacity of apple products at different stages of gastrointestinal digestion was determined in the hydro-methanolic phenolic extracts obtained for analysing phenolic compounds.

2.6.1. Antioxidant capacity by DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$, FRAP and TP-FC assays

Four different methods were employed according to Fernández-Jalao et al. (2017): 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH$^{\bullet}$) scavenging assay, 2,2´-azino-bis (3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation (ABTS$^{\bullet+}$) scavenging assay, ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay, and Folin-Ciocalteu method for total phenols (TP-FC). The results were expressed as µmol trolox equivalents per gram of dry basis (µmol TE/g dry basis) for FRAP, DPPH$^{\bullet}$ and ABTS$^{\bullet+}$ assays and mg of gallic acid equivalents per gram of dry basis (mg GAE/ g dry basis) for TP-FC. All samples were run in quadruplicate.

2.6.2. Effects on xanthine oxidase, lipoxygenase and catalase activity

Inhibition of xanthine oxidase (XO) activity. The XO activity with xanthine as the substrate was measured spectrophotometrically at 290 nm, based on the procedure described by Gawlik-Dziki (2014) with modifications. The reaction mixture consisted of 1.8 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), 0.1 mL of the tested sample (or buffer for the blank), 1.0 mL of 150 mM xanthine solution. After preincubation of the mixture at 25 ºC for 10 min, the reaction was initiated by adding 0.1 mL of xanthine oxidase solution (0.1

U/mL in 50 mM phosphate buffer). XO inhibitory activity was expressed as the percentage inhibition of XO by the test samples, calculated as:

$$\%\ \text{Inhibition enzyme activity} = 1 - \frac{\Delta A\ nm_{290}\ /\text{min test sample}}{\Delta A_{290}\ nm/\text{min blank}}\ X\ 100$$

Where ΔA_{290} /min test sample is the linear change in absorbance per minute of the test sample, and ΔA_{290}/min blank is the linear change in absorbance per minute of the blank. Inhibitory activity was expressed as IC_{50} defined as the amount of sample that caused 50 % of enzyme inhibition (mg of dry basis).

Inhibition of lipoxygenase (LOX) activity. LOX activity was determined spectrophotometrically at 25 ºC by measuring the absorbance at 234 nm according to the procedure previously described (Gawlik-Dziki, 2014) with some modifications. Briefly, the reaction mixture contained 1.4 mL of borate buffer 0.2 M (pH 9), 0.1 mL of enzyme solution (34160 U/ml) and 0.1 mL of the tested sample (or buffer for the blank). After preincubation at 30 ºC during 15 min, the reaction was initiated by adding 1.4 mL of a solution 0.5 mM of linoleic acid. One unit of LOX activity was defined as an increase in absorbance per minute at 234 nm. Inhibitory activity was expressed as IC_{50} defined as the amount of sample that caused 50 % of enzyme inhibition (mg of dry basis).

Influence on catalase (CAT) activity. The CAT activity was determined as described by Gawlik-Dziki (2012). Decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) at 25 °C was monitored by measuring absorbance at 240 nm. Reduction in absorbance is directly proportional to the enzyme activity. The reaction mixture consisted of 2.8 mL of 0.02 M H_2O_2 in 0.05 M phosphate buffer (pH 7), adjusted to obtain absorbance in the range 0.525–0.550 nm and 0.1 mL of the tested sample. After addition 0.1 mL of enzyme solution (100 U/mL) (or buffer for the blank), the absorbance was monitored at 240 nm in regular time intervals (30 s) during 5 min. The catalase activity was expressed as mmol of H_2O_2 consumed per min.

290 The residual catalase activity was expressed according to the following equation:

291 $$\%\text{Catalase activity} = \frac{\Delta A_{240}\ \text{nm/min test sample}}{\Delta A_{240}\ \text{nm/min blank}}\ \text{X } 100$$

292 ΔA_{240} nm test sample = Increased absorption per minute of the test sample (slope)

293 ΔA_{240} nm blank = Increased absorption per minute of the blank (slope)

294

295 The effect of test sample on the CAT activity was expressed as IC_{50} defined as the

296 amount of sample necessary to preserve 50% of catalase activity (mg of dry basis).

297 **2.7. Statistical analysis**

298 The results shown represent mean values ± standard deviation (SD). These results

299 were calculated from the means of 4 replicates obtained in at least two separate

300 experiments. Data were analysed using one-way (type of sample) ANOVA followed by the

301 Tamhane's T2 *post hoc* tests and Student's t-test were used to compare pairs of means and

302 determine statistical significance at the $p \leq 0.05$ level. The relationship within variables

303 were examined by Pearson's correlation coefficient (r). All analyses were performed by

304 using the IBM SPSS Statistics 25 Core System (SPSS Inc., an IBM Company, USA).

Table 1. Physicochemical, chemical and biochemical characteristics of untreated and HPP-treated 'Golden Delicious' apple products.

	Apple	
Parameters	**Untreated**	**HPP-treated**
pH	3.64 ± 0.05[a]	3.72 ± 0.03[a]
Acidity (g malic acid/100 g db)	0.75 ± 0.03[a]	0.64 ± 0.01[a]
Ascorbic acid (mg/100 g db)	17.12 ± 0.34[b]	13.53 ± 0.39[a]
Vitamin C (mg/100 g db)	48.76 ± 0.66[b]	46.70 ± 0.78[a]
Protein (g/100 g db)	1.65 ± 0.06[b]	0.24 ± 0.02[a]
Pectin		
Total pectin (mg/100 g db)	2.60 ± 0.48[a]	2.80 ± 0.30[b]
Esterification degree (DE) (%)	37.80 ± 5.90[a]	50.00 ± 3.30[b]
Fibre		
Soluble fibre (mg/100 g db)	3.14 ± 0.20[a]	3.91 ± 0.45[b]
Insoluble fibre (mg/100 g db)	11.29 ± 0.25[b]	10.88 ± 0.30[a]
Total fibre (mg/100 g db)	14.43 ± 0.35[a]	14.79 ± 0.24[a]
Sugars		
Sacarose (g/100 g db)	6.09 ± 0.58[a]	4.85 ± 0.77[a]
Glucose (g/100 g db)	10.17 ± 0.62[a]	9.67 ± 1.18[a]
Fructose (g/100 g db)	23.67 ± 1.88[a]	20.38 ± 2.33[a]
Organic acids		
Malic acid (g/100 g db)	2.13 ± 0.04[a]	1.84 ± 0.02[a]
Citric acid (mg/100 g db)	33.15 ± 2.25[a]	32.11 ± 2.51[a]
Fumaric acid (mg/100 g db)	9.45 ± 0.38[a]	9.05 ± 2.33[a]
Acetic acid (mg/100 g db)	2.32 ± 0.39[a]	2.01 ± 0.24[a]
Enzymatic activity		
PPO[1](ΔDO[3]/min/g db)	0.44 ± 0.02[a]	0.42 ± 0.11[a]
POD[2](ΔDO[3]/min/g db)	8.81 ± 0.39[b]	4.84 ± 0.84[a]

Values are mean ± standard deviation (n=4); db: dry basis. HPP: High-pressure processing at 400 MPa/35 ºC/5 min. Different small letter indicate significant differences (p<0.05) between apple products. [1]PPO (polyphenoloxidase), [2]POD (peroxidase), [3]ΔDO/min (optical density increment per minute).

3. Results and discussion

3.1. Effect of different phases of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion on individual apple phenolic compounds

Twenty-two compounds belonging to four different phenolic families (flavonols, hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols and dihydrochalcones) have been separated and

310 tentatively identified by HPLC-ESI-MS-QTOF from untreated and HPP-treated apple
311 products (Table 2).

312 In order to determine the influence of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion
313 (GID) on the stability and bioaccessibility of phenolic compounds from an apple product
314 treated by high-pressure processing (HPP), the concentration of flavonols,
315 hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols and dihydrochalcones was monitored after the
316 different phases, i.e. oral phase (OP), gastric digestion phase (GDP), intestinal digestion
317 phase (IDP) and bioaccessible fraction (BF). Similar study has been done with the
318 untreated apple product (Table 3).

Table 2. Identification of phenolic compounds in 'Golden Delicious' apple products by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS-QTOF analysis

Family	Compound name	Formula	RT (min)	λ_{max} (nm)	Accurate mass (g/mol)	Major ESI peak *m/z* $[M-H]^-$ and fragments
Flavonols	Q-3-rutinoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	18.13	260, 354, 356	610.15	**609.1460**; **463.1738**; 301.0356
	Q-3-galactoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	18.60	256, 354, 356	464.09	463.0907; **301.0268**; **151.0013**
	Q-3-glucoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	18.82	256, 354, 356	464.09	463.0908; **301.0351**; 151.0380
	Q-3-arabinoside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	19.65	256, 354, 356	434.08	**433.0796**; **301.0320**; 193.0724
	Q-3-xyloside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	20.23	256, 354, 356	434.08	**433.0799**; **301.0365**; 193.0721
	Q-3-rhamnoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	20.66	256, 348, 352	448.10	447.0963; **301.0279**; 273.0778; 151.0012
	Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	26.15	256, 370	302.04	301.0367; 205.0567; 284.8463; 193.0727; **151.0054**
Hydroxycinnamic acids	Neochlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	11.42	220, 300, 326	354.09	**353.0894**; **191.0535**; 173.0451; 161.0231; 135.0420
	Chlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	11.87	220, 300, 326	354.09	**353.0899**; **191.0567**; 173.0422; 161.0202; 135.0449
	Cryptochlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	12.76	220, 300, 326	354.09	**353.0896**; 191.0587
	Coumaroyl quinic acid	$C_{16}H_{18}O_8$	13.38	226, 310	338.10	**337.0946**; 173.0443; **163.0391**; 119.0475
	p-Coumaric acid	$C_9H_8O_3$	16.40	226, 310	164.05	163.04
Flavan-3-ols	Procyanidin B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	10.24	280	578.14	577.1364
	Catechin	$C_{15}H_{14}O_6$	11.34	280	290.08	289.0735; 270.8308; **245.0813**; 179.0248; 137.0291
	Procyanidin B2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	12.64	280	578.14	577.3602; **425.0867**; 289.0728;178.9776; 125.0226
	Epicatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	13.56	280	290.08	289.0743; **245.0728**; 179.0280; **137.0223**
	Trimer	$C_{45}H_{42}O_{18}$	14.50	280	866.78	865.2008; 753.2624;425.0989; 289.0743; 179.0580; 161.0471
	Tetramer	$C_{60}H_{50}O_{24}$	14.99	280	1154.04	**576.1290** $[M-2H]^{-2}/2$; 289.0954; 179.0888; 161.0453

	Dimer	$C_{30}H_{26}O_{12}$	17.80	280	578.14	577.1362; 559.2023; 425.0881; 293.0491; 179.0556; 161.0456
Dihydrochalcones	Phloretin-2'-xyloglucoside	$C_{26}H_{32}O_{14}$	19.08	228, 286	568.18	567.1725; **273.0778**; 167.0350; 131.0269; 125.0268
	Phloridzin	$C_{21}H_{24}O_{10}$	20.69	224, 284	436.14	435.1321; **273.0795**; 167.0381; 133.0596; 125.0200
	Phloretin	$C_{15}H_{14}O_5$	29.4	228, 286	274.08	273.0768

RT: retention time; Compounds identified in extracts obtained with methanol/water (80:20, v/v)

Table 3. Concentration of phenolic compounds (µg/g dry basis) in the different phases of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion of untreated apple and HPP-treated apple.

Compounds	**Treatments**	**Gastrointestinal Digestion Phases**				
		Non-digested	**Oral Phase (OP)**	**Gastric Digestion Phase (GDP)**	**Intestinal Digestion Phase (IDP)**	**Bioaccessible Fraction (BF)**
Flavonols						
Q-3-rutinoside	Untreated	6.45 ± 1.29^{aA}	6.02 ± 1.98^{aA}	5.12 ± 0.45^{aA}	BLQ	BLQ
	HPP-treated	7.04 ± 0.27^{cA}	4.69 ± 0.42^{bA}	5.82 ± 0.93^{bcA}	9.68 ± 0.70^{d}	1.58 ± 0.05^{a}
Q-3-galactoside	Untreated	62.42 ± 5.97^{cA}	54.98 ± 5.01^{cB}	51.85 ± 8.88^{cA}	41.37 ± 0.23^{bA}	9.49 ± 0.49^{aB}
	HPP-treated	84.15 ± 0.87^{cB}	40.89 ± 5.03^{bA}	38.18 ± 11.45^{bA}	45.05 ± 3.03^{bA}	7.58 ± 1.00^{aA}
Q-3-glucoside	Untreated	34.49 ± 1.43^{dA}	27.32 ± 2.89^{cB}	24.80 ± 3.52^{cA}	18.64 ± 0.36^{bA}	4.38 ± 0.39^{aA}
	HPP-treated	42.14 ± 0.66^{cB}	21.04 ± 1.73^{bA}	19.40 ± 6.11^{bA}	21.97 ± 1.33^{bB}	3.87 ± 0.31^{aA}
Q-3-Arabinoside	Untreated	26.49 ± 0.80^{dA}	22.12 ± 1.55^{cA}	23.18 ± 1.12^{cB}	15.56 ± 0.29^{bA}	1.83 ± 0.20^{aA}
	HPP-treated	34.38 ± 0.16^{cB}	19.99 ± 1.83^{bA}	15.60 ± 2.50^{bA}	19.11 ± 1.66^{bB}	1.77 ± 0.20^{aA}
Q-3-xyloside	Untreated	40.45 ± 1.47^{dA}	32.18 ± 0.40^{cA}	35.95 ± 2.91^{cdB}	19.66 ± 1.64^{bA}	4.41 ± 0.76^{aA}
	HPP-treated	53.35 ± 0.33^{eB}	31.07 ± 3.90^{dA}	16.54 ± 2.06^{bA}	22.97 ± 2.93^{cB}	4.22 ± 0.26^{aA}
Q-3-rhamnoside	Untreated	83.52 ± 2.31^{dA}	70.41 ± 0.14^{cA}	71.18 ± 0.64^{cB}	45.18 ± 1.76^{bA}	7.01 ± 0.72^{aA}

Quercetin	HPP-treated	110.89 ± 1.05^{cB}	66.08 ± 5.98^{bA}	53.39 ± 10.09^{bA}	56.86 ± 3.43^{bB}	6.67 ± 0.94^{aA}
	Untreated	7.03 ± 0.01^{cB}	5.19 ± 0.03^{bA}	7.67 ± 0.01^{dA}	21.86 ± 0.26^{eA}	3.08 ± 0.37^{aA}
	HPP-treated	6.72 ± 0.10^{bA}	5.96 ± 0.79^{bA}	11.95 ± 0.04^{cB}	23.56 ± 0.52^{dB}	3.38 ± 0.14^{aA}
Total	**Untreated**	**260.83 ± 12.48^{dA}**	**218.21 ± 11.06^{cB}**	**219.74 ± 16.62^{cB}**	**162.26 ± 3.71^{bA}**	**30.19 ± 2.89^{aA}**
	HPP-treated	**338.66 ± 3.25^{cB}**	**189.72 ± 17.30^{bA}**	**160.85 ± 33.09^{bA}**	**199.19 ± 11.56^{bB}**	**29.05 ± 2.21^{aA}**
Hydroxycinnamic acids						
Neochlorogenic acid	Untreated	33.68 ± 2.13^{cB}	27.73 ± 1.39^{bB}	19.00 ± 0.62^{a}	NF	NF
	HPP-treated	30.60 ± 0.45^{bA}	23.57 ± 1.74^{aA}	BLQ	NF	NF
Chlorogenic acid	Untreated	626.00 ± 6.76^{dB}	373.23 ± 30.14^{cA}	329.29 ± 19.82^{bA}	293.66 ± 27.03^{bA}	234.10 ± 20.93^{aA}
	HPP-treated	547.91 ± 7.92^{cA}	424.68 ± 9.44^{bB}	400.31 ± 28.16^{bB}	428.36 ± 30.47^{bB}	262.79 ± 25.01^{aA}
Cryptochlorogenic acid	Untreated	63.60 ± 0.84^{cB}	48.65 ± 0.34^{bB}	34.62 ± 5.88^{a}	BLQ	BLQ
	HPP-treated	57.10 ± 1.80^{bA}	34.16 ± 4.76^{aA}	BLQ	BLQ	BLQ
Coumaroyl quinic acid	Untreated	34.67 ± 0.60^{dB}	26.29 ± 0.14^{cB}	22.88 ± 2.90^{cB}	7.35 ± 1.54^{bA}	1.54 ± 0.14^{aB}
	HPP-treated	28.68 ± 0.28^{cA}	20.79 ± 3.24^{cA}	4.02 ± 0.40^{bA}	5.28 ± 0.53^{bA}	1.29 ± 0.03^{aA}
Total	**Untreated**	**757.94 ± 6.33^{dB}**	**475.90 ± 30.12^{cA}**	**405.79 ± 11.15^{bA}**	**301.01 ± 25.60^{aA}**	**235.64 ± 21.02^{aA}**
	HPP-treated	**664.29 ± 6.75^{dA}**	**503.19 ± 6.33^{cA}**	**404.32 ± 28.55^{bA}**	**433.65 ± 29.96^{bcB}**	**264.07 ± 25.04^{aA}**
Flavan-3-ols						
Procyanidin B1	Untreated	81.84 ± 6.71^{bA}	31.16 ± 4.95^{aA}	31.39 ± 1.92^{aA}	NF	NF
	HPP-treated	86.43 ± 2.31^{bA}	38.93 ± 2.51^{aB}	36.79 ± 4.89^{aA}	NF	NF
Catechin	Untreated	25.24 ± 1.20^{aA}	27.21 ± 7.91^{aA}	32.66 ± 3.29^{aB}	NF	NF
	HPP-treated	27.64 ± 0.53^{bB}	37.68 ± 1.93^{cB}	4.96 ± 5.72^{aA}	NF	NF
Procyanidin B2	Untreated	915.48 ± 3.84^{cA}	232.82 ± 5.16^{bA}	105.69 ± 11.11^{aB}	NF	NF
	HPP-treated	950.20 ± 7.38^{cB}	272.72 ± 27.90^{bB}	51.45 ± 4.12^{aA}	46.89 ± 1.82^{a}	NF
Epicatechin	Untreated	763.01 ± 18.43^{dB}	276.77 ± 24.36^{cA}	126.17 ± 9.40^{bA}	29.79 ± 5.04^{aA}	NF

Trimer	HPP-treated	730.83 ± 9.33^{dA}	389.00 ± 59.64^{cB}	126.11 ± 7.32^{bA}	48.37 ± 7.41^{aB}	NF
	Untreated	338.34 ± 12.71^{bA}	95.32 ± 5.14^{aA}	82.77 ± 27.54^{aA}	127.36 ± 44.68^{aA}	NF
Tetramer	HPP-treated	348.02 ± 2.75^{cA}	165.64 ± 6.49^{bB}	59.81 ± 6.89^{aA}	86.03 ± 18.86^{aA}	NF
	Untreated	277.64 ± 14.87^{bA}	52.32 ± 5.97^{aA}	47.52 ± 16.02^{aA}	BLQ	NF
Dimer	HPP-treated	294.60 ± 6.65^{eA}	130.18 ± 4.88^{dB}	50.84 ± 6.36^{bA}	74.32 ± 8.24^{c}	NF
	Untreated	56.19 ± 8.20^{bA}	46.00 ± 0.80^{bA}	27.25 ± 5.80^{aA}	NF	NF
Total	HPP-treated	92.73 ± 3.81^{bB}	58.03 ± 12.88^{aA}	41.31 ± 5.21^{aB}	NF	NF
	Untreated	**2457.75 ± 42.38^{dA}**	**761.60 ± 34.07^{cA}**	**453.45 ± 47.20^{bB}**	**157.15 ± 46.71^{aA}**	**NF**
	HPP-treated	**2530.45 ± 26.40^{eB}**	**1092.17 ± 90.28^{dB}**	**371.27 ± 23.79^{cA}**	**255.61 ± 20.32^{bB}**	**NF**
Dihydrochalcones						
Phloretin-2'-xyloglucoside	Untreated	39.51 ± 0.33^{dA}	20.84 ± 1.48^{cA}	14.10 ± 0.18^{bA}	3.87 ± 0.29^{aA}	NF
	HPP-treated	35.81 ± 0.81^{dA}	22.87 ± 2.64^{cA}	14.31 ± 2.15^{bA}	6.48 ± 1.15^{aB}	7.94 ± 0.30^{a}
Phloridzin	Untreated	112.34 ± 1.42^{cA}	75.57 ± 2.85^{bA}	71.44 ± 4.45^{bB}	225.35 ± 1.88^{dB}	29.59 ± 3.55^{aA}
	HPP-treated	113.58 ± 1.28^{dA}	75.13 ± 3.45^{cA}	53.67 ± 9.46^{bA}	129.51 ± 8.60^{eA}	36.37 ± 1.87^{aB}
Total	**Untreated**	**151.85 ± 1.73^{cA}**	**96.41 ± 4.30^{bA}**	**85.53 ± 4.30^{bB}**	**229.22 ± 1.59^{dB}**	**29.59 ± 3.55^{aA}**
	HPP-treated	**149.39 ± 2.00^{cA}**	**97.99 ± 2.24^{bA}**	**67.98 ± 11.60^{abA}**	**135.98 ± 7.92^{cA}**	**44.31 ± 1.90^{aB}**
Total phenolic compounds	**Untreated**	**3628.36 ± 36.41^{eA}**	**1552.11 ± 13.09^{dA}**	**1164.51 ± 39.74^{cB}**	**849.64 ± 24.67^{bA}**	**295.42 ± 30.56^{aA}**
	HPP-treated	**3682.79 ± 28.21^{dA}**	**1883.06 ± 76.25^{cB}**	**1004.42 ± 88.63^{bA}**	**1024.41 ± 35.74^{bB}**	**337.43 ± 20.74^{aA}**

Data are expressed as the mean (µg/g dry basis) ± SD (n=4); HPP: High-pressure processing at 400 MPa/35 ºC/5 min; NF: not found. BLQ: below limit of quantitation (below of limit of quantitation on HPLC-DAD but identified by HPLC-MS). Different small letter in a row for the same compound and treatment (untreated or HPP-treated) indicate significant differences (p<0.05) among the different phases of gastrointestinal digestion (ANOVA and posterior Tamhane´s T2 *hoc* test were applied). Different capital letters in a column for the same compound and digestion phase indicate significant differences (p<0.05) among treatments (untreated and HPP-treated) (Student´s test).

3.1.1. Flavonols

The main flavonols identified in both untreated apple and HPP-treated apple are shown in Table 2. This flavonols profile was in accordance with that described for 'Golden Delicious' apples (Ribas-Agusti, Martin-Belloso, Soliva-Fortuny, & Elez-Martinez, 2018), being the majority quercetin-3-*O*-rhamnoside (Q-3-rhamnoside) and quercetin-3-*O*-galactoside (Q-3-galactoside) that represent 32% and 24% of the total flavonols, respectively (Table 3). HPP (400 MPa/35 ºC/5 min) increased significantly (p<0.05) between 20-30% the amount of individual and total flavonols extracted in comparison with the untreated apple (Table 2). HPP could have caused the disruption of cell wall favouring the release of phenolic compounds, as the increase of total pectin and esterification degree could indicate (Table 1) (Xu et al., 2016). Similar HPP treatment (400 MPa/25 ºC/5 min) also increased the total flavonol content (10.7%) in onion (Fernández-Jalao et al., 2017).

In general, the release of individual and total flavonols in comparison with their concentration in the apple product prior to digestion, decreased stepwise from oral phase (OP) to intestinal digestion phase (IDP) in both apple products (untreated and HPP-treated) (Table 3). The flavonol content in OP of the HPP-treated apple decreased between 51.4% (Q-3-galactoside) and 33.4% (Q-3-rutinoside) compared to non-digested apple (Table 3). However, the decrease of flavonols in the OP of untreated apple was lower than in HPP-treated apple, ranged between 43% (Q-3-glucoside) and 7% (Q-3-rutinoside) compared to apple prior digestion. This different behaviour found between both products could be related with the increase of soluble fiber observed in the HPP-treated apple (Table 1) caused by the treatment that could hinder the release of quercetin glycosides in the OP. The importance of salivary digestion for determining the bioaccessibility of phenolic compounds has been highlighted (Tenore, Campiglia, Ritieni, & Novellino, 2013). In general, polyphenols rich in hydroxyl groups could bind with protein such as albumins

from saliva, resulting in complexes that reduce phenolic compounds release in the OP (Bohn, 2014).

The concentration of individual and total flavonols in the gastric digestion phase (GDP) was similar (p<0.05) to those found in the OP of both, untreated apple and HPP-treated apple (Table 3). In general, most of apple quercetin glycosides were resistant to the acid hydrolysis occur in the GDP and reached the small intestine intact (Bouayed et al., 2012; Correa-Betanzo et al., 2014). However, an increase of 1.5 and 2-times of quercetin aglycone concentration compared to OP has been observed in both apple products (untreated and HPP-treated), respectively, suggesting that in acid conditions of the GDP, hydrolysis of glycosidic bonds occurs. It is remarkable that the OP of HPP-treated apple presented 1.5 times higher quercetin content than in OP of untreated apple suggesting that HPP could promote the cleavage of Q-glycosides and/or the release of these compounds from the matrix in this phase. Similar result was found for untreated onion and HPP-treated onion (400 MPa/25 ºC/5 min) also subjected to a dynamic GID where the Q content in the GDP was 1.8 and 2.2 times higher, respectively than in the OP (Fernández-Jalao et al., 2017).

The transition from acidic gastric to the mild alkaline intestinal digestion phase (IDP) conditions decreased significantly (p<0.05) ~ 40% the amount of total flavonols compared to the non-digested samples (untreated and HPP-treated). Thus, the content of the main flavonols in the IDP of HPP-treated apple, Q-3-galactoside and Q-3-rhamnoside decreased 55.5% and 51%, respectively, compared to apple prior digestion (Table 3). This result agrees with the deglycosylation of Q-glycosides during the intestinal digestion phase (IDP) detected in studies *in vivo* but also *in vitro* (Wang et al., 2016). In fact, the concentration of Q found in the IDP of both products (untreated and HPP-treated) was 2.8 and 2 times higher than in the GDP, respectively. Previous *in vitro* gastrointestinal digestion studies

with apple products did not detect Q-aglycone neither in the gastric nor in the intestinal phase perhaps due to these studies were carried out with a static GID model (Bouayed et al., 2012) meanwhile in the present study has been employed a dynamic GID model that better simulated the physiological and biochemical conditions of a gastrointestinal digestion (Thuenemann, 2015).

The majority of the Q-glycosides found in the IDP were also detected in the bioaccessible fraction (BF) albeit at lower concentrations. This drastic reduction of flavonols at the end of the digestion compared to non-digested samples has been observed after the GID of different fruits (Lucas-González et al., 2016). The bioaccessibility (%) of Q-3-galactoside, Q-3-glucoside, Q-3-arabinoside, Q-3-xyloside and Q-3-rhamnoside was higher in the BF of the untreated-apple (15%, 13%, 7%, 11% and 8%, respectively) than the HPP-treated apple (9%, 9%, 5%, 8% and 6% respectively). Q-aglycone presented higher bioaccessibility than its glycosides, 50% in HPP-treated apple and 44% in the untreated apple. The bioaccessibility of apple Q-glycosides determined in the current study using a dynamic GID model was significantly lower than those found by Bouayed et al. (2012) with a static GID model (i.e, 46% for Q-3-galactoside, 62% for Q-3-rhamnoside and 110% for Q-3-glucoside). These differences could be due to the different GID model employed and procedure to obtain the bioaccessible fractions. Other important dietary source of quercetin derivatives as onion showed higher bioaccesibility for Q-glucosides than HPP-treated apples (average 51%) determined by using the same dynamic GID system (Fernández-Jalao et al., 2017). The different bioaccessibilities for Q-glycosides found in onion and apple could be explained by the different matrix composition (potential interaction with pectins and fiber in apple products) that could be the cause of the different rheological behaviour observed during the GID of these two products (Herranz et al., 2019).

3.1.2. Hydroxycinnamic acids

Hydroxycinnamic acids (HA) are the second most abundant family of phenolic compounds of the apple products studied since it represents 21% of the total phenolic compounds. Chlorogenic acid (CGA) was the major HA representing about 83% of total HA in both, untreated apple and HPP-treated apple. The decrease of total HA (13%) in the HPP-treated apple in comparison with untreated apple could be due to the remaining activity of polyphenoloxidase (PPO) (Table 1).

The concentration of individual and total HA decreased (p<0.05) stepwise from oral phase (OP) to intestinal digestion phase (IDP) in both apple products (untreated and HPP-treated) (Table 3). The content of CGA in the OP was significantly reduced (40% and 23%) compared to the non-digested apple products (untreated and HPP-treated). Similar behaviour was observed for minor HA such as neochlorogenic, cryptochlorogenic and coumaroyl quinic acids in both apple products. In other products rich in HA such as artichoke (D'Antuono, Garbetta, Linsalata, Minervini, & Cardinali, 2015), the recovery index of CGA (35%) in the OP employing a static GID model was significantly lower than in the present study (60%), perhaps due to differences in the food matrix composition and/or in the type of GID model employed.

The transition from the OP to gastric digestion phase (GDP) practically did not affect the CGA content compared to the OP in both apple products (untreated and HPP-treated) but the other HA were almost completely degraded (Table 3). The stability of CGA under GDP conditions has been evidenced by other authors (D'Antuono et al., 2015).

Also, the transition from the gastric to the alkaline intestinal environment did not affect the CGA in both apple (untreated and HPP-treated) compared to GDP (Table 3). This result agrees with those obtained during the simulated GID of chokeberry juice

418 (Bermúdez-Soto, Tomas-Barberan, & Garcia-Conesa, 2007). Other authors observed a
419 significant increase of CGA acid in the IDP compare to GDP assuming that the alkaline
420 conditions of IDP favoured its extraction (D'Antuono et al., 2015; Barba et al., 2017).

421 The bioaccessible fraction (BF) showed a significant decrease of 20% and 39% of
422 CGA concentration in the untreated and HPP-treated apple, respectively, compared to the
423 IDP (Table 3). According to these results, the bioaccessibility of CGA in HPP-treated
424 apple (48%) was higher than in the untreated apple (37%). This high CGA bioaccessibility
425 was also observed in other plant foods such as artichoke heads (D'Antuono et al., 2015). A
426 drastic decrease of ~77% of coumaroyl quinic acid in the BF in both apple products was
427 observed resulting in a low bioaccessibility (~4.5%).

428 **3.1.3. Flavan-3-ols**

429 Flavan-3-ols (F3O) were present in monomeric (catechin and epicatechin) and
430 oligomeric forms (proanthocyanidins). F3O was the major family of phenolic compounds
431 representing a 67% and 72% of the total phenolic compounds of untreated apple and HPP-
432 treated apple, respectively (Table 3).

433 HPP significantly increased the concentration of catechin, procyanidin-B2 and the
434 dimer form (9.5%, 4% and 65%, respectively), meanwhile the content of procyanidin-B1,
435 trimer and tetramer were maintained (p<0.05) (Table 3). Only epicatechin concentration
436 decreased 4% (p<0.05) after HPP. In consequence, HPP significantly (p<0.05) increased,
437 approximately 3%, the total F3O content extracted in apple (Table 3).

438 All the F3O identified in the initial apple products (untreated and HPP-treated) were
439 also found in the oral phase (OP) but in significant (p<0.05) lower concentrations. The
440 decrease of the concentration of procyanidin-B2, epicatechin, trimer and tetramer was
441 lesser in the HPP-treated apple (71%, 47%, 52% and 56%, respectively) than in the

442 untreated apple (75%, 94%, 72% and 81%, respectively) compared to the apple products
443 prior to digestion. These results agree with those previously observed in other apple
444 products submitted to simulated oral phase digestion conditions (Tenore et al., 2013).

445 The strong acidic conditions of gastric digestion phase (GDP) produced a significant
446 decrease (p<0.05) of the concentration of main F3O (procyanidin-B2 and epicatechin)
447 respect to OP that was higher in the HPP-treated apple (81% and 67%, respectively) than
448 in the untreated apple (55% and 67%, respectively) (Table 3). Some authors have pointed
449 out the instability of procyanidins during the gastric digestion where are degraded to
450 epicatechin (Zhu et al., 2002).

451 The intestinal digestion phase (IDP) produced a significant (p<0.05) reduction of the
452 F3O in comparison with GDP (Table 3). Epicatechin concentration diminished 76% and
453 66% in the IDP of untreated apple and HPP-treated apple, respectively, compared to GDP.
454 Procyanidin-B2 was not found in the IDP of untreated apple but similar concentration than
455 in GDP of HPP-treated apple (Table 3). This drastic reduction of F3O could be related to
456 the behaviour of phenolic compounds under alkaline conditions that could experiment
457 reactions of auto-oxidation, polymerization, transformation or complexes formation with
458 proteins, fibre and/or metal ions (Bouayed et al., 2012; Zhu et al., 2002).

459 **3.1.4. Dihydrochalcones**

460 Dihydrochalcones group is one of the most specific compounds of apples and
461 represented about 4% of the total phenolic compounds of the apple products (untreated and
462 HPP-treated). Two phloretin derivatives were identified and quantified, phloretin-2'-
463 xyloglucoside and phloretin-hexoside (phloridzin), the latter being the majority since it
464 represents the 74% of the total dihydrochalcones. This data was in agreement to the results
465 obtained from different apple cultivars previously published (Jakobek et al., 2013). HPP

did not significantly (p<0.05) affect phloridzin but slightly decreased (9%) the content of phloretin-2'-xyloglucoside. Similar results were previously reported for apple juice treated by ultra-high-pressure homogenization (100-300 MPa at 4 ºC and 20 ºC) (Suarez-Jacobo et al., 2011).

All the dihydrochalcones identified in the initial apple products (untreated and HPP-treated) were also found in the oral phase (OP). Phloretin-2'-xyloglucoside and phloridzin content decreased ~58% and 66%, respectively, in the OP of HPP-treated apple. Other authors have observed higher decrease for phloridzin (90%) in the OP of an *in vitro* static GID of 'Golden Delicious' apple (Tenore et al., 2013).

The GDP decreased (~37%) the phloretin-2'-xyloglucoside in both apple products (untreated and HPP-treated) compared to OP. However, phloridzin showed similar concentration than in OP of untreated apple and a decrease of 28% in HPP-treated apple compared to OP. The stability of phloridzin after the acidic conditions of GDP has been previously reported. The results of the current study did not agree with other studies that employed a static model for simulate GID where an increase of 6% and 11.5% of phloridzin concentration in GDP compared to OP has been evidenced (Bouayed et al., 2012; Tenore et al., 2013).

The transition from acidic to alkaline conditions in the IDP decreased 72% and 55% the phloretin-2'-xyloglucoside content in the untreated apple and HPP-treated apple, respectively, compared to GDP. However, the concentration of phloridzin in both products (untreated and HPP-treated) increased 3 and 2.5 times, respectively, compared to GDP. Similar results were referenced by other authors that found a phloridzin increase of 65% (Bouayed et al., 2012) and 43% (Tenore et al., 2013) in the IDP of 'Golden Delicious' apples. The exposure to phenolic compounds to the mild alkaline found in the IDP could

promote several changes in the structure and chemical properties of determined apple phenolic compounds that would allow them to transform into chalcones (Quan et al., 2018).

The dihydrochalcones identified in the IDP were also detected in the bioaccessible fraction (BF) but at a significant lower concentration (~ 80%) than in the IDP (Table 3). Thus, the bioaccessibility of phloridzin was 32% in HPP-apple and 26% in the untreated apple. Greater phloridzin bioaccessibiltiy (96%) were reported by Bouayed et al. (2012) in 'Golden Delicious' apple submitted to a static GID model.

3.1.5. Recovery index (RIX) and bioaccessibility of total flavonols, total hydroxycinnamic acids, total flavan-3-ols and total dihydrochalcones

In general, the more abundant family of phenolic compounds in the different phases of a dynamic GID model (OP, GDP and IDP) were flavan-3-ols (F3O) followed by hydroxycinnamic acids, flavonols and dihydrochalcones (Table 3). However, in the bioaccessible fraction (untreated and HPP-treated), the main phenolic compounds were hydroxycinnamic acids (235 and 264 µg/g dry basis) and flavonols (30.19 and 29.05 µg/g dry basis) (Table 3).

In general, the recovery index (RIX) of total flavonols and total flavan-3-ols were higher in the GID phases of untreated apple than in the HPP-treated apple (Table 4). Contrary to this result, total hydroxycinnamic acids in HPP-treated apple product showed higher RIX that untreated apple (Table 4). For total dihydrochalcones, the recovery index of OP and GDP was similar for both products (untreated and HPP-treated). It is remarkable the high RIX for dihydrochalcones in the IDP that could be related with the increased content of these compounds in this phase.

Table 4. Recovery index (%) and bioaccessibility (%) of phenolic compounds of apple products (untreated and HPP-treated) submitted to an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion.

		Untreated		HPP-treated	
		RIX	**Bioaccessibility**	**RIX**	**Bioaccessibility**
Flavonols					
	OP	83.65 ± 0.34^{bB}		55.98 ± 0.34^{aB}	
	GDP	84.14 ± 3.32^{bB}		47.41 ± 13.2^{aA}	
	IDP	62.21 ± 2.20^{aA}		58.79 ± 4.63^{aB}	
	BF		11.58 ± 1.11^{b}		8.58 ± 0.56^{a}
Hydroxycinnamic acids					
	OP	62.76 ± 4.88^{aC}		75.75 ± 0.26^{bB}	
	GDP	53.54 ± 1.45^{aB}		60.83 ± 5.20^{bA}	
	IDP	39.69 ± 4.31^{aA}		65.24 ± 5.44^{bA}	
	BF		31.10 ± 3.03^{a}		39.78 ± 4.16^{b}
Flavan-3-ols					
	OP	30.97 ± 1.20^{aC}		43.13 ± 4.41^{bC}	
	GDP	18.42 ± 2.27^{bB}		14.66 ± 1.11^{aB}	
	IDP	10.39 ± 0.91^{aA}		10.09 ± 0.99^{aA}	
	BF		NF		NF
Dihydrochalcones					
	OP	63.47 ± 2.98^{aA}		65.58 ± 0.88^{aB}	
	GDP	56.24 ± 9.90^{aA}		45.41 ± 10.1^{aA}	
	IDP	150.94 ± 1.57^{bB}		90.97 ± 5.77^{aC}	
	BF		19.49 ± 2.34^{a}		29.66 ± 1.27^{b}
Total Phenolic Compounds			9.44 ± 0.87^{a}		10.87 ± 0.61^{b}

OP = Oral phase; GDP= Gastric digestion phase; IDP= Intestinal digestion phase; BF= Bioaccessible fraction, RIX=Recovery index; Data are expressed as the mean (%) ± SD (n=4); HPP: High-pressure processing at 400 MPa/35 ºC/5 min. Different small letters in a row for the same compound indicate significant differences (p<0.05) among treatments (untreated and HPP-treated) (Student´s test).

Regarding bioaccessibility (untreated and HPP-treated), total hydroxycinnamic acids presented the higher bioaccessibility (31.10–-39.78%) followed by dihydrochalcones (19-49-29.66%), flavonols (11.58-8.58%) and total phenolic compounds (9.44-10.87%). It is remarkable that HPP-treated apple products presented higher bioaccessibility than the

517 untreated apple for total hydroxycinnamic acids, total dihydrochalcones and total phenolic
518 compounds (Table 4).

519 ### 3.2. Antioxidant capacity

520 Phenolic compounds are antioxidants present in plant derived foods able to neutralize
521 the excess of reactive oxygen and/or nitrogen species produced as consequence of an
522 unbalance with the antioxidant defences, although the exact mechanisms of action of
523 polyphenols in the human body have not been decisively proven, but there is strong
524 evidence that some targets such as nitric oxide metabolism and oxidative enzymes could be
525 related with the health benefits of these compounds (Williamson, 2017).

526 #### 3.2.1. Antioxidant capacity determined by DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$, FRAP and TP-FC
527 assays

528 The changes of antioxidant capacity measured by DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$, FRAP and TP-FC
529 during the *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion (GID) were evaluated (Fig. 1).
530 Before digestion, apples treated by HPP (400 MPa/35 ºC/5 min) showed a decrease
531 (p<0.05) of the antioxidant capacity (AC) determined by DPPH$^{\bullet}$ (16%), ABTS$^{\bullet+}$ (25%)
532 and FRAP (35%) methodologies as well as Folin-Ciocalteu method for total phenolic
533 compounds (TP-FC) (14%) compared to untreated apple (Fig. 1).

534 In general, GID caused a progressive decrease of AC (by the four methodologies)
535 from the oral phase to the bioccessible fraction that coincides with the decreasing of the
536 concentration of total phenolic compounds in the different GID phases (Table 3). In
537 general, the AC values were better preserved in the HPP-treated apple than in untreated
538 apple during GID. Thus, in the gastric digestion phase, the HPP-treated apple retained
539 better the AC values (~52% in DPPH$^{\bullet}$ and ABTS$^{\bullet+}$ assays and ~82% determined by FRAP

and TP-FC assays) than the untreated apple (~ 39% in DPPH$^{\bullet}$ and ABTS$^{\bullet+}$ assays and ~58% by FRAP and TP-FC assays) compared to apples prior digestion. It is remarkable the significant (p<0.05) increase of 2.3 and 1.6 times in the reducing capacity values determined by TP-FC and FRAP, respectively, in the IDP of HPP-treated apple in comparison to GDP (Fig. 1). These increases of AC values could be related with the increase of total dihydrochalcones concentration observed in the GDP (Table 3).

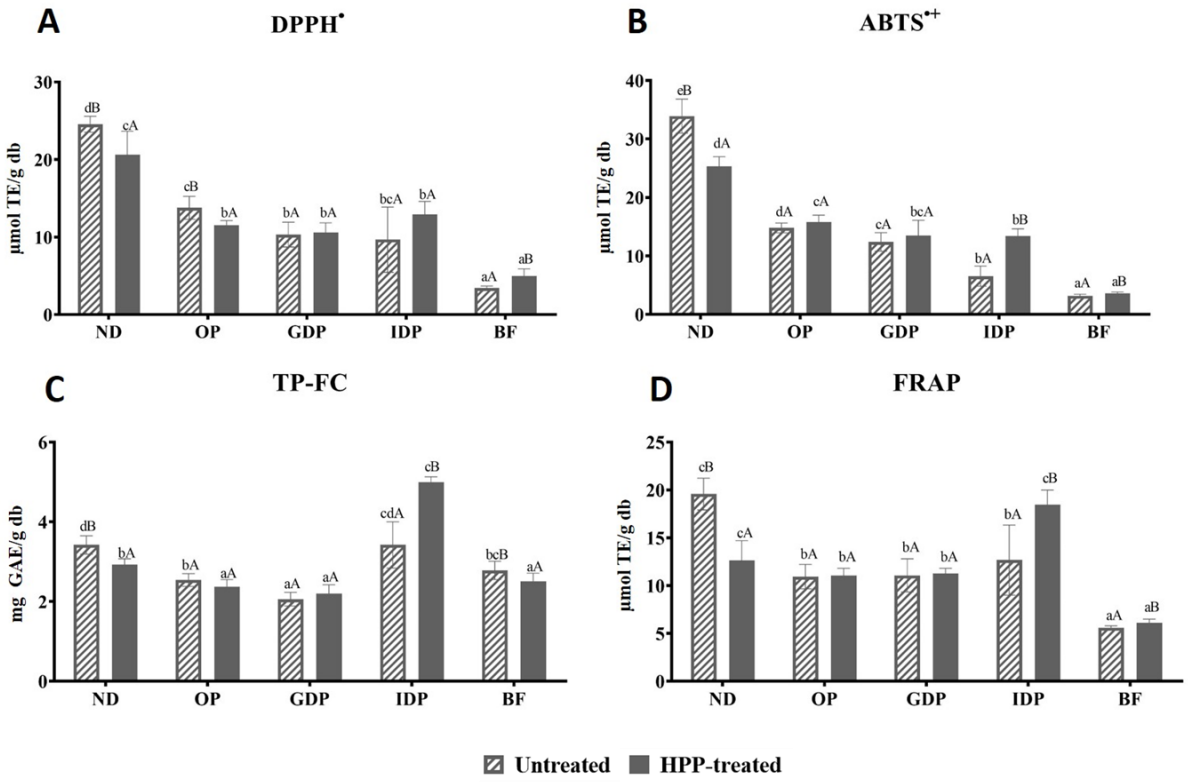


Figure 1. Antioxidant capacity determinations by DPPH$^{\bullet}$ (A), ABTS$^{\bullet+}$ (B), TP-FC (C), FRAP (D). HPP: High-pressure processing at 400 MPa/35 ºC/5 min; DPPH$^{\bullet}$, Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; ABTS$^{\bullet+}$, 2,2´-Azino-bis(3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation; TP-FC: total phenolic content determined by Folin-Ciocalteu method; FRAP, Ferric reducing antioxidant power; GAE, gallic acid equivalents; TE, trolox equivalents; db, dry basis. Different small letter in a row for the same compound and treatment (untreated or HPP-treated) indicate significant differences (p < 0.05) among the different phases of gastrointestinal digestion (ANOVA and posterior Tamhane´s T2 post hoc test were applied). Different capital letters in a column for the same compound and digestion phase indicate significant differences (p < 0.05) among treatments (untreated and HPP-treated) (Student´s test).

The bioaccessible fraction (BF) showed lowest AC values of the digestion phases (Fig. 1) in consonance with its lowest total phenolic content (Table 3). Also, the bioaccessible

548 fraction (BF) of HPP-treated apple showed better retention of the AA values (14% in
549 $ABTS^{\bullet+}$, 24% in $DPPH^{\bullet}$, 48% in FRAP and 86% in TP-FC) than the untreated apple
550 (9.4% in $ABTS^{\bullet+}$, 14% in $DPPH^{\bullet}$, 28% in FRAP and 81% in TP-FC) (Fig. 1) compared to
551 non-digested products. As the main phenolic compounds in the bioaccesible fraction were
552 hydroxycinnamic acids (mainly chlorogenic acid) and flavonols (mainly Q-glycosides)
553 (Table 3) these compounds could be the responsible of the AC of the BF instead of
554 procyanidins and epicatechin (missing in the BF) as some authors suggested in non-
555 digested apple products (Lee, Kim, Kim, Lee, & Lee, 2003). These results agree with
556 previous studies that showed large decreased of AC after GID in fruit juices (Bermúdez-
557 Soto et al., 2007) and in maqui fruit (Lucas-González et al., 2016), but they do not agree
558 with the results of Wootton-Beard et al. (2011) that indicated a relatively stability
559 vegetable juice antioxidant capacity during GID, and with the results of Gawlic-Dziki
560 (2012) that found an increase of AC after a GID of different vegetables. The data of
561 antioxidant capacity (AC) (Fig. 1) and the results of total phenolic compounds as the sum
562 of individual phenolic groups determined by HPLC (Table 3) have been analysed using the
563 Pearson correlation coefficient (Table 5). This analysis showed a significant positive
564 correlation between total phenolic compounds determined by HPLC (TP-HPLC) and
565 $DPPH^{\bullet}$ ($R=0.893$, $p<0.01$), $ABTS^{\bullet+}$($R=0.931$, $p<0.01$) and FRAP ($R=0.542$, $p<0.01$) in
566 HPP-treated apple (Table 5). For untreated apple, the correlation between TP-HPLC and
567 AA ($DPPH^{\bullet}$, $ABTS^{\bullet+}$ and FRAP) were positive and similar ($R=0.954$, $R= 0.974$ and
568 $R=0.872$, $p<0.01$) than in HPP-treated apple (Table 5).

Table 5. Pearson´s Correlation Coefficients (R) analysis among total phenols determined by HPLC (TP-HPLC) and antioxidant capacity (TP-FC, DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$ and FRAP) for different *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion phases of untreated and HPP-treated apple products

	TP-FC	DPPH$^{\bullet}$	ABTS$^{\bullet+}$	FRAP
Untreated				
TP-HPLC	0.376*	0.954**	0.974**	0.872**
TP-FC	1	0.439**	0.309	0.579**
DPPH$^{\bullet}$	0.439**	1	0.947**	0.923**
ABTS$^{\bullet+}$	0.309	0.947**	1	0.842**
FRAP	0.579**	0.923**	0.842**	1
HPP-treated				
TP-HPLC	-0.035	0.893**	0.931**	0.542**
TP-FC	1	0.243	0.082	0.710**
DPPH$^{\bullet}$	0.243	1	0.938**	0.766**
ABTS$^{\bullet+}$	0.082	0.938**	1	0.678**
FRAP	0.710**	0.766**	0.678**	1

** *p* value for Pearson´s correlation coefficient ≤ 0.01; * *p* value for Pearson´s correlation coefficient ≤ 0.05; TP-HPLC: total phenolic content determined by HPLC; TP-FC: total phenolic content determined by Folin-Ciocalteu method; DPPH$^{\bullet}$: Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical; ABTS$^{\bullet+}$**:** 2,2´-Azino-bis (3-ethylbezothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation; FRAP: Ferric reducing antioxidant power.

3.3.2. Effect on xanthine oxidase, lipoxygenase and catalase activity

Antioxidant enzymes such as catalase (CAT), which converts the cytotoxic H_2O_2 into molecular oxygen and water, are involved in the cell defence mechanisms of the organisms against oxidative damage. Other enzymes such as lipoxygenase (LOX) and xanthine oxidase (XO) catalyse reactions that generate free radicals and reactive oxygen species that contribute to oxidative damage that might play a role in the inflammation, ageing process and development of tumours (Gawlik-Dziki, 2014). In the present study, the effect of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion (GID) on the capacity of the apple powders (untreated and HPP-treated) to inhibit, activate or protect the activity of these enzymes has been evaluated and the results showed in Figure 2.

The effect of the GID of apple products on the xanthine oxidase (XO) activity was showed in Figure 2A. Between the non-digested products, the HPP-treated apple presented

lower (12%) XO inhibitory capacity than untreated apple. In comparison to non-digested samples (untreated and HPP-treated), the digested products in the OP, GDP and BF decreased significantly their capacity for inhibiting XO activity (Fig. 2A). These results coincided with the decrease of the concentration of total phenolic compounds determined by HPLC (flavonols, flavan-3-ols, hydroxycinnamic acids and dihydrochalcones) that also occurred in these GID phases (Table 3). Only the digests of the intestinal digestion phase showed higher XO inhibitory capacity than non-digested apples that agree with the high recovery index of total dihydrochalcones (mainly phloridzin) (150.94% and 90.97%) observed in this phase (Table 4). The BF presented the lowest XO inhibitory capacity of all the GID phases which coincides with the lowest total phenolic content (Table 3). The BF retained the 83% (untreated) and the 68% (HPP-treated) of the XO inhibitory capacity of the non-digested apple. These results do not agree with others that observed that plant products rich in quercetin glycosides as onion presented significant XO inhibitory activity (Nile, Nile, Keum, &Sharma, 2017).

In contrast, the gastrointestinal digestion phases (OP, GDP and IDP) presented higher lipoxygenase (LOX) inhibitory activity than the non-digested apples (Fig. 2B). These results agree with other studies where GID of different vegetables and spices increased the extraction of potentially bioaccessible phenolic compounds with higher XO and LOX inhibitory capacities than the samples prior to digestion (Gawlik-Dziki, 2012, 2014). However, the BF of untreated apple presented the lowest LOX inhibitory capacity of all the GID phases although the HPP-treated apple BF maintained that found in the non-digested apple (Table 3).

The capacity to preserve the CAT activity by the samples studied was showed in Figure 2C. In the non-digested products, HPP-treated apple presented better activity for preserving CAT activity than untreated apple. However, the GID phases (OP and GDP)

606 had lower CAT preserving activity than the samples prior digestion that agree with lower
607 phenolic compounds content in this GID phases compared to non-digested samples.
608 However, the IDP showed better CAT preserving activity than the samples prior digestion
609 (Fig. 2C) that indicate the release of CAT activators compounds able to pass to the
610 bioccessible fraction. In general, HPP treatment did not modify the effect of untreated
611 apple on the XO, LOX and CAT activity.

612 In summary, the stability of phenolic compounds (flavonols, hydroxycinnamic acids,
613 flavan-3-ols and dihydrochalcones) is profoundly affected during GID due to their
614 concentration decreased stepwise from oral phase (OP) to bioaccessible fraction (BF) in
615 both apple products (untreated and HPP-treated) although flavan-3-ols was the most
616 affected. This destruction of apple phenolic compounds during the different GID phases
617 was also reflected in the loss of antioxidant properties such as the capacity of quenching
618 free radicals ($DPPH^{\bullet}$ and $ABTS^{\bullet+}$), the reducing capacity (FRAP and TP-FC) and the
619 capacity for inhibiting lipoxygenase (LOX) and xanthine oxidase (XO) activities.
620 However, the capacity for protecting catalase (CAT) activity increased during the gastric
621 and intestinal digestion phases. The dynamic GID model conditions increased the release
622 of quercetin aglycone and led to low total quercetin-glycosides bioaccessibility (~10%).
623 The influence of high-pressure processing could be reflected in the fact that HPP-treated
624 apple compared to untreated apple presented higher recovery index for hydroxycinnamic
625 acids (from ~52% to 67%) and higher bioaccessibility for hydroxycinnamic acids (from
626 31% to 40%), dihydrochalcones (from 19.5% to 30%) and total phenolic compounds (TP-
627 HPLC) (from 9% to 11%). Also, antioxidant capacity (AC) values were better preserved in
628 the HPP-treated apple during digestion phases. In contrast, the positive effect of HPP
629 increasing the extraction of flavonols (30%) was not reflected during GID due to lower
630 bioccessibility observed in HPP-treated (8.38%) compared to untreated apple (11.58%).

631 However, the bioaccessible fraction of HPP-treated apple retained the 86% (TP-FC) and
632 48% (FRAP) of the reducing capacity, 24% ($DPPH^{\bullet}$) and 14% ($ABTS^{\bullet+}$) of the radical
633 quenching capacity, 68% and 100% of the XO and LOX inhibitory capacity and increased
634 9 times the CAT preserving activity of the non-digested apple.

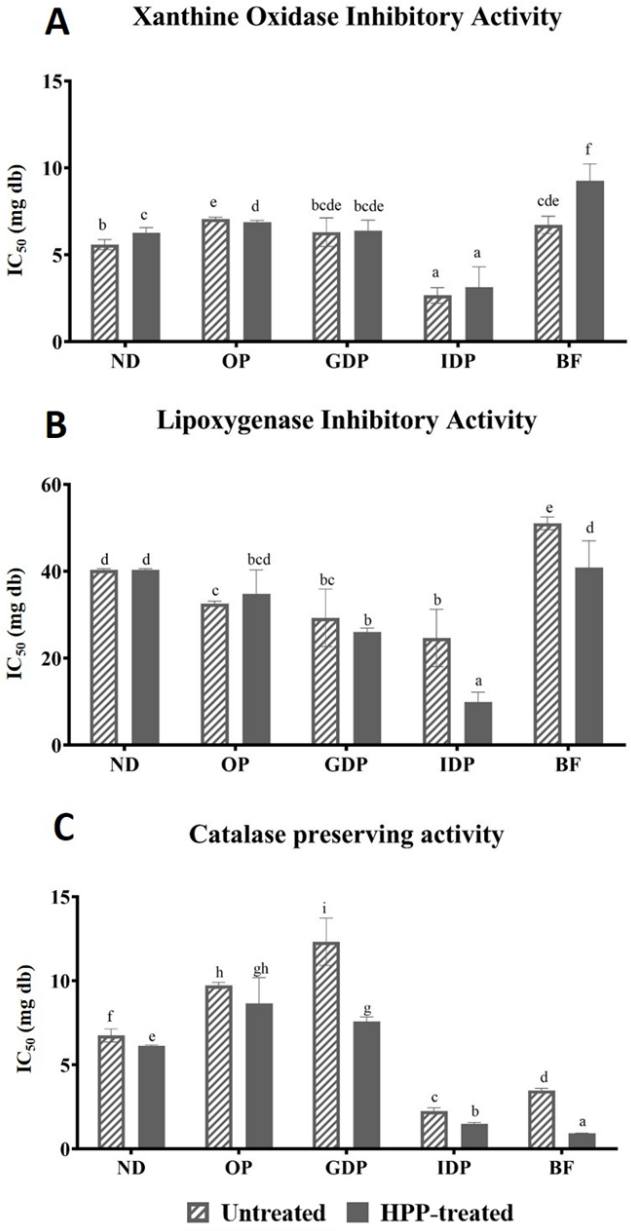


Figure 2. Xanthine oxidase inhibitory activity (A); Lipoxygenase inhibitory activity (B) and Catalase preserving activity (C). IC_{50} in (A) and (B) means the amount of apple products (untreated and HPP-treated) that caused 50% of inhibition of XO and LOX. IC_{50} in (C) means the amount of apple products (untreated and HPP-treated) necessary to preserve 50% of CAT activity. The same letters represent statistically not significant differences ($p < 0.05$).

4. Conclusions

The GID dynamic model conditions significantly reduced the concentration of phenolic compounds and the antioxidant capacity of apple products (untreated and HPP-treated) stepwise from oral phase (OP) to bioaccessible fraction (BF) leading to very low bioaccessibility for phenolic compounds that was very dependent on their chemical structure (flavonols, hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols and dihydrochalcones). The fact that certain HPP-treatment increased the extraction of phenolic compounds in the apple product before GID no always means the increase of their bioaccessibility. Thus, the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity at the bioaccesible fraction of HPP-apple products is very dependent on different combined effects such as the food matrix and the HPP conditions. The dynamic GID model has been revealed as an useful technology for obtaining reliable and repetitive data under controlled conditions to know the bioaccessibility of phenolic compounds and the remaining antioxidant capacity of fruits and fruit derived products after a gastrointestinal digestion. It is necessary to identify the specific HPP processing conditions for each type of apple (variety, degree of maturity, geographical origin, etc.), in order to increase the stability and bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of the fruit product during the gastrointestinal digestion.

Acknowledgements

This study has been funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) by the projects AGL2013-46326-R and AGL2016-76817-R.

References

Alegría, A., Garcia-Llatas, G., & Cilla, A. (2015). Static Digestion Models: General Introduction. In: Verhoeckx K. et al. (eds) The Impact of Food Bioactives on Health. Springer, Cham, pp. 3-12.

AOAC (2012). AOAC official methods of analysis (18th ed.), Gaithersburg, USA: AOAC international.

Balasubramaniam, V. M., Barbosa-Cánovas, G. V., & Lelieveld, H. L. (2016). *High Pressure Processing of Food. Principles, Technology and Applications*: Springer New York.

Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A., & García-Conesa, M. T. (2007). Stability of polyphenols in chokeberry (Aronia melanocarpa) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry, 102*(3), 865-874. https://doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.025.

Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews, 72*(7), 429-452. https://doi: 10.1111/nure.12114.

Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Ward, N. C., Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2017). The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology, 69*, 243-256. https://doi: 10.1016/j.tifs.2017.04.012.

Bouayed, J., Deusser, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry, 131*(4), 1466-1472. https://doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.030.

Boyer, J., & Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal, 3*, 5. https://doi: 10.1186/1475-2891-3-5.

Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., & Maureira, H. (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry, 128*(2), 520-529. https://doi: 10.1016/j.foodchem.2011.03.074.

Carbonell-Capella, J.M., Buniowska, M., Barba, F.J., Esteve, M.J., Frigola, A., (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food. Science and Food Safety, 13*(2), 155-171.

Canteri-Schemin, M. H., Fertonani, H. C. R., Waszczynskyj, N., & Wosiacki, G. (2005). Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 48*(2), 259-266. https://doi: 10.1590/s1516-89132005000200013.

Colina-Coca, C., Rodríguez-Alcala, L. M., Fontecha, J., González-Pena, D., de Ancos, B., & Sánchez-Moreno, C. (2014). Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. *Food Research International, 64*, 546-552. https://doi: 10.1016/j.foodres.2014.07.047.

Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., & Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chemistry, 156*, 522-531. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.05.135.

D'Antuono, I., Garbetta, A., Linsalata, V., Minervini, F., & Cardinali, A. (2015). Polyphenols from artichoke heads (Cynara cardunculus (L.) subsp scolymus Hayek): in vitro bio-accessibility, intestinal uptake and bioavailability. *Food & Function, 6*(4), 1268-1277. https://doi: 10.1039/c5fo00137d.

Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., & De Ancos, B. (2017). Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonols and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. *Journal of Food Engineering, 213*, 60-68. https://doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.02.015.

Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., & De Ancos, B. (2019). Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple 'Golden Delicious' from different geographical origin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 51,* 20-31. https://doi: 10.1016/j.ifset.2018.06.002.

Gawlik-Dziki, U. (2012). Changes in the antioxidant activities of vegetables as a consequence of interactions between active compounds. *Journal of Functional Foods*, *4*, 872-882. https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.06.004.

Gawlik-Dziki, U. (2014). Modification of enzymatic and non-enzymatic *in vitro* oxidative defence system by bioaccessible phytonutrients of selected spices. *LWT-Food Science and Technology*, 57, 434-441. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.12.039.

Gunathilake, K.D.P.P, Ranaweera, K.K.D.S, & Rupasinghe, H.P.V. (2018). Change of phenolics, carotenoids, and antioxidant capacity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis ofselected edible green leaves. *Food Chemistry, 245*, 371–379. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.096.

Gouw, V.P., Jung, J., & Zhao, Y. (2017). Functional properties, bioactive compounds, and *in vitro* gastrointestinal digestion study of dried fruit pomace powders as functional food ingredients. *LWT- Food Science and Tecnology, 80*, 136-144. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.015.

Hernández, A., & Cano, M. P. (1998). High-pressure and temperature effects on enzyme inactivation in tomato puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*(1), 266-270. https://doi: 10.1021/jf970455g.

Herranz, B., Fernández-Jalao, I., Alvarez, M. D., Quiles, A., Sánchez-Moreno, C., Hernando, I., & de Ancos, B. (2019). Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to in vitro gastrointestinal digestion. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 51*, 114-125. https://doi: 10.1016/j.ifset.2018.05.014.

Jakobek, L., Garcia-Villalba, R., & Tomas-Barberan, F. A. (2013). Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. Journal of Food Composition and Analysis, 31(2), 199-211. https://doi: 10.1016/j.jfca.2013.05.012.

Landl, A., Abadias, M., Sarraga, C., Vinas, I., & Picouet, P. A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple puree product. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 11*(4), 557-564. https://doi: 10.1016/j.ifset.2010.09.001.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(22), 6516-6520. https://doi: 10.1021/jf034475w.

Lucas-González, R., Navarro-Coves, S., Pérez-Álvarez, J.A., Fernández-López, J., Muñoz, L.A., & Viuda-Martos, M. (2016). Assessment of polyphenolic profile stability and changes in the antioxidant potential of maqui berri (*Aristotetelia chilensis* (Molina) Stuntz) during in vitro gastrointestinal digestion. *Industrial Crops and Products, 94*, 774-782.

Nile, S.H., Nile, A.S., Keum, Y.S., & Sharma, K. (2017). Utilization of quercetin and quercetin glucosides from onion (*Allium cepa* L.) solid waste as an antioxidant, urease and xanthine oxidase inhibitors. *Food Chemistry*, 235, 119-126.

Oszmiański, J., Lachowicz, S. & Gamsjäger, H. Phytochemical analysis by liquid chromatography of ten old apple varieties grown in Austria and their antioxidative activity. (2020). *European Food Research and Technology* 246, 437–448. https://doi.org/10.1007/s00217-019-03411-z.

Ortega, N., Macia, A., Romero, M.P., Reguant, J & Motilva, M. J. (2011). Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an in-vitro digestion model. *Food Chemistry, 124*, 65-71.

Quan, W., Tao, Y. D., Lu, M., Yuan, B., Chen, J., Zeng, M. M., He, Z. Y. (2018). Stability of the phenolic compounds and antioxidant capacity of five fruit (apple, orange, grape, pomelo and kiwi) juices during invitro-simulated gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science and Technology*, *53*(5), 1131-1139. https://doi: 10.1111/ijfs.13682.

Ribas-Agusti, A., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Elez-Martinez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58*(15), 2531-2548. https://doi: 10.1080/10408398.2017.1331200.

Serra, A. T., Rocha, J., Sepodes, B., Matias, A. A., Feliciano, R. P., de Carvalho, A., Figueira, M. E. (2012). Evaluation of cardiovascular protective effect of different apple varieties - Correlation of response with composition. *Food Chemistry*, *135*(4), 2378-2386. https://doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.067.

Suarez-Jacobo, A., Rufer, C. E., Gervilla, R., Guamis, B., Roig-Sagues, A. X., & Saldo, J. (2011). Influence of ultra-high pressure homogenisation on antioxidant capacity, polyphenol and vitamin content of clear apple juice. *Food Chemistry*, *127*(2), 447-454. https://doi: 10.1016/j.foodchem.2010.12.152.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, *120*(2), 599–606. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.10.030.

Tenore, G. C., Campiglia, P., Ritieni, A., & Novellino, E. (2013). *In vitro* bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (M. pumila Miller cv Annurca). *Food Chemistry*, *141*(4), 3519-3524. https://doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.051.

Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, *2*(12), 1231-1246. doi: 10.3390/nu2121231

Thuenemann E.C. (2015) Dynamic Digestion Models: General Introduction. In: Verhoeckx K. et al. (eds) The Impact of Food Bioactives on Health. Springer, Cham.

Tu, S. H., Chen, L. C., & Ho, Y. S. (2017). An apple a day to prevent cancer formation: Reducing cancer risk with flavonoids. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(1), 119-124. https://doi: 10.1016/j.jfda.2016.10.016.

USDA, United States Department of Agriculture. Fresh apples, grapes, and pears: World markets and trade. (2019). https://www.fas.usda.gov/data/fresh-apples-grapes-and-pears-world-markets-and-trade/ Accessed 17 February 2020.

Villemejane, C., Denis, S., Marsset-Baglieri, A., Alric, M., Aymard, P., &Michon, C., (2016). *In vitro* digestion of short-dough biscuits enriched in proteins and/or fibres using a multi-compartmental and dynamic system (2): Protein and starch hydrolyses. *Food Chemistry*. *190*, 164-172. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.050.

Wang, W. Y., Sun, C. X., Mao, L. K., Ma, P. H., Liu, F. G., Yang, J., & Gao, Y. X. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of

quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology, 56*, 21-38. https://doi: 10.1016/j.tifs.2016.07.004.

Williamson, G. (2017). Polyphenols in nutrition. *Nutrition Bulletin*, 42, 226–235 DOI: 10.1111/nbu.12278.

Wooton-Beard, P.C., Moran, A., & Ryan, L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Foli-Ciocalteu methods. *Food Reseach International, 44*, 217-224.

Xu, M. L., Zhu, S. M., & Yu, Y. (2016). Effect of high pressure treatment on texture characteristics of fresh-cut apple. *ASABE Annual International Meeting*. https://doi: 10.13031/aim.20162460035.

Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science, 8*, 33-42. doi: 10.1016/j.cofs.2016.02.002.

Zhu, Q. Y., Holt, R. R., Lazarus, S. A., Ensunsa, J. L., Hammerstone, J. F., Schmitz, H. H., & Keen, C. L. (2002). Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50*(6), 1700-1705. https://doi: 10.1021/jf011228o.

Artículo 4:

Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion

Beatriz Herranz, Irene Fernández-Jalao, M. Dolores Álvarez, Amparo Quiles Concepción Sánchez-Moreno, Isabel Hernando, Begoña de Ancos

Innovative Food Science and Emerging Technologies 51 (2019) 114–125

DOI: 10.1016/j.ifset.2018.05.014

Phenolic compounds, microstructure and viscosity of onion and apple products subjected to *in vitro* gastrointestinal digestion

Beatriz Herranz[a], Irene Fernández-Jalao[a], M. Dolores Álvarez[a], Amparo Quiles[b] Concepción Sánchez-Moreno[a], Isabel Hernando[b], Begoña de Ancos[a]*

[a]Department of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Spanish National Research Council (CSIC), C/ José Antonio Novais 10, Madrid 28040, Spain

[b]Department of Food Technology, Universitat Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

*Corresponding author.

E-mail address: ancos@ictan.csic.es (B. de Ancos).

ABSTRACT

Microstructure, viscosity and their relationship with bioaccessibility of phenolic compounds in onion and apple products (untreated and HPP) and commercial quercetin supplement throughout a dynamic gastrointestinal digestion (GID) model were investigated. In non-digested (ND) samples, untreated and HPP-onion presented higher total phenolic and flavonol content (TFC-HPLC and TPC-FC) than apple counterparts. TFC-HPLC decreased throughout GID phases in all samples studied. TFC-HPLC bioaccessibility was higher in onion (~17.6%) than in apple (~10%) and in quercetin supplement (0.027%). HPP did not improve TFC-HPLC bioaccessibility. Throughout GID, onion and apple showed a significant decrease in both consistency (*K*) and apparent viscosity at 10 s^{-1} but higher values were found in apple. These data agree with TFC-HPLC and TPC-FC decrease and with the lower bioaccessibilities of apple compared with onion. Food matrix had a more significant effect than HPP on TFC-HPLC bioaccessibility, which is related to the rheological behavior of the GID-phases.

Keywords: High-pressure processing; *In vitro* gastrointestinal digestion; Bioaccessibility; Phenolic compounds; Viscosity; Microstructure

Industrial relevance: High-pressure processing (HPP) (400 MPa at 25 ºC during 5 min) combined with freeze-drying enhanced significantly flavonols extractability (TFC-HPLC) in onion and apple and in some cases their bioaccessibility. Bioaccessibility of bioactive compounds in each food matrix is being required by industrials and consumers concerned to know the actual amount of bioactive compounds that are available for intestinal absorption. The change of the matrices viscosity studied throughout *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) could predict the bioaccessibility of these bioactive compounds. HPP could be proposed as a strategy for increasing the extractability of bioactive compounds in vegetable derived products.

1. Introduction

The beneficial effects of a high intake of plant derived products on human health have been attributed to the presence in their composition of bioactive compounds which include vitamin C and E, dietary fiber, carotenoids and phenolic compounds, especially flavonoids (Aguilera, Martin-Cabrejas, & de Mejia, 2016; Lewandowska et al., 2016; Liu, 2013). Onions (*Allium cepa* L.) and apples (*Malus domestica*) are recognized as the major dietary sources of flavonoids, mainly the flavonol quercetin as its aglycone or as *O*-glycosylated derivatives (Roldán-Marín, De Ancos, Cano, & Sánchez-Moreno, 2012). Quercetin and its derivatives are bioactive compounds that nowadays are receiving great attention due to their antioxidant, anti-inflammatory, anti-diabetes, antiestrogenic, cardioprotective, anticarcinogenic, and neuroprotective properties, among others (Erlund, 2004; Guo & Bruno, 2015; Lee & Mitchel, 2012). In fact, numerous commercial quercetin derived products obtained from onions and apples are available as nutraceuticals (Tomé-Carneiro & Visioli, 2016). However, the type and level of the bioactive compounds can vary markedly between species, cultivar, climatic, agronomic, harvest and postharvest conditions and food processing (Williams et al., 2003).

High-pressure processing (HPP) have been proposed as an alternative to traditional thermal processing technologies to obtain safe, nutritive fresh-tasting plant derived products avoiding the degradation of nutrients and bioactive compounds (Rodríguez-Roque et al., 2015). In addition, HPP may alter the food matrix resulting in a major extractability and bioaccessibility of bioactive compounds in different plant foods such as onion, persimmon, fruit juices and beverages (Plaza, Colina, De Ancos, Sánchez-Moreno & Cano, 2012; Vázquez-Gutiérrez et al., 2013).

The beneficial effects of quercetin and its derivative compounds on health depend not only of large amounts of them in the ingested foods but also on their bioaccessibility.

The bioaccessibility is defined as the fraction of bioactive compound released from its food matrix in the gastrointestinal tract available for the intestinal absorption (Carbonell-Capella et al., 2014). Phenolic compounds are usually bound to carbohydrates of the cell wall meanwhile others such as flavonoids may stay in the cytosol or in the vacuoles. Thus, the bioaccessibility of phenolic compounds require the disruption of the cell walls and cellular compartments (Bohn, 2014; Kamiloglu, Capanoglu, Bilen, Gonzales, Grootaert, de Wiele & Van Camp, 2016). *In vitro* gastrointestinal digestion (GID) models have been widely used to determine the bioaccessibility of phenolic compounds obtaining results that are well correlated with those obtained *in vivo* (Bermudez-Soto, Tomás-Barberán, & García-Conesa, 2007; Tagliazucchi, Verzelloni, Betolini, & Conte, 2010). These studies have been carried out by determining different total phenolic families using spectrophotometric methods (Bouayed, Hoffmann, & Bohn, 2011) or by the identification and quantification of phenolic compounds by LC-DAD (Bouayed, Deuβer, Hoffmann, & Bohn, 2012) and LC-MS (Kamiloglu et al., 2016).

It is well known that rheology is a tool widely used to characterize the internal structure of complex fluids as colloidal suspensions and emulsions. Digest from the small intestine is a complex aqueous suspension of undigested particulate matter and solubilized nutrients, together with other components such as secreted enzymes, bile, and mucin (Shelat et al., 2015). The authors reported that rheology could play an important role in controlling digestive features. Hence, rheological measurements such as viscosity are important factors to be considered in *in vitro* models because they could be related with bioaccessibility of the phenolic compounds.

The aim of this work was to study the changes in the microstructure and viscosity of onion and apple powder samples (untreated and HPP), as well as of commercial quercetin supplement, throughout different phases of an *in vitro* GID model, and their

potential relationships with the bioaccessibility of phenolic compounds (total phenolic and total flavonol content). A comparative study between the bioaccessibitily of total phenolic and flavonol compounds calculated by spectrophotometric and HPLC-DAD methods were also carried out.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

2.1.1. Analysis of phenolic compounds

Methanol (HPLC-grade) was supplied by Lab-Scan (Dublin, Ireland). Folin-Ciocalteu´s phenol reagent, ferulic acid, gallic acid, quercetin, quercetin-3-glucoside, quercetin-3,4′-diglucoside and isorhamnetin-3-glucoside were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

2.1.2. Simulated gastrointestinal digestion

Citrate buffer (pH 6, C-999), α-amylase (from *Aspergillus oryzae*, A-9857), pepsin (from porcine gastric mucosa, P-7012), trypsin (from bovine pancreas, T-8253), pancreatin (from porcine pancreas, P-7012) and bile (porcine bile extract, B-8631) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lipase (Rhizopus lipase, F-AP15) was obtained from Amano Enzyme, Inc. (Nagoya, Japan).

2.2. Plant material

Onions (*Allium cepa* L. var *cepa*, 'Recas') from Carabaña, Madrid (Spain) and apples (*Malus domestica*, 'Golden Delicious') from Aragón (Spain) were obtained in a Madrid local supermarket in May of 2015 and storage at 4 °C for two days until use. Physicochemical and chemical characteristics of initial plant material are shown in Table S1. Dietary quercetin supplement in capsules of 500 mg (Solaray, Nutraceutical Corp.

USA) were purchased in a Madrid local pharmacy. Onions were hand-peeled (only the external layer) and cut into 10 mm cubes. Apples were washed and cut in slices with skin of 10 mm thick. Cubes of onion and slices of apples (200 g) were packaged in very low gas permeability plastic bags (BB4L, Cryovac, Barcelona, Spain) and sealed with vacuum. After packaging, half of the onion and apple samples were immediately frozen with liquid nitrogen and lyophilized (Lyophilizer model Lyoalfa, Telstar S.A., Barcelona, Spain) (0.13 mbar, -90 ºC). Lyophilized samples were pulverized using an ultracentrifugal grinder ZM 200 (Retsch GmbH, Haan, Germany) obtaining a fine powder (particle size ≤0.5 mm) and maintained at -20 °C until analysis.

2.3. High pressure processing (HPP)

The other half of the packaged onion and apple samples were treated in a high hydrostatic pressure unit with a vessel of 2925 mL capacity, a maximum pressure of 900 MPa, and a working temperature ranged between -10 to 60 ºC (High pressure Iso-Lab System, Model FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power LTD., Essex, UK). Two bags of packed onions or apples were introduced in the vessel of the pressure unit filled with pressure medium (water) and treated at 400 MPa with a holding time of 5 min and a maximum temperature of 35 ºC. HPP conditions were selected in accordance with previous studies (González-Peña et al., 2013). The compression rate was 500 MPa/min and the decompression was instantaneous. Pressure, time and temperature were controlled and monitored by a computer program during the process. After treatments, pressurized onion and apple samples were immediately frozen with liquid nitrogen and lyophilized as indicated above.

132 *2.4. In vitro dynamic gastrointestinal digestion (GID)*

133 A dynamic gastrointestinal digester (DGD) was used to digest onion and apple
134 powder samples and commercial quercetin supplement. The digester employed and the
135 gastrointestinal digestion procedure have been previously described (Fernández-Jalao,
136 Sánchez-Moreno, & De Ancos, 2017; Villemejane et al., 2016). The DGD consists of two
137 successive serial compartments simulating stomach and small intestine. Peristaltic
138 movements in both compartments stomach and small intestine are simulated. The digest
139 transit was regulated by opening or closing the peristaltic valve pumps that connect the
140 compartments. Temperature at 37±1 ºC, pH and enzymes secretions were computer
141 controlled (Fernández-Jalao et al., 2017),

142 *In vitro* digestion process was performed with 27 g and 37.5 g of freeze-dried
143 powder onion and apple, respectively, and 0.0705 g of commercial quercetin supplement
144 from a pool of 5 capsules. The digestion process included several consecutive enzymatic
145 treatments. Thus, simulated saliva secretions (α-amylase, citrate buffer and electrolyte
146 solution) (pH 6), simulated gastric secretions (hydrochloric acid, gastric electrolytes
147 solution, gastric lipase and pepsin) (pH 2), and simulated intestinal secretions (sodium
148 bicarbonate, intestinal electrolytes solution, pancreatin, bile and trypsin) (pH 6.5 -7) were
149 introduced into compartments by computer-controlled pumps. The digestion took 360 min
150 (from 0 to 120 min in the stomach and from 120 to 360 min in the small intestine) at 37 ºC
151 in absence of light and under anaerobic conditions by injecting nitrogen gas in the system.
152 Two different *in vitro* gastrointestinal digestion procedures have been done for each
153 product (onion powder, apple powder or quercetin supplement) according to that described
154 by Fernández-Jalao et al. (2017). To monitor the release of phenolic compounds from
155 onion (or apple or quercetin supplement) at different stages of digestion, in comparison
156 with the non-digested (ND) products, aliquots from the artificial saliva treatment [oral-

157 phase (OP)], gastric digest (GD) and intestinal digest (ID) were separated and acidified to
158 pH 2. Then, these aliquots were frozen and stored at -20 ºC until analysis. The rest of the
159 intestinal digest at pH 2 was centrifuged (Sigma Laboratory Centrifuge at 6K15) at 3890 *g*
160 at 4 ºC for 60 min and the supernatant were separated. This supernatant represents the
161 soluble fraction (SF) (or bioaccessible fraction) of the product sample according to
162 previously described procedure (Cilla et al., 2012). The SF was immediately frozen and
163 stored at -20 ºC until its analysis.

164 Bioaccessibility defined as the portion of bioactive compounds (BC) that is
165 released from the food matrix into the gastrointestinal tract and thus become available for
166 intestinal absorption was determined in the SF using the next equation and expressed as
167 percentage:

168 Bioaccessibility (%)= ($BC_{digested}$ / $BC_{non\text{-}digested}$) x 100

169 With:

170 $BC_{digested}$= Concentration of BC in the soluble fraction of digested sample

171 $BC_{non\text{-}digested}$ = Concentration of BC in the non-digested sample

172 *2.5. Analysis of Phenolic Compounds*

173 *2.5.1. Preparation of phenolic extracts from non-digested (ND) products*

174 Untreated and HPP powder samples (0.5 g of onion and 1 g of apple) were
175 extracted with 12.5 mL of methanol/water (80:20, v/v) in an ultrahomogenizer at 7000 rpm
176 for 4.5 min (model ES-270, Omni International Inc., Gainesville, VA, USA). The mixtures
177 were centrifuged at 8000 *g* at 4 °C for 15 min, using a refrigerated centrifuge (Thermo
178 Scientific Sorvall, mod. Evolution RC, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). The pellets
179 were re-extracted with 12.5 mL of extraction solvent and centrifuged again. The two
180 supernatants were combined and concentrated to approximately 2 mL using a rotatory

evaporator at 40 ºC. Methanol was added to reach a final volume of 10 mL. Methanolic extracts were stored at -20 °C until analysis. Each sample was extracted in duplicate and analyzed two times.

2.5.2. Preparation of phenolic extracts from GID phases

Aliquots (10 g) from different phases of GID (OP, GD and ID) were lyophilized and extracted with 10 mL of methanol (1.5 mL for soluble fraction). The mixture was vigorously stirred in a vortex for 2 min and 10 min more with a magnetic stir plate. The mixtures were centrifuged at 8000 *g* at 4 °C for 15 min, using a refrigerated centrifuge (Thermo Scientific Sorvall, mod. Evolution RC, Thermo Fisher Scientific Inc., USA). The supernatant was separated and used in subsequent analysis. Each sample was extracted in duplicate and analyzed two times. For each ND extract and fractions of each GID phase (OP, GD, ID and SF), different analysis were performed as indicated below.

2.5.3. Total Phenolic Content by Folin-Ciocalteu (TPC-FC)

TPC-FC of undigested samples and different digestion phases was performed by according to the procedure described in González-Peña et al. (2013) and Fernández-Jalao et al. (2017). Folin-Ciocalteu method was used to quantify the sample´s reducing capacity due to other antioxidants such as ascorbic acid, citric acid, simple sugars, or certain amino acids also are detected by this assay (Huang, Ou, & Prior, 2005). All the samples were analyzed in duplicate and expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) per gram of dry weight (dw).

2.5.4. Total flavonol content by spectrophotometric assay (TFC-S)

The analysis of TFC-S was carried out according to the methodology described by Bonoli et al. (2004) using an Ultrospec 4300 pro UV-vis-Spectrophotometer (GE Amersham Biosciences Pharmacia, Sweden). Quantification was achieved using quercetin

as external standard calibration curve in the range from 1 to 50 µg/mL. All the samples were analyzed in duplicate and expressed as mg of quercetin equivalents (QE) per gram of dry weight (dw).

2.5.5. Total flavonol content by HPLC-DAD (TFC-HPLC)

Total flavonol content was determined as the sum of individual flavonols that was separated, identified and quantified by HPLC-DAD according to the procedure described by González-Peña et al. (2013). The quantification was achieved using standards calibration curves of quercetin, quercetin-3-glucoside, quercetin-3,4′-diglucoside and isorhamnetin-3′-glucoside in the range from 0.4 to 550 µg/mL. All the samples were analyzed in duplicate and expressed as mg per gram of dry weight (dw).

2.6. Microstructure

A light microscope (Nikon Eclipse 80i, Nikon Co., Ltd., Tokyo, Japan) was used to study the structure of different GID phases (ND, OP, GD, and ID) according to Hernández-Carrión et al. (2015). The autofluorescence of the samples containing phenolic compounds was observed while using a mercury arc lamp with a FITC filter (λex max=482 nm, λem max=536 nm) as excitation source. A drop of sample was placed on a microscope slide, covered with a cover slip and visualised at 4x. The images were captured and stored at 1280 x 1024 pixels using the microscope software (NIS-Elements F, Version 4.0, Nikon, Tokyo, Japan). The software interfaced directly with the microscope, enabling image recording.

2.7. Viscosity measurements

Steady shear tests were carried out with a dynamic Kinexus Pro Rotational Rheometer (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) equipped with a cone and

plate geometry (4° cone angle, 40 mm diameter) and a gap of 0.150 mm. Samples of different GID phases (ND, OP, GD, and ID) were placed into the plates at 37 °C and a cover was used to maintain the samples at the specified temperature. Temperature was controlled to within 0.1 °C by Peltier elements in the lower plates kept at 37 °C. The SF was discarded for the viscosity measurements as the presence of precipitates in the liquid phase prevented the adequate measure of the viscosity. Before measurement, a pre-shear was done at shear rate of 100 s^{-1} for 5 min for temperature setting, standardizing the shear rate of each sample, as well as avoiding particle trapping near the tip of the cone (Shelat et al., 2015). Then, flow curves were obtained as a function of shear rate ranging from 100 to 0.1 s^{-1}. The power law model (Eq. (1)) was used to describe the shear rate effect on apparent viscosity values of the samples:

$$\eta_a = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (1)$$

Where η_a is the apparent viscosity (mPa s), K is the consistency coefficient (mPa s^n), $\dot{\gamma}$ is the shear rate (s^{-1}), and n is flow behavior index.

A shear rate at 10 s^{-1} has been used to mimic oral conditions (Espinal-Ruiz, Restrepo-Sánchez, Narvaez-Cuenca, & McClements, 2016; Pal, 2011). The maximum shear stress generated by the small intestine has been reported to be about 1.2 Pa (Hardacre, Lentle, Yap, & Monro, 2016). The authors reported that a maximum shear stress of 1.2 Pa would generate shear rates of about 10 s^{-1} at an apparent viscosity of 0.1 Pa s ($\eta_{a,0.1}$) and 0.1 s^{-1} at an apparent viscosity of 10 Pa s ($\eta_{a,10}$). Linear correlations between experimental apparent viscosity and predicted values by power law models at shear rates of 0.1, 7.5 and 100 s^{-1} were also established in order to test the accuracy of the predictive models. Measurements were performed in triplicate on two different *in vitro* digested samples (n = 6).

253 *2.8. Statistical analysis*

254 One-way analysis of variance (ANOVA) of the results followed by the least
255 significant difference test (LSD) were carried out to determine significant differences ($P <$
256 0.05) in the concentration and bioaccessibility of bioactive compounds, as well as in the
257 viscosity of the samples in relation to the three factors studied (GID phase, HPP and food
258 matrix). Two-way analysis of variance (ANOVA) was also performed to study separately
259 the main effects (GID phase and HPP, as well as GID phase and food matrix) and the
260 interaction effects (GID phase × HPP and GID phase × food matrix, respectively). All
261 statistical analyses were performed with StatgraphicsPlus 5.1 (Statistical Graphics
262 Corporation, Inc., Rockville, MD, USA). The results are reported as mean ± standard
263 deviation.

264 **3. Results and discussion**

265 *3.1. Effects of in vitro GID phase, HPP and food matrix (onion, apple and quercetin*
266 *supplement) on total flavonol and total phenolic content and their bioaccessibility*

267 Table 1 shows the effect of the *in vitro* GID phases (OP, GD, ID and SF), in
268 comparison with non-digested (ND) samples, on the content and bioaccessibility of total
269 phenolic content (TPC-FC) and total flavonol content determined by spectrophotometric
270 methods (TFC-S) and by HPLC-DAD (TFC-HPLC) in onion and apple products
271 modulated by two different factors, food matrix and HPP. Also a quercetin supplement was
272 subjected to a GID.

273 Initially, onion product (untreated and non-digested) presented significantly
274 (P<0.05) higher total phenolic compounds and total flavonol content than apple product
275 (Table 1). Regarding the methodology used, total flavonol content in untreated and non-
276 digested apples determined by spectrophotometric assays (TFC-S) (0.27 mg QE/g dw) was

277 similar to those calculated by HPLC-DAD (0.26 mg/g dw) (TFC-HPLC). However, TFC-
278 HPLC in onion (8.65 mg/g dw) was 2.26-fold higher than TFC-S (3.82 mg/g dw) (Table
279 1).
280 When considering HPP effects on non-digested samples (ND), HPP-onion showed a
281 significantly (P<0.05) higher TPC-FC, TFC-S and TFC-HPLC (6%, 9% and 13%,
282 respectively) than its corresponding untreated sample (Table 1). Also, HPP increased 30%
283 the TFC-HPLC value in apple product although this trend was not detected by
284 spectrophotometric assays (TFC-S). Different effect on the extraction of total phenolic
285 compounds due to HPP and depending on the type of assay (spectrophotometry or HPLC-
286 DAD) was also observed in fruit-juices beverages (Rodriguez-Roque et al., 2015). These
287 results are in accordance with those found in the literature that shown how HPP could
288 produce changes in the membrane permeability and disruption of cell walls favoring the
289 release of phenolic compounds from tissues improving their extractability (Fernández-
290 Jalao et al. 2017; González-Peña et al., 2013; Rodriguez-Roque et al., 2015; Vázquez-
291 Gutiérrez et al., 2013). However, HPP produced a significant decrease (P<0.05) of 14% in
292 the total phenolic content (TPC-FC) in apple. These different results found for TPC-FC in
293 onion and apple products are in accordance with the fact that the increase of extraction of
294 bioactive compounds by HPP depends on both the treatment intensity and the food matrix
295 (Barba, Esteve & Frigola, 2012).

Table 1. Effects of *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion (GID), high-pressure processing (HPP) and food matrix on total flavonol and total phenolic content of onion and apple products and commercial quercetin supplement

Digestion Phase	Treatment	Onion powder			Apple powder			Quercetin Supplement
		Total Flavonol Content (TFC-S) (mg QE/g dw)	**Total Flavonol Content (TFC-HPLC)[1]** (mg/g dw)	**Total Phenolic Content (TPC-FC)** (mg GAE/g dw)	**Total Flavonol Content (TFC-S)** (mg QE/g dw)	**Total Flavonol Content (TFC-HPLC)** (mg/g dw)	**Total Phenolic Content (TPC-FC)** (mg GAE/g dw)	**Total Flavonol Content (TFC-HPLC)** (mg/g dw)
Non-digested (ND)	Untreated	$3.82\pm0.19^{A}{}_{b}$*	$8.65\pm0.02^{A}{}_{b}{}^{*}$	$4.17\pm0.05^{D}{}_{b}$*	$0.27\pm0.007^{B}{}_{a}$	$0.26\pm0.01^{A}{}_{b}$	$3.42\pm0.23^{A}{}_{a}$	736.10 ± 36.81^{A}
Oral-phase (OP)	Untreated	$3.35\pm0.06^{B}{}_{b}$*	$7.50\pm0.08^{B}{}_{b}{}^{*}$	$4.34\pm0.13^{C}{}_{a}$*	$0.26\pm0.03^{B}{}_{a}$	$0.22\pm0.01^{B}{}_{a}$	$2.54\pm0.16^{B}{}_{a}$	492.05 ± 7.08^{B}
Gastric digest (GD)	Untreated	$3.38\pm0.12^{B}{}_{b}$*	$7.03\pm0.15^{C}{}_{b}{}^{*}$	$4.91\pm0.14^{B}{}_{b}$*	$0.32\pm0.02^{A}{}_{a}$	$0.22\pm0.02^{B}{}_{a}$	$2.06\pm0.17^{C}{}_{a}$	71.19 ± 0.61^{C}
Intestinal digest (ID)	Untreated	$2.92\pm0.03^{C}{}_{b}$*	$5.17\pm0.25^{D}{}_{b}{}^{*}$	$7.41\pm0.11^{A}{}_{b}$*	$0.37\pm0.04^{A}{}_{b}$	$0.16\pm0.004^{C}{}_{b}$	$3.41\pm0.23^{A}{}_{b}$	20.54 ± 0.39^{D}
Soluble fraction (SF)	Untreated	$0.64\pm0.06^{D}{}_{b}$*	$1.54\pm0.17^{E}{}_{a}{}^{*}$	$3.73\pm0.10^{E}{}_{b}$*	$0.16\pm0.03^{C}{}_{a}$	$0.03\pm0.003^{D}{}_{a}$	$2.78\pm0.23^{B}{}_{a}$	0.20 ± 0.01^{E}
Bioaccessibility (%)	Untreated	$16.55\pm2.26_{a*}$	$17.80\pm1.93_{a}$	$89.45\pm2.57_{a}$	$59.72\pm7.38_{a}$	$11.57\pm1,11_{a}$	$81.47\pm5.39_{a}$	0.027 ± 0.001
Non-digested (ND)	HPP	$4.17\pm0.16^{A}{}_{a}$*	$9.75\pm0.02^{A}{}_{a}{}^{*}$	$4.43\pm0.06^{C}{}_{a}$*	$0.28\pm0.01^{B,C}{}_{a}$	$0.34\pm0.003^{A}{}_{a}$	$2.93\pm0.14^{B}{}_{b}$	
Oral-phase (OP)	HPP	$4.02\pm0.15^{A}{}_{a}$*	$8.68\pm0.08^{B}{}_{a}{}^{*}$	$4.44\pm0.22^{C}{}_{a}$*	$0.23\pm0.03^{C}{}_{a}$	$0.19\pm0.02^{B}{}_{a}$	$2.37\pm0.18^{C,D}{}_{a}$	
Gastric digest (GD)	HPP	$4.37\pm0.15^{A}{}_{a}$*	$7.69\pm0.75^{C}{}_{a}{}^{*}$	$5.06\pm0.11^{B}{}_{a}$*	$0.31\pm0.04^{B}{}_{a}$	$0.16\pm0.03^{C}{}_{b}$	$2.20\pm0.22^{D}{}_{a}$	
Intestinal digest (ID)	HPP	$3.28\pm0.20^{B}{}_{a}$*	$5.81\pm0.25^{D}{}_{a}{}^{*}$	$8.66\pm0.32^{A}{}_{a}$*	$0.53\pm0.06^{A}{}_{a}$	$0.20\pm0.01^{B}{}_{a}$	$4.99\pm0.13^{A}{}_{a}$	
Soluble fraction (SF)	HPP	$0.75\pm0.05^{C}{}_{a}$*	$1.70\pm0.06^{E}{}_{a}{}^{*}$	$4.22\pm0.08^{D}{}_{a}$*	$0.17\pm0.008^{D}{}_{a}$	$0.03\pm0.002^{D}{}_{a}$	$2.51\pm0.20^{C}{}_{b}$	
Bioaccessibility (%)	HPP	$17.99\pm0.62_{a}{}^{*}$	$17.47\pm0.64_{a*}$	$95.33\pm2.16_{a*}$	$59.93\pm3.73_{a}$	$8,91\pm0,67_{b}$	$85.53\pm3.99_{a}$	

Values are given as mean (n = 4) ± standard deviation. [1] Data published in Fernandez-Jalao et al., (2017). HPP = High-pressure processing; TFC-S = Total flavonol content by spectrophometric assay; TFC-HPLC = Total flavonol content by HPLC; TPC-FC = Total phenolic content by Folin-Ciocalteu; [A–D] Different uppercase letters for the same determination and treatment level (untreated or HPP samples) means significant differences ($P < 0.05$) between GID phases; [a,b] Different lowercase letters for the same determination and *in vitro* digestion phase means significant differences ($P < 0.05$) between untreated and HPP samples;* Asterisk means significant differences ($P < 0.05$) between products (onion and apple) for the same determination and GID phase. GAE = Gallic acid equivalents; QE = Quercetin equivalents.

296 For example, Plaza et al. (2012) found significant increases by 86% in the
297 extractability of total carotenoids in the astringent and less maturity (stage III) persimmon
298 fruit cv. Rojo Brillante meanwhile with non-astringent persimmon with similar maturity
299 stage, the same HPP produced a significant decrease (~60%) of total carotenoids extracted.
300 Table S1 shows the different physicochemical and chemical composition of onion and
301 apple products that can modulate the effect of HPP favoring or not the extraction of
302 bioactive compounds depending on the intensity and duration of the treatment. Therefore,
303 taking into account numerous published results, the effect of HPP on bioactive compounds
304 must be separately studied in each food matrix (Barba et al., 2012 Vázquez-Gutiérrez et al.,
305 2013; Rodriguez-Roque et al., 2015).
306 Considering the effects of *in vitro* gastrointestinal digestion (GID), two-way
307 ANOVAs showed that during the GID of onion and apple products, either the phase of the
308 *in vitro* GID or HPP, as well as the interaction between them exerted a significant
309 influence (P<0.05) on TPC-FC, TFC-HPLC (Fig. 1) and on TFC-S (data not shown).
310 Therefore, in both onion and apple products, the effect of HPP on TPC-FC and TFC-HPLC
311 was dependent on the individual *in vitro* GID phase analyzed. Thus, TFC-HPLC in onion
312 and apple products (untreated and HPP) (Fig. 1A and 1B) and TFC-S in the quercetin
313 supplement (Table 1) showed a continuous decrease from ND sample to ID phase. On the
314 contrary, the highest total phenolic compounds (TPC-FC) value in onion and apple
315 products (untreated and HPP) was obtained in the intestinal phase (ID) (Fig. 1G and 1H). A
316 detailed explanation is given below.

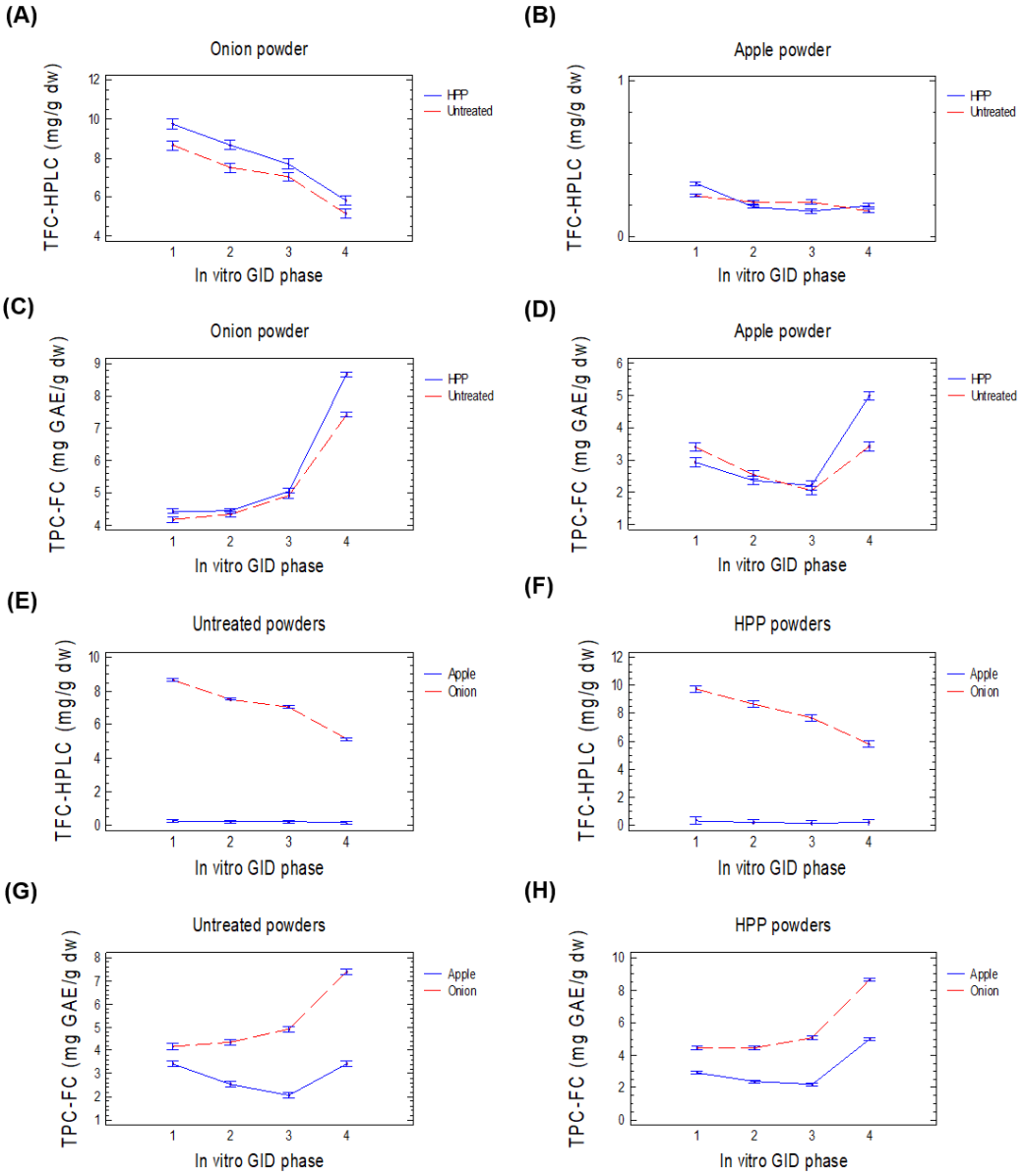


Fig. 1. Plots of interactions from two-way ANOVAs. (A-D): main effects were *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) phases (1: non-digested-ND; 2: oral-phase-OP; 3: gastric digest-GD; 4: intestinal digest-ID) and treatment [untreated and high-pressure processing (HPP)] performed on total flavonols (TFC-HPLC) and total phenolic compounds (TPC-FC) in both onion and apple powders. (E-H): main effects were *in vitro* GID phases and food matrix performed on TFC-HPLC and TPC-FC in both untreated and HPP powders.

317

318 *3.1.1. Total flavonol content (TFC).*

319 Total flavonol content analyzed by HPLC (TFC-HPLC) progressively decreased

320 (P<0.05) throughout the different GID phases in both untreated and HPP onion and apple

321 products. Thus, OP and GI phases retained by 89-87% and 79-81%, respectively, the total

322 flavonol content (TFC-HPLC) of native onion in untreated and HPP products (Table 1).
323 These results previously published (Fernández-Jalao et al. (2017) were compared with
324 those obtained with apple product. Thus, in untreated apple, a recovery of 85% of native
325 TFC-HPLC after OP and GD phases has been achieved as in onion (Table 1). Similar
326 results were found in the literature for apples (cv. Mutzu and Golden) with a recovery of
327 80-85% of the initial total flavonols after GD phase (Bouayed et al., 2012). However, HPP-
328 apple showed lower recovery of the native TFC-HPLC (47%) than HPP-onion (79%) after
329 gastric digestion (GD) (Table 1). In general, flavonol compounds showed relatively good
330 stability under gastric conditions depending on the food matrix and their physicochemical
331 characteristics. For example, around 75-80% of initial amount of quercetin derivatives in
332 apples were released in the GD phase (Bouayed et al., 2012) and by 75% in a blended fruit
333 juices (Rodriguez-Roque, Rojas-Graü, Elez-Martínez & Martín-Belloso, 2013).

334 The transition from acid gastric to mild basic intestinal environment produced a
335 significant loss of total flavonols (26%) in all the products studied in the present study
336 except for HPP-apple where a significant increase of 25% was achieved. This increase of
337 quercetin derivatives concentration in the ID was previously detected in blended fruit
338 juices, where rutin increased 25% its initial concentration (Rodriguez Roque el al., 2013),
339 and in apples (~10%) (Bouayed et al., 2011) suggesting an efficient extraction of these
340 compounds under intestinal conditions.

341 Approximately by 60% of the native TFC-HPLC was bioaccessible in the ID phase
342 of onion and apple products (untreated and HPP) (Table 1). However, significant
343 differences in the bioaccessibility of total flavonols were found depending on HPP and
344 food matrix. Although TFC-HPLC in the ID of HPP-onion (1.70 mg/g dw) was a 10%
345 higher than in the untreated onion (1.54 mg/g dw), no significant differences (P<0.05)
346 were found between their bioaccessibilities (17.47 - 17.80%), so in this case HPP did not

347 improve the bioaccessibility of total flavonols in onion (Fernández-Jalao et al., 2017).
348 Also, HPP did not improve the TFC-HPLC bioaccessibility in apple product moreover a
349 significant decrease by 23% was observed (Table 1). Higher bioacesibilities to those found
350 for onion and apple products in the present study were reported for the flavonols rutin
351 (22.2%) and quercetin (28.9%) in a blended fruit juice (Rodriguez-Roque et al., 2013) and
352 in total flavonols in apples (~50%) (Bouayed et al., 2012). The differences between the
353 flavonol bioaccessibilities calculated in the present study and those found in the literature
354 may be due to the different reasons such as we used a dynamic GID equipment and
355 centrifugation to obtain the soluble fraction (SF).

356 In the present study, the bioaccessibility of TFC-HPLC in apple (11.57%) was
357 significant lower than in onion (17.80%). These results agree with those obtained by
358 Hollman et al., (1997) that suggested that the bioaccessibility of the flavonol quercetin in
359 onion was higher than in apple as a consequence of the chemical structure of the main
360 flavonols present in their matrices. Thus, the main flavonols in onion are glucoside
361 derivatives of quercetin and they seemed to be more bioaccessible than quercetin-3-
362 galactoside mainly present in apples. The results obtained in this research agree with those
363 obtained in other studies that showed how the bioaccessibility of phenolic compounds
364 depend on the combined effect of food matrix and the type of processing applied
365 (Rodriguez-Roque et al., 2015).

366 The spectrophotometric assay (TFC-S) detected approximately 1.77 - 2.26 times
367 lower total flavonol content than HPLC-DAD in the different GID phases of onion and was
368 not able to show the decrease of total flavonols after oral and gastric phase (OP and GD).
369 However, the bioaccessibilities calculated by TFC-S (16.55-17.99%) in untreated and
370 HPP-onion was similar to those observed by TFC-HPLC (17.80-17.47%) (Table 1).
371 Contrary behaviour was found with apple product. The spectrometric assay detected

between 1.2 and 5 times higher total flavonol content in the different apple GID phases than HPLC-DAD. In fact, the total flavonol bioaccessibility in apple determined by TFC-S (~ 60 %) was significant higher than by HPLC-DAD (8.9-11.57%). Higher total flavonol bioaccessibility in apple (~ 60 %) than in onion (16.55-17.99 %) determined by spectrophotometric assay was not in accordance with the published data that indicated that quercetin glucosides in onion are more bioaccesssibles than the quercetin-3-galactoside present in apple (Hollman et al., 1997). The different pH and the enzymes used to simulate the conditions of the different GID phases in combination with the different composition of apple and onion (Table S1) may be interfering with the reagent of the spectrophotometric assay and these results could be not comparable with those obtained by HPLC-DAD. This is the first time that the effect of GID on total flavonols was carried out at the same time with two different food matrices and two different assays (HPLC-DAD and spectrophotometry). The results obtained by spectrophotometric assays were more dependent on the composition of food matrix (apple or onion) and on the complexity of the reaction medium (GID phases) than those obtained by HPLC.

Table S1. Physicochemical and chemical characteristics of raw plant material.

Parameters	Onion	Apple
Weight (g)	210.8 ± 16.7	195.5 ± 9.3
Water content (%)	89.0 ± 0.4	81.9 ± 0.3
Soluble solid content (°Brix)	7.4 ± 0.3	13.3 ± 1.1
pH	5.3 ± 0.04	3.60 ± 0.04
Acidity (g citric acid/ 100 g fw)	0.07 ± 0.004	0.13 ± 0.01
Pectin (g/100 g fw)	-	0.40 ± 0.1
Soluble Fiber (g/100 g fw)	0.41± 0.02	0.57± 0.01
Insoluble Fiber (g/100 g fw)	1.45± 0.15	2.03± 0.23
Total Fiber (g/100 g fw)	1.86± 0.11	2.60± 0.07
Vitamin C (mg/100 g fw)	5.70 ± 0.2	12.4 ± 0.9
Ascorbic acid (mg/100 g fw)	4.70 ± 0.3	7.70 ± 0.8

Data are the mean (n = 3) ± standard deviation

In conclusion, total flavonol bioaccessibility of processed foods must be separately studied in each food matrix and for specific processing parameters applied such as

389 intensity and duration of HPP, taking into account also the type of analytical assay
390 employed.

391 In addition, a quercetin supplement was submitted to the same GID process than
392 onion and apple products. A progressively decreased of TFC-HPLC (P<0.05) throughout
393 the different GID phases was observed as happened with onion and apple products. In fact,
394 approximately by 3% of the initial TFC-HPLC in the supplement was observed in the ID
395 (Table 1). It is evident that although the TFC-HPLC content in the quercetin supplement
396 (736.10 mg/g dw) was significantly higher than in onion and apple samples (8.65 and 0.26
397 mg/g dw, respectively), the concentration of TFC-HPLC was nearly 8-fold higher in the
398 soluble fraction (SF) of onion product than in the SF of quercetin supplement being the
399 bioaccessibility of TFC-HPLC in the supplement (0.027 %) much lower than in onion and
400 apple products (~17.5% and 10%, respectively). Similar results were previously reported
401 by Hollman et al. (1995). These results showed an important effect of the food matrix in
402 the TFC-HPLC bioaccessibility being more bioaccessible when they are embedded in the
403 plant tissue than in form of a supplement without food matrix.

404 *3.1.2. Total phenolic compounds (TPC-FC).*

405 During GID of both untreated and HPP-onion, the TPC-FC value, or the
406 antioxidant capacity value measure by the reducing capacity of the samples, significant
407 increased from the non-digested (ND) samples up to the ID phase (Table 1). The OP and
408 GD phases maintained unchanged TPC-FC of the native onion product. However, the
409 transit from GD to ID produces a significant increase of TPC-FC in the untreated and HPP
410 onion by 78% and 95%, respectively. The TPC-FC concentration in the ID of HPP-onion
411 was 17% higher than in untreated-onion. In consequence, a significant increase (P<0.05)
412 by 6.5% of the bioaccessibility of TPC-FC was observed in HPP-onion (95.33%) in
413 comparison with untreated-onion (89.45%) (Table 1).

However, TPC-FC of apple (untreated and HPP) followed different behavior as that observed for onion samples in the first phases of GID. Thus, TPC-FC significant (P<0.05) decreased from ND to OP (19-26%) and in the transit from OP to GD (19%). Similar results were found after gastric digestion of different apples where total phenolic in GD was 35% lower than in non-digested product (Bouayed et al., 2011). As in onion, the transit of apple digest from acid gastric to mild basic intestinal environment produced a significant increase (P<0.05) of TPC-FC of 66% and 126% for untreated and HPP-apple, respectively (Table 1). These behavior was also observed with total flavonol content (TFC-HPLC) in both onion and apple (untreated and HPP). Intestinal digestion environment could facilitate the release of phenolic compounds bounded to the vegetable matrix, transforming part of them into other structural forms or release other compounds that could be more sensitive to Folin-Ciocalteu reagent (Bouayed et al., 2011; Bohn, 2014).

3.2. Microstructure of onion and apple powder samples and quercetin supplement.

Fluorescence microscopy allows observing the presence of phenolic compounds, due to their autofluorescence (Pawlikowska–Pawlega et al., 2007). Fig. 2 shows the changes occurred in untreated and HPP onion and apple products, both in non-digested and digested samples. Non important structural differences are observed between untreated and HPP samples, when comparing the ND onion and apple samples.

Regarding the influence of *in vitro* GID in onion, the digestive phases that most seem to influence the autofluorescence of the phenolic compounds are the gastric and intestinal phases. In both untreated and HPP-onion, the increase in fluorescence intensity together with the high extent of the product structural disintegration observed in these GID phases are related to a significant release of phenolic compounds from the food matrix. These effects are largely appreciated in the ID and in the HPP-onion product if compared

438 to ND product. These results are in agreement with the significantly higher values of TPC-
439 FC observed in GD and ID for both untreated and HPP-onion (Table 1).

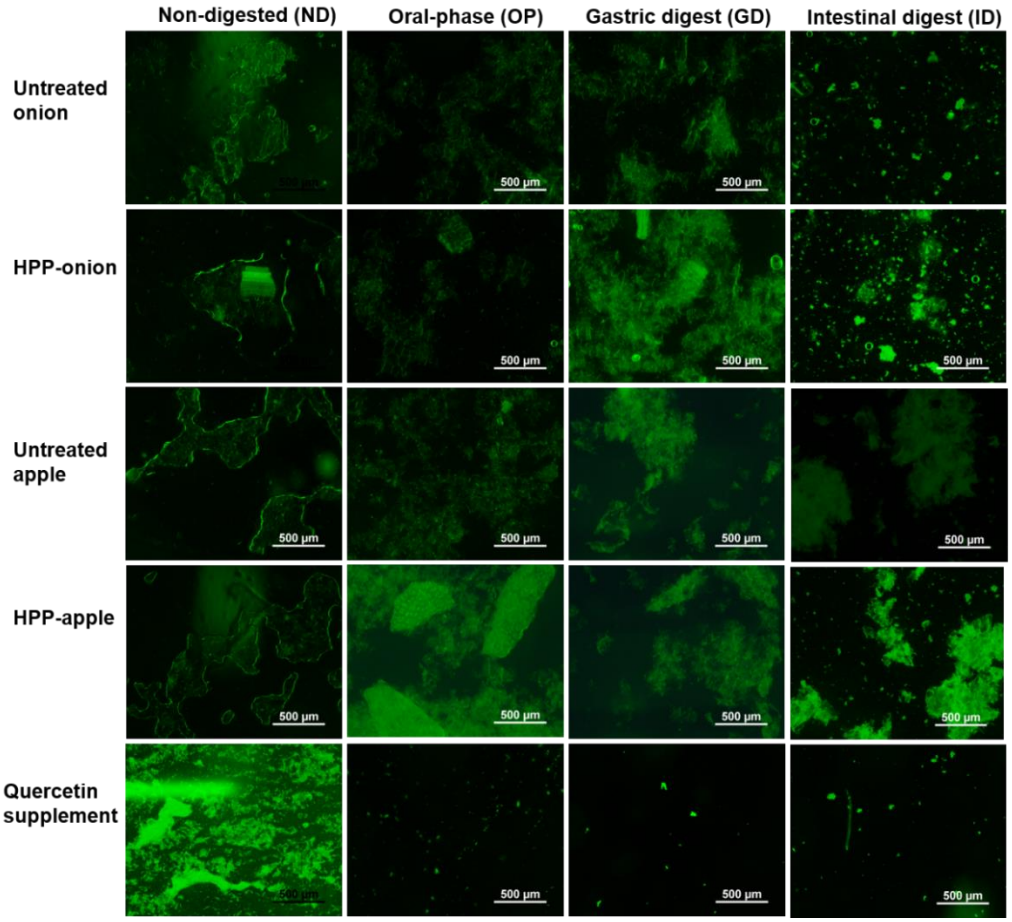


Fig. 2. Light microscopy micrographs of untreated and high-pressure processing (HPP) onion, apple and quercetin supplement products corresponding to the different *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) phases. Magnification: 4x.

440

441 Regarding the apple tissue, there were no substantial changes in the structure and
442 fluorescence of the phenolic compounds in the ND apple product during *in vitro* GID.
443 However, there is a remarkable fluorescence increase during intestinal phase (ID) in the
444 apple subjected to HPP. This increase can be related with a higher extractability of TPC-
445 FC and TFC-HPLC in this phase if compared to untreated sample as observed in Table 1.
446 On the other hand, disintegration during *in vitro* GID is smaller in apple than in onion
447 tissue, which could explain the higher extractability values of TPC-FC and TFC-HPLC
448 found in onion. The different food matrices seem to disintegrate differently during *in vitro*

449 GID, and thus, food matrix has a decisive influence on the extractability of the phenolic
450 compounds.

451 The images corresponding to quercetin supplement show that the intense
452 fluorescence signal observed in non-digested is lost during *in vitro* digestion.

453 All the observations are consistent with the TPC-FC and TFC-HPLC values
454 found in onion, apple and quercetin supplement, as it was discussed in the previous
455 section.

456 *3.3. Viscosity measurements*

457 Changes in the apparent viscosity versus shear rate of untreated onion powder and
458 quercetin supplement at the different *in vitro* GID phases are shown in Fig. 3. Similar
459 curves to untreated onion ones (Fig. 3A) were also obtained for HPP-onion and both
460 untreated and HPP-apple powders (data not shown). As the apparent viscosity decreased
461 with an increase in shear rate, all the samples showed non-Newtonian shear-thinning
462 behavior due to rearrangement in the conformation of the molecules in the dispersion as a
463 result of shearing. As can be seen in Fig. 3B, in quercetin supplement the different GID
464 phases showed very close flow curves. However, in untreated onion (Fig. 3A) there were
465 differences among the GID phases, showing a stepwise decrease in viscosity throughout *in*
466 *vitro* GID.

467 Plots of interactions from the different two-way ANOVAs carried out are shown in
468 Fig. 1S. For onion powder, two-way ANOVA showed significant (P<0.05) *in vitro* GID
469 phase and HPP main effects for both the consistency coefficient (K) and the apparent
470 viscosity at 10 s^{-1} ($\eta_{a,10}$), as well as for the flow behavior index (n) (data not shown).
471 Binary GID phase × HPP interaction was also significant for both K and $\eta_{a,10}$ (Figs. S1A,
472 S1B) and therefore, the effect of pressurization on these properties was dependent on the *in*

vitro GID phase considered. In turn, for apple powder, the GID phase also had a significant effect (P<0.05) on both K and $\eta_{a,10}$ values, but it was not observed neither HPP nor interaction significant effects (Figs. S1C, S1D). For *in vitro* GID phase and food matrix (onion and apple powders) main effects (Figs. S1E-S1H), in untreated powders the binary GID phase × food matrix interaction had no significant effect on both K and $\eta_{a,10}$ values (Figs. S1E, S1F) evidencing that both main effects were no dependent. In addition, food matrix had no significant effect on the K values of HPP powders (Fig. S1G). Finally, regarding *in vitro* GID phase and food matrix (onion and quercetin supplement) main effects (Figs. S1I, S1J), either main effects or interaction had a significant effect (P<0.05) on the values of both K and $\eta_{a,10}$, clearly reflecting that in this case the effect of GID phase was very different at each matrix.

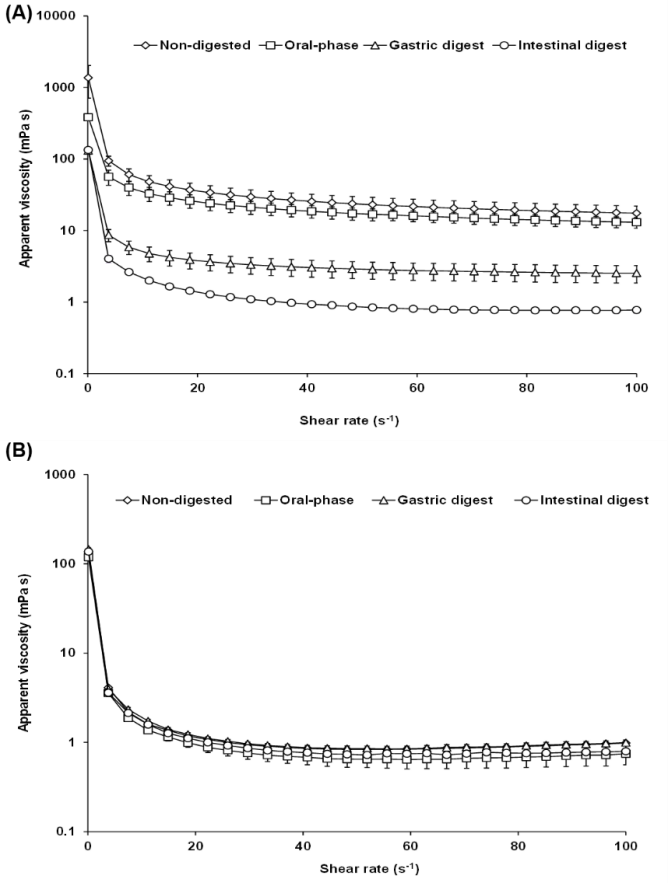


Fig. 3. Apparent viscosity changes versus shear rate at the different *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) phases for (A) Untreated onion powder, (B) Commercial quercetin supplement.

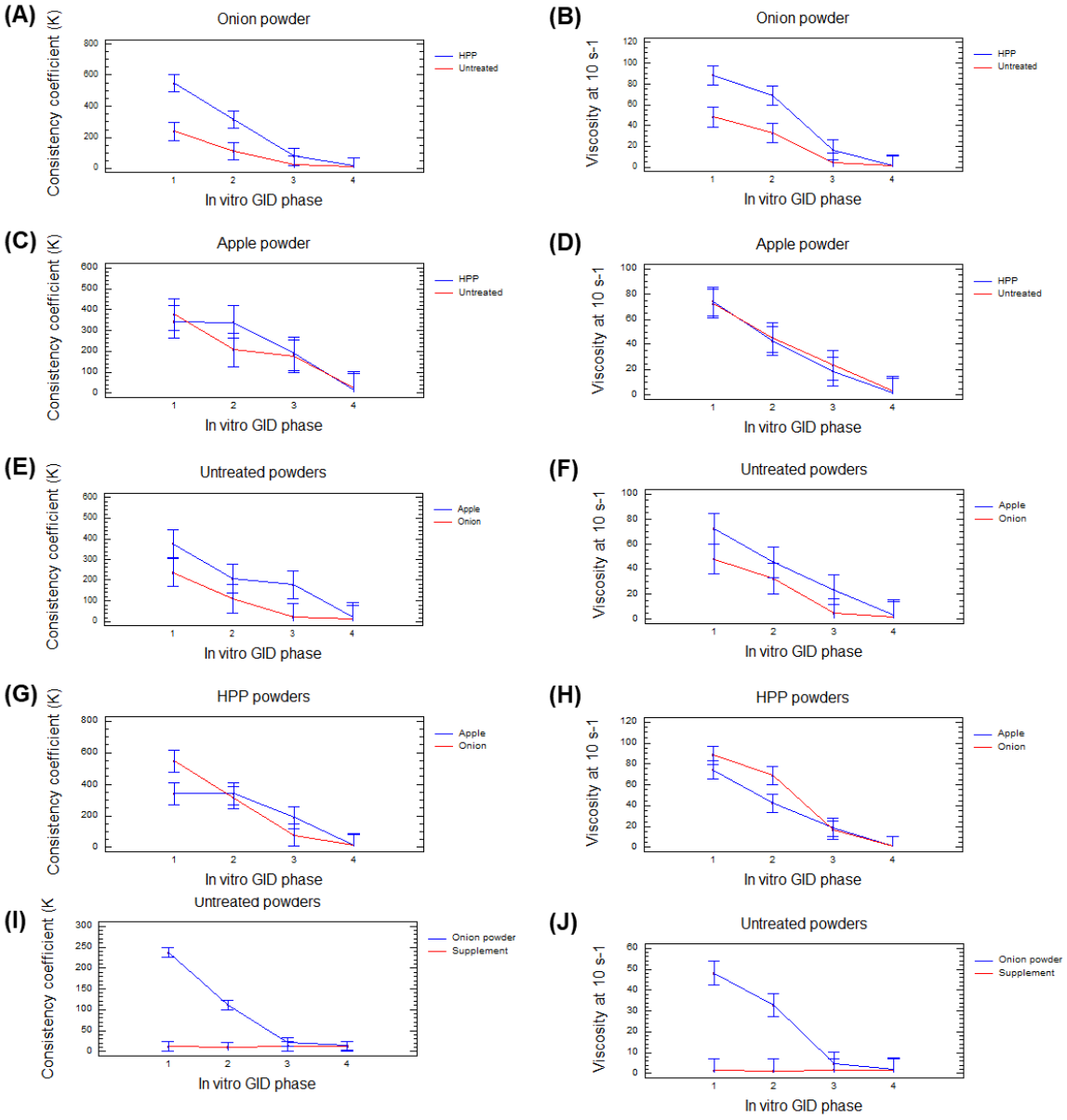


Fig. S1. Plots of interactions from two-way ANOVAs. (A-D): main effects were *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) phase (1: non-digested-ND; 2: oral-phase-OP; 3: gastric digest-GD; 4: intestinal digest-ID) and treatment [untreated and high pressure processsing (HPP)] performed on the consistency coefficient (*K*) and the apparent viscosity at shear rate of 10 s^{-1} ($\eta_{a,10}$) in both onion and apple powders. (E-H): main effects were *in vitro* GID phase and food matrix (onion and apple powders) performed on *K* and $\eta_{a,10}$ for comparison between untreated and HPP-samples (onion and apple powders). (I, J): main effects were *in vitro* GID phase and food matrix (onion powder and quercetin supplement) performed on *K* and $\eta_{a,10}$ for comparison between untreated onion and quercetin supplement powders.

484 *3.3.1. In vitro GID phase effect*

485 Table 2 shows the mean values of both rheological properties (K and $\eta_{a,10}$) in
486 untreated and HPP-treated onion and apple products, as well as in commercial quercetin
487 supplement, before digestion (ND) and after the different *in vitro* GID phases (OP, GD,
488 and ID). The K and $\eta_{a,10}$ values of onion and apple products were much higher than those
489 of commercial quercetin throughout *in vitro* GID. In addition, for the four untreated and
490 HPP-treated onion and apple samples, both K and $\eta_{a,10}$ values decreased significantly
491 ($P<0.05$) during the simulated *in vitro* GID. Therefore, the different GID phases would
492 appear to exert a diluting effect on the digests. In general, there were a significant decrease
493 in the values of K and $\eta_{a,10}$ after the OP in comparison to the ND samples. This diluting
494 effect has been previously reported by other authors (Espinal-Ruiz et al., 2016; Morell et
495 al., 2015) as a consequence of the incorporation of enzymes and liquids during in *vitro*
496 GID process.

497 On the other hand, the *in vitro* GID phase main effect also exerted a significant
498 influence ($P<0.05$) on the K and the $\eta_{a,10}$ values of commercial quercetin supplement.
499 Nevertheless, either K or $\eta_{a,10}$ values were quite similar throughout *in vitro* GID phases.
500 This could be due to lack of a "tissue (solid) matrix" in commercial quercetin supplement
501 unlike onion and apple samples. Unexpectedly, the gastric digest (GD) had the highest
502 consistency and viscosities values.

Table 2. Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion (GID), high-pressure processing (HPP) and food matrix on the steady shear rheological properties of onion and apple powder products and commercial quercetin supplement.

GID phase	Treatment	Onion powder		Apple powder		Quercetin supplement	
		K (mPa s^n)	$\eta_{a,10}$ (mPa s)	K (mPa s^n)	$\eta_{a,10}$ (mPa s)	K (mPa s^n)	$\eta_{a,10}$ (mPa s)
Non-digested (ND)	Untreated	$237\pm18.3^{A}{}_{b}$*	$48.0\pm10.5^{A}{}_{b}$*	$376\pm13.4^{A}{}_{a}{}^{ǂ}$	$72.2\pm17.6^{A}{}_{a}{}^{ǂ}$	$12.2\pm0.178^{A,B}$	1.60 ± 0.038^{B}
Oral-phase (OP)	Untreated	$111\pm18.1^{B}{}_{b}$*	$32.8\pm7.34^{B}{}_{b}$*	$207\pm15.3^{B}{}_{a}{}^{ǂ}$	$45.6\pm14.5^{B}{}_{a}{}^{ǂ}$	10.5 ± 0.472^{C}	1.27 ± 0.087^{C}
Gastric digest (GD)	Untreated	$22.3\pm2.47^{C}{}_{b}$*	$4.77\pm1.11^{C}{}_{b}$*	$178\pm20.7^{B}{}_{a}{}^{ǂ}$	$23.7\pm8.60^{B,C}{}_{a}{}^{ǂ}$	12.8 ± 0.373^{A}	1.78 ± 0.076^{A}
Intestinal digest (ID)	Untreated	$14.2\pm0.501^{C}{}_{a}$*	$2.00\pm0.047^{C}{}_{a}$*	$23.8\pm1.82^{C}{}_{a}{}^{ǂ}$	$3.41\pm0.222^{C}{}_{a}{}^{ǂ}$	11.7 ± 0.304^{B}	1.52 ± 0.065^{B}
Non-digested (ND)	HPP	$546\pm10.6^{A}{}_{a}{}^{ǂ}$	$88.1\pm11.8^{A}{}_{a}$	$341\pm65.1^{A}{}_{a}$	$74.2\pm5.98^{A}{}_{a}$	-	-
Oral-phase (OP)	HPP	$313\pm7.13^{B}{}_{a}$	$68.6\pm12.6^{B}{}_{a}{}^{ǂ}$	$340\pm51.9^{A}{}_{a}$	$42.6\pm6.11^{B}{}_{a}$	-	-
Gastric digest (GD)	HPP	$76.4\pm1.95^{C}{}_{a}$	$16.9\pm1.05^{C}{}_{a}$	$189\pm45.9^{B}{}_{a}{}^{ǂ}$	$18.9\pm5.10^{C}{}_{a}$	-	-
Intestinal digest (ID)	HPP	$15.1\pm0.325^{C}{}_{a}{}^{ǂ}$	$1.97\pm0.091^{D}{}_{a}$	$13.5\pm0.874^{C}{}_{b}$	$1.98\pm0.121^{D}{}_{b}$	-	-

Values are given as mean (n = 6) ± standard deviation.

$^{A–D}$ Different uppercase letters for each steady rheological property and treatment level (untreated or HPP-treated) means significant differences (P < 0.05) between GID phases; $_{a,b}$ Different lowercase letters for each steady rheological property and for the same GID phase means significant differences (P < 0.05) between untreated and HPP-treated samples. ^{ǂ} Latin letter alveolar click means significant differences (P < 0.05) between products (onion and apple) for the same steady rheological property and GID phase. *Asterisk means significant differences (P < 0.05) between products (onion and quercetin supplement) for the same steady rheological property and GID phase. K: consistency coefficient from power law model; $\eta_{a,10}$: apparent viscosity at 10 s^{-1}.

503 *3.3.2. HPP effect*

504 The ND, OP and GD fractions in HPP-treated onion powders presented
505 significantly (P<0.05) higher K and $\eta_{a,10}$ values than their untreated counterparts (Table 2).
506 Only, HPP had no significant effect on the rheological properties of the ID fraction in both
507 digested onion products. Therefore, the HPP in onion powder exerted an important effect
508 on the flow behavior of the digested samples throughout *in vitro* GID. Likely, the HPP
509 affected the cell wall and membrane permeability of HPP-onion, favoring the diffusion of
510 soluble material to the apoplast (Vázquez-Gutiérrez et al., 2014). The authors just cited
511 reported that when 400 MPa at 25°C during 5 min were applied to onion, solubilization of
512 the cell wall material was observed and cells were distorted. This would explain the loss of
513 turgor in these samples, and therefore the increase of the K and $\eta_{a,10}$ values observed in the
514 HPP-onion powders as compared with their untreated counterparts (Table 2). Hence, this
515 phenomenon could explain the higher values of TPC-FC observed in all the GID phases of
516 HPP-onion in comparison with those of untreated ones (Table 1). It seems that 400 MPa
517 disrupted the cell wall of the onions releasing the phenolic compounds bound to
518 carbohydrates of the cell wall (Bohn, 2014) to be available to the organism. Also Gonzalez
519 et al. (2010) and Vázquez-Gutiérrez et al. (2013) found loss of cell integrity and damage
520 on the cell membranes in HPP-onions. On the other hand, it has been reported by Vázquez-
521 Gutiérrez et al. (2014) that HPP can cause deprotonation of charged groups and disruption
522 of salt bridges and hydrophobic bonds in onion, resulting in conformational changes and
523 protein denaturation (US FDA 2000), which could affect their solubility. In addition, these
524 authors also shown that onions treated with 400 MPa at 25 °C had significantly higher
525 (P<0.05) shear force values than untreated ones due to cell wall degradation favoring a
526 better contact between the pectic compounds and the enzyme pectin methyl esterase.

Conversely, in apple powders, only significant differences as a consequence of the HPP effect were observed between ID fractions, which were significantly higher in the untreated cases (Table 2). Hernández-Carrión et al. (2014) found that the damage caused to the texture in sweet pepper cell tissue was less noticeable with 500 MPa for 15 min at 25 °C, probably because this treatment provided suitable conditions for inactivating enzymes such as polygalacturonase. Hence, it seems that at 400 MPa for 5 min at 25 °C the composition or structure of the cell wall of the apple is more resistant to the HPP than those of the onion as discussed below.

3.3.3. Food matrix effect

Regarding food matrix (onion vs. apple) main effect, in all the GID phases, both K and $\eta_{a,10}$ were significantly higher in the untreated apple powder than in the onion one (Table 2). These differences may be only associated with the different chemical composition and structure of both raw tissues included their cell wall. For example, raw apple sample contains pectin, more total fiber and less moisture than raw onion one, and moreover, it has a more acid pH than raw onion (Table S1). The presence of dietary fibers in the emulsions is likely to alter the rheological properties of the gastrointestinal fluids, which may impact the rate and extent of digestion by altering mixing and mass transport processes (Espinal-Ruiz et al., 2016). These authors observed that emulsions containing pectin had a higher viscosity due to the ability of pectin molecules to increase the effective volume fraction of the dispersed phase.

However, in HPP products, ND and ID onion fractions had significantly (P<0.05) higher K values that their HPP-apple counterparts, whereas the contrary occurred when comparing the GD fraction of both pressurized food matrices, reflecting different responses of both pressurized matrices to the digestion conditions. It is worth mentioning that apple

matrix contains starch, and it is well known that if sufficiently high content is present, HPP induces either gelatinization of starch in excess water or "rapid retrogradation" occurring inside intact granules (Vallons et al., 2014). Therefore, HPP-induced starch gelatinization and retrogradation might be partially responsible for the higher rheological properties of HPP-apple products in GD as compared to HPP-onion counterpart. Briones-Labarca et al. (2011) reported that the bioaccessibility of the antioxidant activity, mineral and starch content were significantly affected by HPP and digestion conditions in apple.

In turn, when comparing the quercetin supplement with the untreated onion powder (Table 2), in all the GID phases the K and $\eta_{a,10}$ values of the onion were significantly higher than those of the quercetin powder.

It is interesting to note that onion powder showed a progressive decrease of K and $\eta_{a,10}$ values and TFC-HPLC from ND to ID. However, in quercetin supplement, this behavior was not observed for K and $\eta_{a,10}$ values that remaining almost constant and significantly lower than in onion but also TFC-HPLC significant decreased approximately 87% from ND to ID. This decrease of TFC-HPLC in quercetin supplement (97%) was higher than in onion (60%) and led to a lower TFC-HPLC bioaccessibility (0.027%) in the supplement than in onion (17-18%). That means that different matrices seem to affect the digest conditions and the rheological behavior, at the same time, and, therefore, the bioaccesibility final of the TFC-HPLC. Hence, TFC-HPLC in quercetin supplement resulted to be less bioaccessible than in tissue matrices. These results may be due to different factors such as the bioaccessibility of flavonols depends on their chemical structure. In onion and apple, the main flavonols are β-glycosides of quercetin which are more bioaccessible than quercetin aglycone in the commercial supplement (Hollman et al. 1995). Other reason could be the poor solubility of quercetin aglycone in the digestive tract meanwhile TFC-HPLC are disperse in the onion and apple tissues making it more

bioaccessible (Wiczkowski et al. 2008). Hence, it seems that the different structures of flavonols could influence the rheological steady properties (K and $\eta_{a,10}$) of these matrices and could be used to predict the phenolic compounds bioaccessibility. Viscosity through the GID could be related to bioaccessibility of bioactive compounds such as phenolic compounds present in the different matrices studied (onion, apple and quercetin supplement), being the chemical structure of these bioactive compounds an important factor.

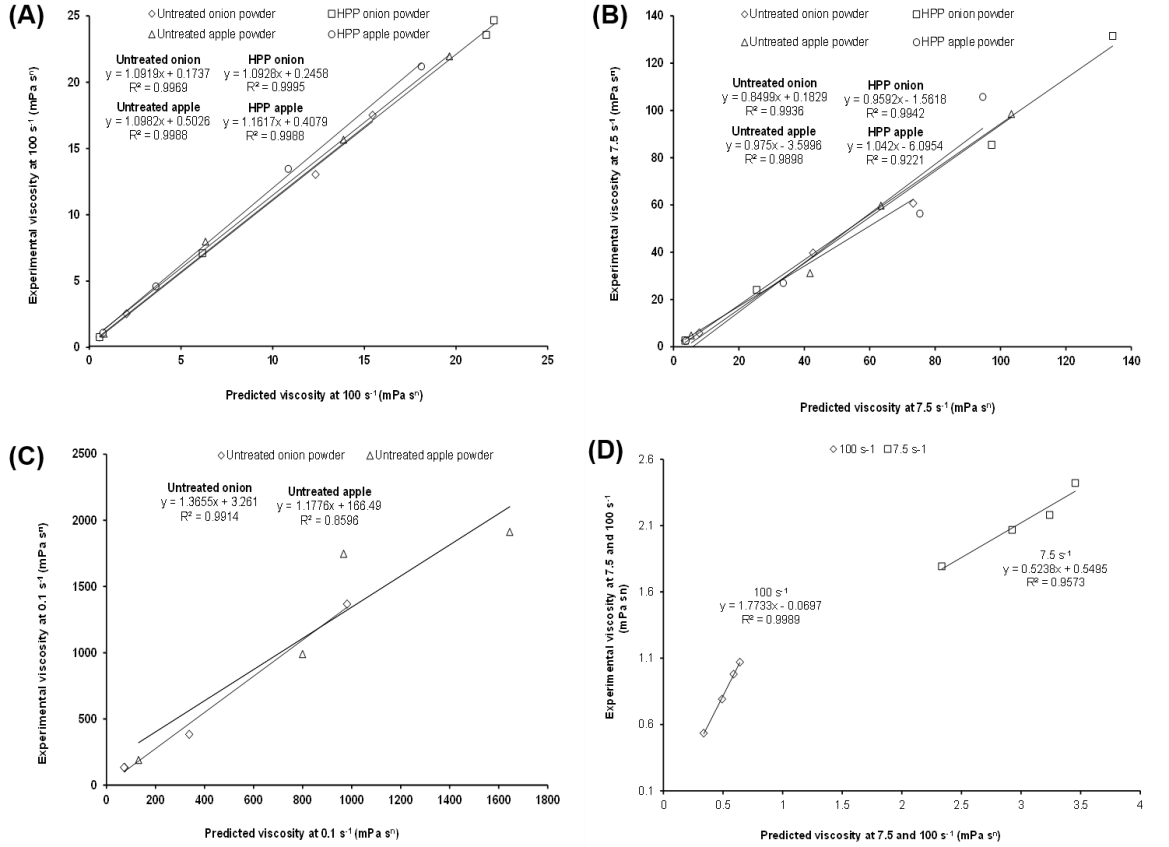


Fig. 4. Experimental viscosity at different shear rates vs. predicted values by power law models at the different *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) phases for (A) Untreated and HPP onion and apple powders at 100 s^{-1}, (B) Untreated and HPP onion and apple powders at 7.5 s^{-1}, (C) Untreated onion and apple powders at 0.1 s^{-1}, (D) Commercial quercetin supplement at 7.5 and 100 s^{-1}.

3.3.4. Predictive models for the apparent viscosity at each GID phase

According to Hardacre et al. (2016), physiological shear rate levels during *in vitro* intestinal digestion range from 0.1 to 10 s^{-1}. For all products tested, a prediction of the

587 change of the viscosity throughout *in vitro* GID tract can be done based on power law
588 models describing the evolution of viscosity as a function of shear rate. In this way,
589 viscosity power law model was applied to the average experimental data of the apparent
590 viscosity vs. shear rate (from 0.1 to 100 s^{-1}) before (ND) and throughout *in vitro* GID of
591 each product (Table S2). The lower the value of the power law index (*n*), the greater the
592 viscosity decreases with shear rate. The values of *n* ranged between 0.2 and 0.5,
593 corroborating previous findings in small ID (Shelat el at., 2015). For untreated samples, the
594 better fits after each GID phase corresponded to reconstituted apple powder, likely due to
595 its higher initial viscosity, whereas the worse fits corresponded to the more fluid extracts of
596 commercial onion quercetin powder. In addition, in both untreated and HPP onion and
597 apple products worse fits corresponded to GD and ID fractions, probably due to that lower
598 shear rates are needed for imitating peristalsis speed in these digestion stages. Kozu et al.
599 (2014) reported that the maximum shear rate in the liquid gastric contents was below 20 s^{-1}
600 at standard value of peristalsis speed in healthy adults (2.5 mm s^{-1}). Nevertheless, a lower
601 R^2 was also obtained for fitting the viscosity values of HPP apple sample after simulated
602 OP (Table S2).

603 Models fitted for the apparent viscosity at each phase were used for doing
604 predictions at 0.1, 7.5 and 100 s^{-1} shear rates. Very good linear correlations were found
605 between experimental values of untreated and HPP onion and apple samples at highest
606 shear rate (100 s^{-1}) and the values predicted by the power law models at each GID phase
607 (Fig. 4A). At 7.5 s^{-1}, the determination coefficients of the linear fits were higher for both
608 untreated and HPP-onion powders ($R^2 > 0.99$) than for apple ones (Fig. 4B). In turn, at the
609 lowest shear rate (0.1 s^{-1}), only high R^2 were established between experimental and
610 predicted values for both untreated onion and apple powders (Fig. 4C), especially for the
611 former. With regard to quercetin supplement, the Fig. 4D shows at the same time the linear

612 correlations found between experimental and predicted viscosity values at 7.5 and 100 s^{-1}
613 rates. No significant linear correlation was observed at the lowest rate (0.1 s^{-1}), and again,
614 the R^2 decreased with decreasing the shear rate tested. Models fitted proved to be adequate
615 for making predictions in the above mentioned shear rate range, although predictions
616 should be considered with caution in apple for lower shear rates (both 0.1 and 7.5 s^{-1}).

Table S2. Effects of *in vitro* gastrointestinal digestion (GID) and high-pressure processing (HPP) on power law model ($\eta_a = K\dot{\gamma}^{n-1}$) parameters for the different food matrices tested.

GID phase	Treatment	Onion powder			Apple powder			Quercetin supplement		
		K	*n*-1	R^2	*K*	*n*-1	R^2	*K*	*n*-1	R^2
Non-digested (ND)	Untreated	246	-0.601	0.9812	376	-0.641	0.9923	12.2	-0.658	0.8732
Oral-phase (OP)	Untreated	112	-0.479	0.9951	207	-0.587	0.9905	10.5	-0.746	0.9315
Gastric digest (GD)	Untreated	22.5	-0.522	0.9331	181	-0.728	0.9603	12.8	-0.650	0.8745
Intestinal digest (ID)	Untreated	14.2	-0.703	0.9496	23.9	-0.738	0.9786	11.7	-0.688	0.8973
Non-digested (ND)	HPP	547	-0.697	0.9903	342	-0.638	0.9861	-	-	-
Oral-phase (OP)	HPP	313	-0.580	0.9906	340	-0.748	0.9688	-	-	-
Gastric digest (GD)	HPP	76.6	-0.547	0.9753	189	-0.858	0.9797	-	-	-
Intestinal digest (ID)	HPP	15.1	-0.717	0.9479	13.6	-0.629	0.8963	-	-	-

Power law model parameters are given from fits for average curves (n = 6). η_a: apparent viscosity (mPa s); K: consistency coefficient (mPa s^n); $\dot{\gamma}$: shear rate (s^{-1}); n: flow behavior index; R^2 = determination coefficient.

617 **4. Conclusions**

618 HPP seemed to increase the extraction of total flavonol content (TFC-HPLC) and
619 total fenolic content (TPC-FC) in the non-digested apple and onion powder and also during
620 the *in vitro* GID of these products, but this effect did not result in a significant increase of
621 their bioaccessibilities. The bioaccessibility of TPC-FC in onions (89-95%) was higher
622 than in apples (81-85%). Also, TFC-HPLC bioaccessibility was higher in onions (17-18%)
623 than in the apples (9-12%) or in the quercetin supplement (0.028%). These results evidence

624 the importance of food matrix and the processing parameters applied on total phenolic
625 compounds and total flavonols bioaccessibility.

626 Fluorescence microscopy confirms that food matrices studied disintegrate
627 differently during *in vitro* GID and this parameter has a decisive influence on the
628 extractability of the phenolic compounds.

629 Regarding rheology, onion and apple (untreated and HPP) and quercetin
630 supplement showed non-Newtonian shear-thinning behavior with differences (in K and
631 $\eta_{a,10}$ values) among the flow curves of the different *in vitro* GID phases except for
632 quercetin supplement which were very close. The food matrix effect (onion *vs*. apple)
633 seems to be more relevant than HPP effect. In this way, apple showed the higher values of
634 K and $\eta_{a,10}$ in matrices non-treated because of the different chemical structure of their
635 flavonols and its content of pectin and starch. High correlations were found between
636 apparent viscosity experimental values of untreated and HPP onion and apple matrices at
637 the highest shear rate (100 s^{-1}) and the values predicted by the power law fits at each GID
638 phase.

639 Therefore, the change of viscosity throughout GID could predict the bioaccessibility of
640 TFC-HPLC in the different matrices studied (onion, apple and quercetin supplement),
641 which depends on their different chemical structure.

642

643 Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1018/j.ifset

644

645 **Conflict of interest statement**

646 Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study has been funded by the Spanish projects AGL2013-46326-R and AGL2016-76817-R (Ministry of Economy, Industry and Competitiveness).

References

Aguilera, Y., Martin-Cabrejas, M. A., & de Mejia, E. G. (2016). Phenolic compounds in fruits and beverages consumed as part of the Mediterranean diet: their role in prevention of chronic diseases. *Phytochemistry Reviews*, *15*(3), 405-423.

Barba, F.J., Esteve, M.J., & Frígola, A. (2012). High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *11*(3), 307-322.

Bohn, T. (2014). Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429-452.

Bonoli, M., Verardo, V., Marconi, E., & Caboni, M. F. (2004). Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: Comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, *52*(16), 5195-5200.

Bouayed, J., Hoffmann, L., & Bohn, T., (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry, 128*(1), 14-21.

Bouayed, J., Deuβer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessibility and dialysable poliphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry, 131*,1466-1472.

Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., &Maureira, H. (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, *128*(2), 520–529.

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(2), 155-171.

Cilla, A., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C., & Barberá, R. (2009). Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chemistry*, *114*(3), 813-820.

Erlund, I., (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetinnaringenin. Dietary sources, bioactivities, and epidemiology. *Nutrition Research*, *24*(10), 851-874.

Espinal-Ruiz, M., Restrepo-Sánchez, L.-P., Narvaez-Cuenca, C.-E., & McClements, D. J. (2016). Impact of pectin properties on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of citrus and banana passion fruit (Passifloratripartita var. mollissima) pectins. *Food Hydrocolloids*, *52*, 329–342.

Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B. (2017). Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonols and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. *Journal of Food Engineering*, *213*, 60-68.

Gonzalez, M. E., Barrett, D. M., McCarthy, M. J., Vergeldt, F. J., Gerkema, E., Matser, A. M., & Van As, H. (2010).^{1}H-NMR study of the impact of high pressure and thermal

processing on cell membrane integrity of onions. *Journal of Food Science*, *75*(7), E417–E425.
González-Peña, D., Colina-Coca, C., Char, C. D., Cano, M. P., De Ancos, B., & Sánchez-Moreno, C. (2013). Hyaluronidase inhibiting activity and radical scavenging potential of flavonols in processed onion. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, *61*(20), 4862-4872.
Guo, Y., & Bruno, R. S., (2015). Endogenous and exogenous mediators of quercetin bioavailability. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *26*(3), 201-210.
Hernández-Carrión, M., Sanz, T., Hernando, I., Llorca, E., Fiszman, S., & Quiles, A. (2015). New formulations of functional white sauces enriched with red sweet pepper. A rheological, microstructural and sensory study. *European Food Research & Technology*, *240*(6), 1187-1202.
Hollman, P. C. H., van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., de Vries, J. H. M., & Katan, M. B. (1997). Relative bioavaibility of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, *418*, 152-156.
Hollman, P. C. H., de Vries J.H.M., van Leeuwen, S.D., Mengelers, M.J.B., & Datan, M.B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ilestomy volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, *62*(6), 1276-1282.
Huang, D., Ou, B., & Prior, R. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841-1856.
Kamiloglu, S., Capanoglu, E., Bilen, F. D., Gonzales, G. B., Grootaert, C., Van de Wiele, T., & Van Camp, J. (2016). Bioaccessibility of polyphenols from plant-processing byproducts of black carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(12), 2450-58.
Kozu, H., Kobayashi, I., Neves, M. A., Nakajima, M., Uemura, K., Sato, S., & Ichikawa, S. (2014). PIV and CFD studies on analyzingintragastric flow phenomena induced by peristalsis using a human gastric flow simulator. *Food & Function*, *5*, 1839–1847.
Lee, J., & Mitchell, A. E. (2012). Pharmacokinetics of quercetin absorption from apples and onions in healthy humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(15), 3874-3881.
Lewandowska, H., Kalinowska, M., Lewandowski, W., Stępkowski, T. M., & Brzóska, K. (2016). The role of natural polyphenols in cell signaling and cytoprotection against cancer development. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *32*, 1-19.
Liu, R. H. (2013). Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, *78*(S1), A18-A25.
Morell, P., Hernando, I., Llorca, E., & Fiszman, S. (2015). Yogurts with an increased protein content and physically modified starch: rheological, structural, oral digestion and sensory properties related to enhanced satiating capacity. *Food Research International*, *70*, 64–73.
Pal, R. (2011). Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, *16*(1), 41-60.
Pawlikowska–Pawlega, B., Gruszecki, W.I., Misiak, L., Paduch, R., Piersiak, T., Zarzyka, B., Pawelec, J., Gawron, A. (2007). Modification of membranes by quercetin, a naturally occurring flavonoid, via its incorporation in the polar head group. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1768*, 2195-2204.
Plaza, L., Colina, C., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., & Cano, M.P. (2012). Influence of ripening and astringency on carotenoid content of high-pressure treated persimmon fruit (*Diospyros kaki* L.). *Food Chemistry*, *130*, 591-597.

741 Rodríguez-Roque, M. J., De Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez- Martínez,
742 P., & Martín-Belloso, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro
743 bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant
744 activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, *14*, 33-43.
745 Rodríguez-Roque, M. J., Rojas-Graü, M.A., Elez- Martínez, P., & Martín-Belloso, O.
746 (2013). Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout *in vitro*
747 gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agicultural and Food*
748 *Chemistry*, 61, 1859-1867.
749 Roldán-Marín, E., De Ancos, B., Cano, M. P., & Sánchez-Moreno, C. (2012). Onion
750 bioactive compounds and health effects. In C.B. Aguirre, L.M. Jaramillo (Eds.),
751 *Onion Consumption and Health* (pp. 121-144). Hauppauge, Nueva York: Nova
752 Science Publishers, Inc.
753 Shelat, K. J., Nicholson, T., Flanagan, B. M., Zhang, D., Williams, B. A., & Gigley, M. J.
754 (2015). Rheology and microstructure characterisation of small intestinal digesta from
755 pigs fed a red meat-containing Western-style diet. *Food Hydrocolloids*, *44*, 300-308.
756 Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Betolini, D, & Conte, A. (2010). *In vitro* bioaccessibility
757 and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, *120*(2), 559-606.
758 Tomé-Carneiro, J., & Visioli, F. (2016). Polyphenol-based nutraceuticals for the
759 prevention and treatment of cardiovascular disease: Review of human evidence.
760 *Phytomedine*, *23*(11), 1145-1174.
761 US FDA. (2000). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing
762 technologies-high pressure processing. Available at
763 http://vm.cfsan.fda.gov/wcomm/ift-hpp.html
764 Vallons, K. J. R., Ryan, L. A. M., & Arendt, E. K. (2014). Pressure-induced gelatinization of
765 starch in excess water. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(3), 399–
766 409.
767 Vázquez-Gutiérrez, J. L., Hernández-Carrión, M., Quiles, A., & Hernando, I. (2014).
768 Influence of storage at 4 °C on the stability of high hydrostatic pressure treated onion.
769 *Czech Journal of Food Sciences*, *32*(1), 96-101.
770 Vázquez-Gutiérrez, J. L., Plaza, L., Hernando, I., Sánchez-Moreno, C., Quiles, A., De Ancos,
771 B., & Cano, M. P. (2013). Changes in the structure and antioxidant properties of
772 onions by high pressure treatment. *Food & Function*, *4*, 586-591.
773 Villemejane, C., Denis, A., Marsset-Baglieri, A., Alric, M., Aymard, P., & Michon, C.
774 (2016). *In vitro* digestion of short-dough biscuits enriched in proteins and/or fibre
775 using a multi-compartmental and dynamic system (2): Protein and starch hydrolyses.
776 *Food Chemistry*, *190*, 164-172.
777 Wiczkowski, W., Romaszko, J, Bucinski, A., Szawara-Nowak, D., Honke, J., Zielinski, H., &
778 Piskula, M.K. (2008). Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. aggregatum) is
779 more bioavailable than its glucosides. *The Journal of Nutrition, 138*(5), 885-888.
780 Williams, D. J., Edwards, D., Hamerning, I., Jian, L., James, A. P., Johnson, S. K., &
781 Tapsell, L. C. (2013). Vegetables containing phytochemicals with potential anti-
782 obesity properties: A review. *Food Research International*, *52*(1), 323-333.

Artículo 5:

Effect of high-pressure processed onion and apple on human gut microbiota, phenolic metabolites and short chain fatty acids during a dynamic *in vitro* colonic fermentation

Irene Fernández-Jalao, Claudia Balderas, Mariví Calvo, Javier Fontecha, Concepción Sánchez-Moreno, Begoña De Ancos

Preparado para enviar a Metabolites

Effect of high-pressure processed apple and onion on human gut microbiota, phenolic metabolites and short chain fatty acids during a dynamic *in vitro* colonic fermentation

Irene Fernández-Jalao[a], Claudia Balderas[a], Mariví Calvo[b], Javier Fontecha[b], Concepción Sánchez-Moreno[a], Begoña De Ancos[a*]

[a]Department of Characterization, Quality and Safety, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC), Madrid, 28040, Spain

[b]Department of Bioactivity and Food Analysis, Institute of Food Science Research (CSIC-UAM), Madrid, 28049, Spain

* Corresponding author. Tel.: +34 915492300.

E-mail addresses: ancos@ictan.csic.es (B. De Ancos).

ABSTRACT: The effects of gastrointestinal digested high-pressure processed (HPP) apple and onion ingredients on microbiota and their metabolic activity in the human gut were investigated during a chronic intake of 14 days by using a dynamic *in vitro* simulator of the human large intestinal ecosystem, by analysing the phenolic compounds and their metabolites, short chain fatty acids and the bacterial population. A great percentage of initial phenolic compounds were found in the ascending colon of both ingredients but only for the HPP-treated apple some phenolic compounds were identified in the transverse and descending colon. Feeding the model with HPP-treated apple and HPP-treated onion favored the growth of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp., the increase in the production of acetic, propionic and butyric acids and the transformation of phenolic compounds in their metabolites such as phenolic acids, phenylpropionic acids, phenylacetic acids, benzoic acids and simple phenols, although significant differences were observed between the two ingredients. In the HPP-treated apple was remarkable the content of caffeic acid, quinic acid, 3-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid, 4-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid and some phenylpropionic acids derivatives such as 3,4-dihydroxyphenylpropionic, 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic acid and 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acids, meanwhile the major metabolites found in the HPP-treated onion were the phenylacetic acids derivatives such as 3-hydroxyphenylacetic acid and 4-hydroxyphenylacetic acid.

Keywords: *In vitro* fermentation; High-pressure processing; apple phenolic metabolites; onion phenolic metabolites; intestinal bacterial groups; short chain fatty acids

1. Introduction

The apple (*Malus domestica* Borkh.) is one of the most consumed fruit due to it is available worldwide all year round (Sinha, 2012; USDA, 2019) and represent a significant source of dietary bioactive compounds (Bouayed, Deusser, Hoffmann, & Bohn, 2012; Briones-Labarca, Venegas-Cubillos, Ortiz-Portilla, Chacana-Ojeda, & Maureira, 2011).The dietary compounds of apples have been associated with lower risk of cardiovascular diseases (Bondonno, Bondonno, Ward, Hodgson, & Croft, 2017), cancer and diabetes prevention and weight loss contribution, among others (Boyer & Liu, 2004; Tu, Chen, & Ho, 2017).

Onions (*Allium cepa* L.) are the second main crop grown all over the world after tomatoes with a current production estimated in 96.77 million tons (FAOSTAT, 2018). Onions are a versatile vegetable that could be consumed raw (peeled, sliced or diced) or processed (roasted, boiled, dried or fried). Onions are now available in fresh, frozen, canned, caramelized, pickled, powdered, and dehydrated forms and it is considered a basic ingredient of worldwide major diets (Teshika, et al., 2019). Onions not only provide flavour, they also are an important source of nutrients and bioactive compounds such as phenolic and organosulfur compounds, and their consumption has long been associated with health-promoting properties including antimicrobial, antibiotic, antioxidant, analgesic, antiplatelet, antitrombotic, antiinflammatory, antidiabetic, anticarcinogenic, hypolipidemic, antihypertensive, and inmunoprotective effects (Griffiths, Trueman, Crowther, Thomas, & Smith, 2002; Teshika, et al., 2019).

The health-protecting effects of apple and onion consumption have been extensively related with their phenolic composition and antioxidant characteristics

(Briones-Labarca, et al., 2011; Serra, Macia, Romero, Reguant, Ortega, & Motilva, 2012). Phenolic compounds are considered important bioactive compounds found in significant amounts in plants, especially fruits and vegetables. These compounds can be classified into two main families, phenolic acids and flavonoids. Phenolic acids present in plant foods are usually linked by ester, ether or acetal bonds to other natural components such as cellulose, proteins, flavonoids, glucose, quinic acid, maleic acid, tartaric acid or terpenes (Vinholes, Silva, & Silva, 2015). Flavonoids are constituted by different subgroups: flavonols, flavan-3-ols, flavanones, flavones, anthocyanins, isoflavones and chalcones. In addition, flavonoids can be found as polymerized forms or conjugated with sugar or organic acids.

Apple (*Malus domestica)* and onion (*Allium cepa*) are known as the main dietary sources of the flavonol quercetin (Q). In plant derived foods, quercetin is usually bound to different glycosides. In apple, quercetin may appear linked to different types of sugars (galactose, glucose, rhamnose, xylose, arabinose) (Bondonno, et al., 2017). In the case of onion, quercetin is linked to glucose in form of monoglucosides such as Q-4'-glucoside, diglucosides such as Q-3,4'-diglucoside and triglucosides such as Q-3,7',4'-triglucoside (Slimestad, Fossen, & Vagen, 2007). The beneficial properties of quercetin are closely related to its chemical structure that gives it a great antioxidant power to act against reactive oxygen species, free radical even to inhibit pro-oxidant enzymes (lipoxygenase, xanthine oxidase, NADPH oxidase) (Wang, et al., 2016). Moreover, quercetin has shown cardioprotective effects related to its antiinflammatory activity, inhibition of LDL oxidation, reduction of adhesion molecules, platelet antiaggregating effect and vasodilator effect (Patel, Mistry, Shinde, Syed, Singh, & Shin, 2018; Pérez, et al., 2014). Apples also contain other phenolic compounds such as flavan-3-ols monomers (mainly epicatechin) and oligomers (procyanidin-B2), hydroxycinnamic acids (mainly chlorogenic acid) and also an appreciable amount of dihydrochalcones (phloridzin and a glycosylated derivative,

phloretin-2'-xyloglucoside). These compounds have been evaluated in several studies due to its antioxidant, antiinflammatory, cardioprotective, anticarcinogenic and neuroprotective properties (Boyer, et al., 2004; Tu, et al., 2017).

However, in order to exert the biological functions of phenolic compounds, they must be first released from food matrix during the gastrointestinal digestion and become available for further intestinal absorption (bioaccessibility) and later, reach the target organ or systemic circulation (bioavailability). Absorption and metabolism of phenolic compounds are determined by different factors such as their physicochemical properties (molecular size, chemical structure, degree of polymerization or glycosylation, solubility and conjugation with other phenolics) (Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frigola, 2014), the food matrix composition where they are immerse and the possible interactions of phenolic compounds with others food components present in the diet (carbohydrates, lipids, proteins, fibre, etc.) (Jakobek, 2015). It has been shown that food processing can induce chemical or physical changes in food matrix components that could affect the bioaccessibility of phenolic compounds. Novel processing technologies (high-pressure processing (HPP), pulsed electric fields and ultrasounds) have emerged in last years as alternatives to thermal processing and as strategies to improve the nutritional properties of foods without losing sight of their microbial safety (Ribas-Agusti, Martín-Belloso, Soliva-Fortuny, & Elez-Martínez, 2018). High-pressure processing (HPP) has been considered as a useful technology to control the microbial growth and enzymes related to food quality as well as preserving the nutritional and sensorial food properties and thus attend to the demand of consumers of high quality products with natural taste and appearance and minimally processed (Rastogi, Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjan, & Knorr, 2007). HPP promotes desirables changes in the texture and structure of food components and consequently, can be used to obtain new products or to increase the

functionality of some ingredients. The application of high-pressure at certain levels induces the breakage of cellular structures allowing the release of phenolic compounds into the extracellular space and therefore changes in their bioaccessibility (Ribas-Agusti, et al., 2018).

Despite the strategies used to improve the bioaccessibility of phenolic compounds, many of them reach the colon intact where it undergoes an extensive metabolism by the gut microbiota (Ozdal, Sela, Xiao, Boyacioglu, Chen, & Capanoglu, 2016). Human gut microbiota is a large and complex microbial community composed by about 160 species with a key role in the human metabolism of polysaccharides, phenolic compounds and vitamins (Rinninella, et al., 2019). The microbial metabolism of phenolic compounds in the colon include several phases. Firstly, phenolic compounds bounds to sugars or organic acids are deconjugated into its corresponding aglycones by the action of microbiota enzymes, α-ramnosidases, β-glucosidases and β-glucuronidases (Aura, 2008), and polymeric phenolic compounds are degraded into monomers (Serra, Macia, Romero, Angles, Morello, & Motilva, 2011). Then, flavonoids aglycones and phenolic acids undergo different transformation including C-ring breakdown, α-oxidation, β-oxidation, dehydrogenation, demetilation and dehydroxylation (Mosele, Macia, & Motilva, 2015). All of these transformations generate a wide range of phenolic metabolites which are structurally different from its parents compounds (Mosele, et al., 2015; Selma, Espín, & Tomás-Barberán, 2009). Some intermediate phenolic metabolites such as phenylvalerolactones and phenylvaleric acids are characteristics of flavan-3-ols metabolism. Meanwhile, final metabolic products such as different hydroxylated forms of phenylpropionic, phenylacetic and benzoic acis are common among different phenolic compounds families pathways (Mosele, et al., 2015; Ozdal, et al., 2016). Microbial phenolic metabolites have shown several physiological properties that could be related

with the biological activity and health effects of the corresponding phenolic compound precursors (Monagas, et al., 2010). As example, quercetin colonic metabolites such as homovanillic acid (3-methoxy-4-hydroxyphenyl acetic), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid have shown an antioxidant activity even higher than other antioxidant compounds such as α-tocopherol (Dueñas, Surco-Laos, González-Manzano, González-Paramas, & Santos-Buelga, 2011). 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid (dihydrocaffeic acid), 3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-propionic acid (hydroferulic acid) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid have been investigated by its important antiinflammatory effects *in vivo* and *in vitro* (Larrosa, et al., 2009). Also, 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid) has demonstrated *in vitro* and *in vivo* properties against carcinogenesis, cardiovascular and neurodegenerative diseases (Krzysztoforska, Mirowska-Guzel, & Widy-Tyszkiewicz, 2019; Williamson & Clifford, 2010).

On the other hand, non-absorbed phenolic compounds and their metabolites may contribute to intestinal health by modulation of microbiota composition through selective prebiotic effects and antimicrobial activities against pathogenic bacteria (Ozdal, et al., 2016). However, the mechanisms by which phenolic compounds modulate the gut microbiota still remain unclear. Some studies have revealed that metabolites derived from phenolic compounds (purees or food constituents) stimulated the proliferation of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. and decreased that of *Clostridium* spp. (Parkar, Trower, & Stevenson, 2013; Tzounis, Rodríguez-Mateos, Vulevic, Gibson, Kwik-Uribe, & Spencer, 2011). A balanced microbiota composition is related with maintaining health meanwhile the imbalance also called dysbiosis is related with some health disorders such as intestinal bowel disease, irritable bowel syndrome, colorectal cancer, obesity, diabetes, metabolic syndrome, cardiovascular disease among others (Espín, González-

Sarrias, & Tomás-Barberán, 2017). The intake of phenolic-rich sources has been proposed as strategy to prevent or instead to reverse the dysbiosis associated with different pathologies (Singh, et al., 2019).

Moreover, several authors have pointed out that colonic fermentation of phenolic compounds could be also related with the increase of short chain fatty acids (SCFAs) (Koutsos, et al., 2017, Parkar, et al., 2013). The main SCFAs are acetic, butyric and propionic acids and are obtained from non-assimilated dietary compounds fermentation (carbohydrates and fibre) (Schloissnig, et al., 2013). Butyric acid, is essential for maintining colon cellular functions since it is considered the main energy source of colonocites. Also SCFAs can contribute to several metabolic pathways such as lipogenesis (acetic acid) and gluconeogenesis (propionic acid) in several tissues as liver (Cani, Van Hul, Lefort, Depommier, Rastelli, & Everard, 2019). Also, butyric acid has been evaluated by its capacity to prevent the formation of malignant cells and to induce apoptosis in colonic cancer cells (Waldecker, Kautenburger, Daumann, Busch, & Schrenk, 2008). The relationship between the phenolic compounds metabolites and SCFAs production could be associated with a possible modulation effect on carbohydrate-fermented bacteria growth (Mosele, et al., 2015). The health promoting effect of phenolic compound and its microbial metabolites could be reflected in the modulation of beneficial bacteria and its metabolic activity through the increase in the SCFAs production.

Because of *in vivo* studies implies often a high cost and long time, *in vitro* studies have been widely used in order to evaluate the formation of metabolites from phenolic compounds and its effect on gut microbiota (Alminger, et al., 2014). *In vitro* models range from simple batch cultures to highly complex models such as dynamic multistages models designed to reproduce both the gastrointestinal digestion and the colonic fermentation process (Payne, Zihler, Chassard, & Lacroix, 2012). Dynamic multistages fermentation

models are designed to simulate the biochemical (pH changes, temperature, anaerobic conditions) and mechanical conditions (peristaltic movements, retention time, digested transit) of the whole digestion and fermentation process, as well as the metabolic conditions (microbial growth rate and substrate availability) in the different colon regions (ascending, transverse and descending colon) (Verhoeckx, et al., 2015). These models have been applied in several phenolic gut metabolism studies (Cueva, et al., 2015; Ekbatan, et al., 2016; Sánchez-Patán, et al., 2015).

The aim of the current study was to evaluate the effects of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients on human microbiota and their metabolic activity in the gut by analysing the phenolic compounds and their metabolites, the formation of short chain fatty acids and the bacterial population in the different colon regions (ascending, transverse and descending colon). A dynamic *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation model developed in AINIA Technologic Center (Valencia, Spain) was employed.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Methanol and acetonitrile (HPLC-grade) were purchased from Lab-Scan (Dublín, Ireland). Methanol LC/MS grade was acquired from J.T. Baker (The Netherlands). Formic acid, potassium phosphate monobasic, sodium hydroxide, sulphuric acid 96%, ethanol 70%, ethanol 96% and hydrogen peroxide 33% were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). DL-Dithiothreitol, Tween-20, polyvinylpolypyrrolidone, 4-methylcatechol and *p*-phenylenediamine were from Sigma Aldrich (St Louis, Missouri, USA). 3-hydroxyphenylacetic, 4-hydroxyphenylacetic, 3-hydroxy-4-methoxyphenylacetic, 3,4-dihydroxyphenylacetic, 3-hydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, 3,4-dihydroxybenzoic, 3,4-

dihydrohydroxycinnamic, 3-(3-hidroxyphenyl)-propionic, 3-(4-hidroxyphenyl)-propionic acids, phloroglucinol, quercetin-3-glucoside, quercetin-3,4'-diglucoside, isorhamnetin-3-glucoside, quercetin-3-galactoside, phoridzin, phloretin, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, procyanidin-B2, (+)-catechin, (-)-epicatechin, caffeic acid, benzoic acid, catechol, vanillic acid, ferulic acid, gallic acid, acetate, citrate, malate, fumaric acid and sodium pyruvate were acquired from Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). D-(+)-glucose, D-(-)-fructose and sacarose were supplied from Merck (Darmstadt, Germany). Pepsin (from gastric mucose, P-7012), pancreatin (porcine pancreas, P-7012) and bile (porcine bile extract) were supplied from Sigma (St. Louis, Missouri, USA).

Hexane (HPLC-grade), dichloromethane, sulphuric acid (98%) and N, N-dimethylformamide were from Lab-Scan (Dublin, Ireland). Sodium bicarbonate (99%), sodium methoxide (95%), fatty acids (C7:0, C8:0, C9:0 y C13:0) were from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). Commercial standards of C2:0, C3:0, C4:0 and C5:0 fatty acids were acquired from Applied Science Laboratories Inc. (State College, Pennsylvania, USA).

2.2. Raw material

Apples (*Malus domestica* Borkh., 'Golden Delicious') from Aragon (Spain) and onions (*Allium cepa* L. var. *cepa*, 'Recas') from Carabaña (Madrid, Spain) were purchased from a local supermarket located in Madrid. Both were stored at 4ºC until its processing.

Apples were washed and cut into small pieces of about 2 cm with skin and without core and packaged (200 g) into low permeability plastic bags and sealed with light vacuum. For onions, external layers were removed and bulbs were cut into 10 mm cubes, packaged (200 g) in low permeability plastic bags (BB4L, Cryovac, Barcelona, Spain) and sealed with light vacuum. Two batches of apple slices and onion cubes were separated. One batch of each product corresponds to untreated samples and the other group was

230 treated by high-pressure processing (HPP). Untreated apples and onions bags were
231 immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80 ºC until lyophilisation (100
232 mTorr, -90 ºC) using a lyophilizator model Lyoalfa (Telstar, Barcelona, Spain).
233 Lyophilized samples were pulverized in an ultracentrifugal grinder ZM 200 (Retsch
234 GmbH, Haan, Germany) to obtain a fine powder (particle size ≤ 0.5 mm) and maintained at
235 -20 ºC.

236 **2.3. High-pressure processing (HPP)**

237 Apples were processed at 400 MPa for 5 min and a maximum temperature of 35 ºC
238 and onions were treated at 400 MPa for 5 min and 25 ºC. This treatments conditions were
239 selected according to previous published studies (Fernández-Jalao, Sánchez-Moreno, & De
240 Ancos, 2019; González-Peña, Colina-Coca, Char, Cano, de Ancos, & Sánchez-Moreno,
241 2013). The hydrostatic pressure unit was formed by a vessel of 1925 mL capacity and it
242 was able to work to a maximum pressure of 800 MPa and a maximum temperature of 70
243 ºC (High Pressure Iso-Lab System, Model FPG7100:9/2C, Stansted Fluid Power LTD.,
244 Essex, UK). Two bags of packaged apples or onions were placed into the vessel unit filled
245 with water as a pressure-transmitting medium. The compression and decompression rates
246 were both 3 MPa/s. Because of adiabatic compression, the maximum temperature in the
247 vessel was 35 ºC for apple and 25 ºC for onion at 400 MPa. Pressure, time and temperature
248 were controlled by a computer program, being constantly monitored and recorded during
249 the process.

250 HPP-treated apple and HPP-treated onion samples were immediately frozen with
251 liquid nitrogen and stored at -80 ºC until its lyophilisation and pulverization as indicated
252 above.

253

2.4. Characterization of HPP-treated apple and onion ingredients

2.4.1. pH and acidity

These determinations were carried out as described previously by Plaza, Colina, de Ancos, Sánchez-Moreno, and Cano (2012) using 1.5 g of lyophilized and pulverized samples. The results were expressed as percentage of malic acid per 100 g of dry weight (g of malic acid/100 g of dw) for apple and as percentage of citric acid per 100 g of dry weight (g of citric acid/ 100 g of dw) for onion.

2.4.2. Ascorbic acid and total vitamin C

The extraction and HPLC analysis of ascorbic acid and total vitamin C determined by reduction of dehydroascorbic acid to ascorbic acid using DL-dithiothreitol as reducing reagent, was done using a method previously described by Vázquez-Gutiérrez, et al. (2013). Quantification was performed using calibrated curves of ascorbic acid in the range of 1.6 to 100 µg/mL. The results were expressed as mg of ascorbic acid per 100 g of dry weight (mg AA/100 g dw).

2.4.3. Total pectin content

Pectin content (%) was determined according to Canteri-Schemin, Fertonani, Waszczynskyj, and Wosiacki (2005) from 2 g of lyophilized untreated and HPP-treated samples. The degree of esterification (DE) (%) of pectin was determined by titrimetric method described by Liew, Chin, Yusof, and Sowndhararajan (2016) with some modifications.

2.4.4. Soluble, insoluble and total fibre

The determination of soluble, insoluble and total fibre was performed using an enzymatic-gravimetric method according to an official method for the determination of fibre in food (AOAC, 2012).

278 *2.4.5. Sugars and organic acids analysis*

279 0.1 g of lyophilized untreated and HPP-treated samples were analysed for organic
280 acids and sugars content using ionic chromatography according to the methodology
281 described by Colina-Coca, Rodríguez-Alcalá, Fontecha, González-Peña, de Ancos, and
282 Sánchez-Moreno (2014). Results were expressed as grams per 100 g of dry weight (g/100
283 g dw).

284 *2.4.6. Protein determination*

285 Soluble proteins were analysed in the enzymatic extract according to BioRad assay
286 based on Bradford (1976), measuring optical density (OD) at 595 nm with bovine albumin
287 as a standard.

288 **2.5. Dynamic *in vitro* colonic fermentation**

289 A dynamic *in vitro* model system able to simulate the complete digestion process,
290 i.e. gastrointestinal digestion-colonic fermentation (GID-CF), located in the AINIA
291 Technologic Center (Valencia, Spain), was employed. This system consisted in five
292 reactors to simulate the physiological conditions taking place during digestion in the
293 stomach, small intestine and ascending (AC), transverse (TC) and descending colon (DC).
294 These colon reactors were connected to each other by a continuous flow and the whole
295 process was computer-controlled (Fig. 1). The conditions of the colon fermentation process
296 were determined based to those reported by others (Cueva, et al., 2015; Juaniz, et al., 2016;
297 Marzorati, et al., 2010; Van de Wiele, et al., 2007). Prior to the inoculation with human
298 faecal samples, the three colon reactors were filled with the growth medium for the
299 microbial inoculum composed by a carbohydrate-based medium containing,
300 arabinogalactan (1.0 g/L), pectin (2 g/L), glucose (0.4 g/L), xylan (1 g/L), starch (4.0 g/L),
301 yeast extract (3 g/L), peptone (1 g/L), mucin (4 g/L), L-cysteine (0.5 g/L) and Tween 80.

Also, these growth medium presented salts ($NaHCO_3$, NaCl, K_2HPO_4, KH_2PO_4, $CaCl_2$, and $MgSO_4$), oligoelements ($MnSO_4$, $FeSO_4$, $CoSO_4$, $ZnSO_4$) and vitamins. This nutritive culture medium was autoclaved and bubbled with nitrogen to eliminate occluded oxygen before be placed in the system and the pH medium of each reactor was adjusted and controlled. The optimum bacterial working pH was set at 5.5-6 for ascending colon, 6-6.4 for transverse colon and 6.4-6.8 for descending colon. The reactors were inoculated with faecal slurry (20 %, w/v) from healthy adult volunteers that maintained a normal diet, none of whom had received any antibiotic treatment in the previous three months or had serious metabolic or gastrointestinal disorders. The headspace of the colon vessels was flushed every day for 15 min with N_2 to ensure the anaerobic conditions.

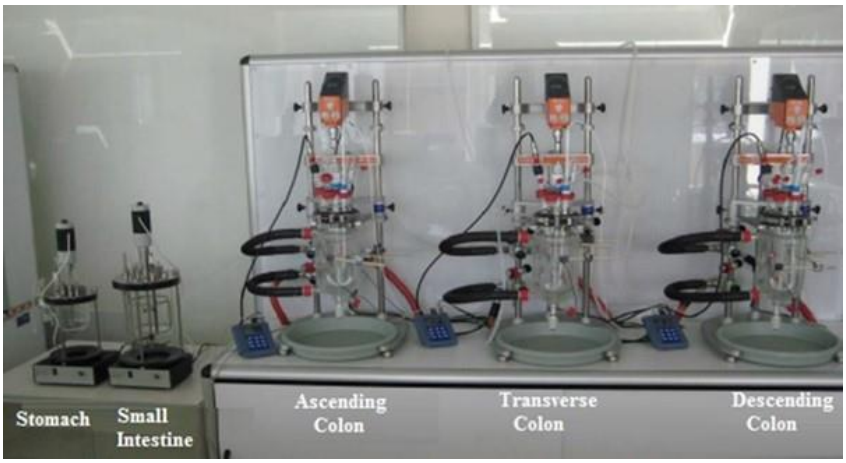


Figure 1: Dynamic *in vitro* model system to simulate the whole digestion process, gastrointestinal digestion and colonic fermentation (GID-CF) located in AINIA (Valencia, Spain).

The experimental protocol consisted in two phases. An initial stabilization period (basal) of 12 days to allow the intestinal microbiota to adapt to the nutritional and physicochemical conditions present in the three colon vessels (AC, TC and DC). During this period, 200 mL of nutritive medium were added three times a day to the stomach reactor to feed the system (Fig. 2). The second phase was the treatment period that consists in feeding the system with adding 27 g or 37.5 g of HPP-treated onion and HPP-treated

318 apple ingredients, respectively, together to 200 mL of nutritive medium to the stomach
319 vessel once a day during 14 days simulating a chronic intake. In addition, the system was
320 feed twice a day only with nutrient medium.

321 Previously to colon fermentation, the samples were submitted to a gastrointestinal
322 digestion according to the procedure described by Fernández-Jalao, Sánchez-Moreno, and
323 De Ancos (2017). Thus, a gastric solution with pepsin was also incorporated to the
324 stomach compartment. After two hours the gastric digest was transfer to the intestinal
325 compartment using a discontinuous flow. Pancreatic solution and bile acids were added to
326 the small intestine with a flow of 0.5 mL/min. The pH in the stomach and small intestine
327 was adjusted with HCl 1M or sodium bicarbonate, respectively. Once the intestinal
328 digestion process was finished (6 h) the intestinal digest was incorporated to the ascending
329 colon. This incorporation was repeated three times in the day. The volume and transit time
330 of each compartment simulate the residence time *in vivo* and were the following: 260 mL
331 and 2 h in the stomach, 460 mL and 6 h in the small intestine, 1000 mL and 20 h in the
332 ascending colon, 1600 mL and 32 h in the transverse colon and 1200 mL and 24 h in the
333 descending colon (Fig. 2). The whole transit time to mimic the bacterial colonization of the
334 colon was 3.5 days according to Cummings, Macfarlange, and Drasarb (1989), De Boever,
335 Deplancke, and Verstraete (2000) and Kontula, et al. (1998). The transit of colonic content
336 between the AC, TC and DC was operated using a continuous flow. The reactors were
337 continuously flushing with nitrogen (to simulate anaerobic conditions), maintained at 37
338 ºC, in darkness and stirred at 150 rpm.

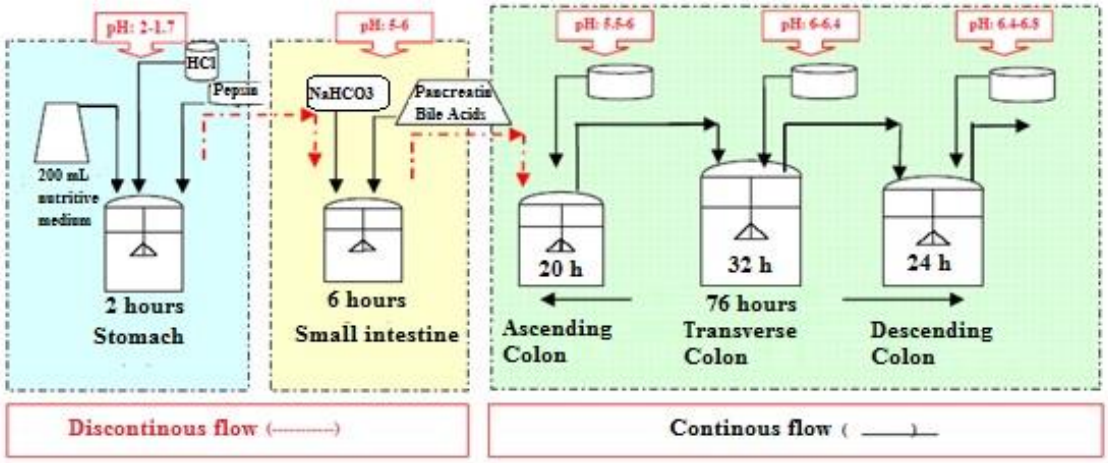


Figure 2: Experimental conditions of the simulate gastrointestinal digestion and colonic fermentation in a dynamic model digester (located in AINIA, Valencia, Spain).

For the study of metabolic activity of intestinal microbiota (phenolic metabolites and short-chain fatty acid analysis), samples of 50 g of the three colon vessels (AC, TC and DC) were collected every day during 14 days of intake period. These samples were inmediatly frozen and stored at -20 ºC in darkness until they were transported from AINIA to ICTAN under controled freezing conditions. At arrival, they were inmediately stored at -80 ºC during one week and then subjected to lyophilisation (Lyophilizator model Lyoalfa, Telstar S.A, Barcelona, Spain). The lyophilized samples were homogenized manually with a domestic grinder and stored at -20 ºC until analysis.

2.6. Analysis of phenolic compounds and metabolites by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS

2.6.1. Extraction of undigested HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients

The extraction of phenolic compounds of the undigested HPP-treated apple and HPP-treated onion powder were carried out according to the procedure described in Fernández-Jalao, et al. (2017). Briefly, 1 g of HPP-treated apple or 0.5 g of HPP-treated

onion were mixed with 12.5 mL of extraction solvent (methanol/water, 80:20, v/v) and homogenizer using an ultrahomogenizer at 8000 rpm for 4.5 min (model ES-270, Omni International Inc., Gainesville, VA, USA). The mixtures were centrifuged (8000 g, 4 ºC, 15 min) using a refrigerated centrifuge (Thermo Scientific Sorvall, mod. Evolution RC, Thermo Fischer Scientific Inc., USA). The pellet was re-extracted with 12.5 mL of extraction solvent and centrifuged again. Finally, the two supernatants were combined, evaporated at 40 ºC using a vacuum evaporator, reconstituted with 10 mL of methanol and stored at -20 ºC until analysis by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS.

2.6.2. Extraction of colonic fermentation products

For the extraction of phenolic compounds and metabolites from the colonic fermentation products (ascending, transverse and descending colon), 25 mg of lyophilized samples were mixed with 1.5 mL of methanol/acidified water (0.1 % formic acid) (80:20 v/v). The mixtures were vortex 1 min, sonicated 5 min and centrifuged at 11400 *g* (Thermo Scientific Sorvall, mod. Evolution RC, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) for 15 min at 4 ºC. The supernatants were separated and centrifuged twice more in the same conditions. The final supernatant (1 mL) was diluted with 2 ml of ultrapure water [or 2 mL of methanol/water, 80:20 (v/v) for detection and quantification of quercetin aglycone]. The extraction was done in triplicate. The extracts were filtered through a 0.22 µm filter before to their analysis by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS.

2.6.3. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS analysis of phenolic compounds and metabolites. Metabolomic study by a targeted analysis.

The separation, identification and quantitation of phenolic compounds and its metabolites was achieved by the injection of 10 µL of the samples into an Agilent 1200 series high pressure liquid chromatography system coupled to mass quadrupole time-of-

flight spectrometer with an electrospray ionization source (ESI) via Jet Stream Technology (Agilent G6530A Accurate Mass Q-TOF MS/MS). HPLC system was equipped with a quaternary pump (G1311A) with an integrated degasser (G1322A), thermostated automatic injector (G1367B), thermostated column module (G1316A) and a diode detector array (DAD) (G1315B) (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Separation was carried out on a 2.0 x 50 mm id., 3.0 μm particle size, Luna C18 column (Phenomenex, Torrance, CA, USA). The mobile phase consisted of a linear gradient of 0.1% formic acid in Milli-Q-water (A) and acetonitrile (B) as follows: 0 min, 95% A; 15 min, 80% A; 25 min, 50% A; 30 min, 20% A; 40 min, 95% A. The flow rate was fixed at 0.4 mL/min and the injection volume was 10 μL. Runs were monitored at 360 nm, 320 nm and 280 nm.

To identify the phenolic compounds precursors and all its possible metabolites, total ion spectra were collected in the range m/z: 100–1000 in negative mode. Nitrogen was used as drying, collision and nebulizing gas. The drying gas temperature and flow rate were 225 °C and 10 L/min, respectively. The sheath gas temperature and flow rate were 300 °C and 10 L/min. The nebulizer gas pressure, skimmer voltage, octopole RF, and fragmentor voltage were, 45 psi, 65 V, 750 V and 125 V, respectively. The capillary voltage was set at 3 kV. The MS/MS collision energy was set at 15 eV.

Data was acquired and analysed using a Masshunter Qualitative Analysis B.07.00 software and Masshunter Profinder B.08.00 software, respectively. The identification was possible by comparison with the mass spectral data generated by external standards, the data from databases (MassBank, Pubchem, Phenol explorer, MoNa database) and a personal accurate mass database built using the information about mass data of the main phenolic compounds present in apple and onion and their possible metabolites obtained from the literature. Quantitation of phenolic compounds precursors and metabolites was performed in the QTOF in the MS^1 mode (QTOF) using external calibration curves that

were systematically injected each 10 runs of the sequence of injection. Standard calibration curves of five points were made for each compound commercially available, in the range of 5 to 0.005 µg/ml. When no commercial standard was available, the compounds or the metabolite were quantified using structurally related commercial standards. One quality control (QC) (mix of 10 µL of all the sample extracts) and one pool sample by zone (mix of 10 µL of all the samples extracts of each colon section, ascending, transverse and descending) were also prepared and injected regularly throughout the run to monitor the stability and reproducibility of the HPLC-ESI-QTOF-MS method.

All raw HPLC-ESI-QTOF-MS data were processed to provide structured data in an appropriate format for data analysis according to the procedure described by González-Peña et al. (2017). The data collected by HPLC-ESI-QTOF-MS were cleaned of background noises and unrelated ions recursive analysis by using the MasssHunter Profinder (B.08.00, Agilent Technologies) software.

2.7. Analysis of short chain fatty acids

2.7.1. HPP-treated apple ingredient

The extraction of short-chain fatty acids (SCFAs) of HPP-treated apple ingredient was carried out according to the procedure described by Primec, Micetic-Turk, and Langerholc (2017). Approximately 20 mg of the samples of colonic fermentation were extracted and diluted with a 0.5% phosphoric acid solution to reach a final concentration of 0.005 g/mL. An aliquot (100 µL) of the diluted extract was mixed with 300 µL of 0.5% phosphoric acid and 100 µL of methyl valeric (788 µM) as an internal standard prepared with 0.5% phosphoric acid. Then, samples were extracted with 1000 µL of n-butanol. The standards used in this analysis were also extracted with n-butanol. Gas chromatography analyses were performed using the organic phase of n-butanol.

The SCFA analysis was carried out in an Agilent GC 6890 gas chromatograph with FID detector (flame ionization) and an automatic injector (G2613A). For the separation a DB-WAXtr column (100% polyethylene glycol, 60 m, 0.325 x 0.25mm) was used. Helium was used as carrier gas at flow rate of 1.5 mL/min. The samples were injected in splitless mode (without flow division), an injection volume of 1 µL and an injector temperature of 250 °C. The temperature gradient used was: 2 minutes at 50 °C, a first ramp of 15 °C/min up to 150 °C, a second ramp of 5 °C/min up to 200 °C and a last ramp of 15 °C/min up to 240 °C. The analysis was performed in 41.3 min. The FID temperature was set at 260 °C. The system was controlled by a MSD-Chemstation E.02.00.493 software.

For the identification of SCFAs in HPP-treated apple colonic fermentation samples, a standard solution of FAMQ-004 AccuStandard containing acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric, valeric, caproic and heptanoic acid was used. Quantification was performed using a standard WSFA-2 Mix Supelco mix containing acetic, propionic, isobutyric, butyric, isovaleric and valeric acid. Caproic and heptanoic acids were quantified using the isovaleric calibration curve.

2.7.2. HPP-treated onion ingredient

The short-chain fatty acids (SCFAs) were derivatized using the methodology described previously by Castro-Gómez, Fontecha, and Rodríguez-Alcalá (2014). Approximately 100 mg of lyophilized colonic fermentation products in milli-Q water (250 mg/mL) were mixed with 2.50 mL of sodium methoxide (MetNa) (0.5M) into borosilicate glass tubes with an acid/heat resistant cap containing 50 µl of nonanoic acid (C9:0) and tritridecanoine (C13:0-TAG) in dichloromethane as internal standard (1 mg/mL). The samples were heated at 80ºC, 10 min and 1300 rpm using an incubator with shaker function (TR100-G; JPSelecta, Barcelona, Spain). The samples were cooled in ice during 5

min and 1.83 ml of dimethylsulfoxide (DMF) was added. The next step was initiated with the addition of 3 mL of H_2SO_4 (1M). The samples were heated at 60ºC, 30 min and 1300 rpm and cooled later. Then, 1 mL of hexane and 7,5 mL of Na_2CO_3 6% were incorporated to samples and the mixtures were centrifuged at a 3500 rpm, 10 min, 0ºC using a refrigerated centrifuge (Hettich Universal centrifuge 320R, UK). The upper layer of hexane was transferred to a vial for GC–MS injection. The derivatization method was also conducted for a mix of 1 mg/mL of commercial standard of C2:0, C3:0, C4:0, C5:0, C7:0, C8:0 and C9 fatty acids and a blank (ultrapure water).

The analysis of SCFAs were performed in an Agilent 6890 Series gas chromatograph (Agilent Technologies, Heilbronn, Germany) coupled to an Agilent 5973 Series mass spectrometer (Agilent Technologies, Heilbronn, Germany). Chromatographic separation was performed in a CPSil-88 capillary column (100 m x 0.25 mm x 0.2 µm) (Chrompack, Middelburg, The Netherlands). Hellium (purity 99.999%) was used as carrier gas with column inlet pressure of 30 psi. The injection volume was 1 µL and a split ratio of 1:25. The temperature program was as follows: 1 min at 70 ºC, first ramp 7 ºC/min to 170 ºC, secondary ramp at 10 ºC/min to 230 ºC. Total analysis run was 76.29 min. MS detector conditions were as follows: transfer line temperature 250 ºC, source temperature 230 ºC and quad temperature 150ºC. The mass spectrometer was operated under electron impact ionization at 70 eV, it was used in total ion current (TIC) mode and scanned the mass range from 40 to 500 m/z. For SCFAs identification of colonic fermentation samples, the retention time and mass spectra were compared with those obtained in a mix of commercial standards and data from the National Institute of Standards and Technology library (NIST, 2.1.0 version; Gaithersburg, MD, USA). Quantitation was achieved using response factors calculated from the internal standard of C9:0 (50 µL, 1 mg/mL) and the mix of commercial standards.

476 **2.8. Microbial analysis**

477 The isolation and enumeration of specific groups of bacteria (Table 1) were done
478 using selective and differential growth medium according to different authors (Hartemink
479 & Rombouts, 1999; Kontula, et al., 1998; Nebra & Blanch, 1999). Anaerobic bacteria and
480 Enterobacteriaceae were analysed as indicators of total colonic microbiota, total coliforms
481 and *Clostridium* spp. as a part of normal microbiota composition although they are
482 associated with potential harmful effects, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.
483 associated with the beneficial microbiota of the colon. The identification of *Lactobacillus*
484 microorganism from MRS-agar plates were carried out by MALDI-TOF mass
485 spectrometry (Bunesova et al., 2017). Fermentation samples (5 g) from the three colon
486 vessels (ascending, transverse and descending colon) during the stabilization (at 0, 5, and
487 13 days for apple and 0, 6, 8 and 12 days for onion) and intake period (at 1, 3, 6, 8, 10 and
488 14 days) were aseptically transferred to tubes containing Anaerobe Basal Broth (Oxoid,
489 Thermo Scientific, Basingstoke, UK) transported immediately to the laboratory of
490 microbiology of AINIA (Valencia, Spain), and analysed within two hours.

Table 1: Microbial groups, media and incubation conditions for enumerating representative bacteria in the three colon reactors (AC, TC and DC)

Microorganism	Medium	Incubation conditions
Bifidobacterium spp.	TOS-propionate Agar Base (Merck Millipore)	Anaerobic, 37 ºC, 2 days
Lactobacillus spp.	MRS Agar (Oxoid)	Anaerobic, 37ºC, 2 days
Enterobacteriaceae	VRBD Agar (Merck Millipore)	Anaerobic, 37ºC, 1 day
Total coliforms	VRBL Agar (Merck Millipore)	Anaerobic, 37ºC, 1 day
Clostridium spp.	TSC Agar (Oxoid)	Anaerobic, 37ºC, 1 day
Total anaerobes	Schaedler Anaerobe Agar (Oxoid)	Anaerobic, 37ºC, 3 days

2.9. Statistical analysis

The statistical methods used for the data processing were as follows: descriptive analysis (means and SDs) were used to summarize the data. One-way analysis of variance (ANOVA) comparing the means within the same ingredient and colon regions for different intake days was conducted. Levenne´s test was applied to verify the homogeneity of the variances. Tamhane's T2 (equal variances not assumed) and Tukey's b (equal variances assumed) *post hoc* tests were used to compare pairs of means and determine statistical significance at the $p \leq 0.05$ level. All analyses were performed by using the IBM SPSS Statistics 23 Core System (SPSS Inc., an IBM Company, USA).

Multivariate analysis based on principal component analysis (PCA) was applied to assess the quality of data obtained by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS using the MetaboAnalyst 4.0 software (MetaboAnalystR package). Pareto was used as scaling method and a logarithmic transformation was performed.

3. Results and discussion

3.1. Physicochemical and chemical characterization of undigested HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients

The physicochemical and chemical characteristics of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients are shown in Table 2.

In general, the onion ingredient showed a higher pH and higher content of ascorbic acid, vitamin C, proteins, glucose, fructose, citric acid, fumaric acid, acetic acid and total dietary fibre (mainly insoluble fibre) than the apple ingredient. HPP-treated apple stands out for its pectin content and for its higher sacarose and maleic acid content than the onion sample. Similar content on organic acids, sugars and fibre has been also published for onion (Benítez, Molla, Martín-Cabrejas, Aguilera, López-Andreu, & Esteban, 2012;

515 Galdón, Rodríguez, Rodríguez, & Romero, 2008; Liguori, Califano, Albanese, Raimo,
516 Crescitelli, & Di Matteo, 2017) and apple (Hecke, et al., 2006; Ornelas-Paz, et al., 2018).

Table 2: Physicochemical and chemical characteristics of undigested HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

Parameters	HPP-treated apple	HPP-treated onion
pH	3.94 ± 0.13[a]	5.50 ± 0.04[b]
Acidity[1]	1.08 ± 0.03[b]	0.60 ± 0.08[a]
Acorbic acid (mg/100 g dw)	13.15 ± 0.04[a]	147.78 ± 3.80[b]
Vitamin C (mg/100 g dw)	49.89 ± 0.93[a]	170.60 ± 2.57[b]
Proteins (g/100 g dw)	0.45 ± 0.04 [a]	3.41 ± 0.27 [b]
Fibre		
Soluble (mg/100 g dw)	3.91 ± 0.45[a]	4.57 ± 0.15[a]
Insoluble (mg/100 g dw)	10.88 ± 0.30[a]	14.54 ± 0.05[b]
Total (mg/100 g dw)	14.79 ± 0.24[a]	19.11 ± 0.50[b]
Pectins (mg/100 g dw)	1.63 ± 0.03	--
Sugars		
Sacarose (g/100g dw)	8.95 ± 0.89[b]	3.58 ± 0.21[a]
Glucose (g/100g dw)	8.19 ± 0.18[a]	11.95 ± 0.75[b]
Fructose (g/100g dw)	16.92 ± 0.88[a]	22.15 ± 1.25[b]
Organic acids		
Maleic acid (g/100g dw)	2.30 ± 0.09[b]	1.48 ± 0.18[a]
Citric acid (mg/100g dw)	28.53 ± 1.44[a]	239.52 ± 2.31[b]
Fumaric acid (mg/100g dw)	9.05 ± 1.65[a]	12.09 ± 0.92[b]
Acetic acid (mg/100g dw)	5.33 ± 0.33[a]	5.21 ± 1.32[a]
Pyruvic acid (mg/100g dw)	--	80.23 ± 2.58

Data expressed as mean ± SD (n=3); dw= dry weight; Different letters [a-b] show significant differences ($p \leq 0.05$) between HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients. [1] Acidity was expressed as g maleic acid/ 100 g dw in the HPP-treated apple and as g citric acid/ 100 g dw in the HPP-treated onion.

517 **3.2. Phenolic compounds of undigested HPP-treated apple and HPP-treated onion**
518 **ingredients**

519 The phenolic compounds of the undigested HPP-treated apple and HPP-treated
520 onion ingredients are shown in Tables 3 and 4. The phenolic composition of HPP-treated
521 apple was similar to those previously described in published studies (Fernández-Jalao, et
522 al., 2019). Thus, in this apple ingredient were identified 27 phenolic compounds, mainly
523 phenolic acids and flavonoids (flavonols, flavan-3-ols and dihydrochalcones) (Table 3).

524 The total phenolic content in HPP-treated apple was 1426.75 µg/g dw. Phenolic acids,
525 flavan-3-ols, flavonols and dihydrochalcones accounted for 48.1%, 32.4%, 13.2% and 6%
526 of total phenolic content, respectively.

Table 3: Phenolic compounds content (µg/g dw) in the undigested HPP-treated apple ingredient.

	HPP-treated apple
Flavonols	
Q-3-Rutinoside	1.92 ± 0.02
Q-3-Galactoside	66.08 ± 0.93
Q-3-Glucoside	13.02 ± 0.28
Q-3-Arabinoside	24.84 ± 0.53
Q-3-Xyloside	2.04 ± 0.09
Q-3-Rhamnoside	79.74 ± 0.32
Quercetin	0.23 ± 0.003
Phenolic acids	
Neochlorogenic acid	198.53 ± 2.53
Chlorogenic acid	368.29 ± 0.86
Cryptochlorogenic acid	6.99 ± 0.3
p-Coumaric acid	0.54 ± 0.03
p-Coumaroyl quinic acid	111.53 ± 2.41
Protocatechuic acid	0.17 ± 0.01
Salicylic acid	0.62 ± 0.05
Flavan-3-ols	
Procyanidin B1	10.96 ± 0.32
Catechin	5.87 ± 0.12
Procyanidin B2	126.74 ± 0.51
Epicatechin	234.51 ± 0.03
Procyanidin C1	56.58 ± 0.7
Tetramer of epicatechin	10.85 ± 0.08
Dimer of epicatechin	17.07 ± 0.25
Dihydrochalcones	
3-Hydroxyphloretin-2'-xyloglucoside	2.4 ± 0.24
3-Hydroxyphloretin-2'-glucoside	2.18 ± 0.01
Phloretin-2'-xyloglucoside	24.81 ± 0.02
Phloretin-pentoxyl-hexoside	4.34 ± 0.11
Phloridzin	53.91 ± 0.46
Phloretin	1.99 ± 0.01

Data are expressed as the mean (µg/g dw) ± SD (n=4). dw= dry weight

527 Chlorogenic acid, neochlorogenic acid and *p*-coumaroyl quinic acid contributed
528 53.6%, 28.9% and 16.2% to the total phenolic acids, respectively. Protocatechuic acid (3,4-
529 dihydroxybenzoic acid) and salicylic acid (2-hydroxybenzoic acid) were identified at very

low concentration (≤ 1 µg/g dw) and also previously described for apple (Russell, Labat, Scobbie, Duncan, & Duthie, 2009). The main flavonols were quercetin-3-galactoside (Q-3-galactoside) and Q-3-rhamnoside and accounted 35% and 42.4% of total flavonols, respectively. The main dihydrochalcone was phloridzin (60%) followed by phloretin-2'-xyloglucoside (27.7%). Also, 3-hydroxyphloretin-2'-xyloglucoside, 3-hydroxyphloretin-2'-glucoside and phloretin-pentoxyl-hexoside were also identified according to previous published studies (Tsao, Yang, Christopher, Zhu, & Zhu, 2003) (Table 3).

Table 4: Phenolic compounds (µg/g dw) in the undigested HPP-treated onion ingredient.

	HPP-treated onion
Flavonols	
Q-3,7,4'-triglucoside	26.74 ± 2.39
Q-7,4'-diglucoside	13.31 ± 1.06
Q-3,4'-diglucoside	5090.47 ± 104.64
Q-3-Rutinoside	2.02 ± 0.37
Isorhamnetin-3,4'-diglucoside	174.46 ± 32.23
Q-3-Glucoside	108.88 ± 15.56
Q-4'-Glucoside	1015.55 ± 156.38
Isorhamnetin-3-glucoside	2.04 ± 0.31
Isorhamnetin-4'-glucoside	322.77 ± 48.46
Quercetin	5.57 ± 0.57
Isorhamnetin	3.35 ± 0.3
Phenolic acids	
Protocatechuic acid	0.56 ± 0.08
Gallic acid	1.23 ± 0.25
Salicylic acid	1.87 ± 0.07

Data (µg/g dw) are expressed as the mean ± SD (n=4).

The main phenolic compounds of undigested HPP-treated onion ingredient were flavonols and the major were Q-3,4'-diglucoside (75.3%), Q-4'-glucoside (15%) and isorhamnetin-4'-glucoside (4.8%) (Table 4). The rest of flavonols represented 5% of total flavonols. The total phenolic content in onion was 6765.16 µg/g dw. This onion phenolic compounds profile was similar to those observed in previous studies (Fernández-Jalao, et al., 2017; Slimestad, et al., 2007). Also, protocatechuic acid, salicylic acid and gallic acid

543 were identified in onion at very low concentration (≤ 2 μg/g dw) (Gorinstein, et al., 2008;
544 Liguori, et al., 2017).

545 **3.3. Colonic fermentation of phenolic compounds of HPP-treated apple and HPP-**
546 **treated onion ingredients**

547 The raw data collected by LC-MS was cleaned of background noises, and unrelated
548 ions by the molecular feature extraction (MFE) algorithm using the Mass Hunter
549 Qualitative Analysis Software B.06.00 (Agilent Technologies). The MFE then created a
550 list of the ion characteristics for the metabolite profiles; each compound was described by
551 mass, retention time and abundance. Features post-acquisition processing was performed in
552 Agilent Profinder B.08.00 (Agilent Technologies). Mass and retention time alignment
553 followed by a filter-by-frequency post-processing was done to retain only those features
554 that were present in >70% of samples within at least one treatment. Relative standard
555 deviation (%RSD) of the concentration of the compounds in the QCs samples was
556 calculated, and only compounds below of the limit (30%) were considered for the data
557 treatment.

558 Multivariate statistical analysis (MVA) and plotting were performed using
559 MetaboAnalyst 4.0 software. Before any statistical calculations, logarithmic
560 transformations of data were performed in order to approximate a normal distribution.

561 In order to evaluate the quality of analytical data and to remove possible outliers, a
562 principal component analysis (PCA) was performed from faecal samples and QCs. The
563 robustness of analytical procedure was proved by the clustering of the QC samples (data
564 not shown), that reflects the system´s stability, performance and reproducibility of the
565 sample treatment procedures.

To perform the sample classification, chromatograms from the HPP-treated apple and HPP-treated onion colonic fermentation samples, PCA model was built. The PCA showed a clear separation of the samples between the different regions of the colon in both HPP-treated apple and HPP-treated onion (Fig. 3). Data variability was mainly given by the first component (PC1) in both HPP-treated apple (56.6%) and HPP-treated onion (63.8%). Multivariate model showed good quality in terms of variance explained (R^2), and variance predicted (Q^2).

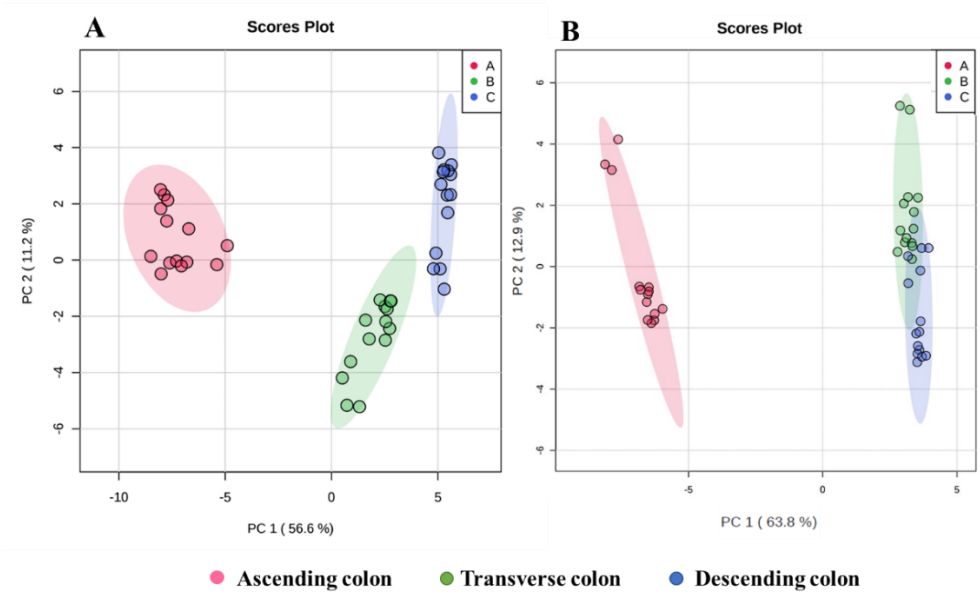


Figure 3: Principal component analysis (PCA) score plot of HPP-treated apple (A) and HPP-treated onion (B) colonic fermentation products. The parameters for these models are (A) R^2=0.823, Q^2=0.796 and (B) R^2=0.934, Q^2=0.921.

Student's t-test at 95% level (p<0.05) was used to select the most important variables in each model. A total of 56 features were found by LC/MS negative ionization mode, among which 33 were phenolic compounds precursors and 26 were phenolic metabolites (Tables 5 and 7).

The identification of compounds was performed once the exact mass was obtained by analysing the isotope profile, MS/MS fragmentation and searching accurate masses against online databases (FoodDB and HMDB). Several commercial compounds standards

were also used to confirm the fragmentation pattern. Finally, the resulting data of phenolic compounds precursors and phenolic metabolites formed during the 14 days of the intake period with HPP-treated apple and HPP-treated onion was summarized in Tables 5 and 7.

Table 5: Phenolic compounds precursors' identification by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS in HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients subjected to a dynamic *in vitro* colonic fermentation.

Compound	Formula	Mass	RT standard	RT Apple[a]	RT Onion[a]	*m/z* (M-H)	Mayor ESI *m/z* $[M-H]^-$ and fragments
PHENOLIC COMPOUNDS PRECURSORS							
Flavonols							
Q-3,7,4'-triglucoside	$C_{33}H_{40}O_{22}$	788.2041	NS	A	13.1	787.1937	787.1943; 770.35063; 671.1474; **625.1403**; 432.0439; 204.0667;179.0487
Q-7,4'-diglucoside	$C_{27}H_{30}O_{17}$	626.1508	NS	A	13.47	625.1413	**625.1301**; 606.1779; **463.0867**; 301.02673
Q-3,4'-diglucoside	$C_{27}H_{30}O_{17}$	626.149	13.67	A	13.676	625.1404	625.1348;**463.0867**; 301.0370;271.0606; 150.9868
Isorhamnetin-3,4'-diglucoside	$C_{28}H_{32}O_{17}$	640.1656	NS	A	14.34	639.1567	639.1556; **477.0853**; 313.0640; 303.0485
Q-3-Galactoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.0969	15.35	15.379	A	463.0881	463.088; 300.0273; **301.0349**; 255.14; **271.0257**; **151.0004**
Q-3-Rutinoside	$C_{27}H_{30}O_{16}$	610.155	NS	15.38	15.34	609.1457	**609.1471**; 553.3327; **463.0928**; 301.1196
Q-3-Glucoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.0963	15.65	15.701	15.655	463.0884	463.0888; **343.0571**; **301.0319**; 271.0205; 229.0334
Q-3-Arabinoside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	434.0855	NS	16.137	A	433.0777	433.0795; 415.1971.341.1133; **301.0339**; 271.0221; 151.0075
Q-3-Xyloside	$C_{20}H_{18}O_{11}$	434.0854	NS	16.41	A	433.0777	433.0782; 416.9801; 346.0838; **301.0303; 283.0768**; 233.4208
Q-3-Rhamnoside	$C_{21}H_{20}O_{11}$	448.1014	NS	17.071	A	447.0937	447.0932; **301.0324**; 284.0311; 283.1580
Q-4-Glucoside	$C_{21}H_{20}O_{12}$	464.096	NS	A	17.28	463.0881	463.0897; 445.8403; 301.0342; 283.0054
Isorhamnetin-3-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	478.1104	17.33	A	17.334	477.1044	**477.1031**; 315.0414; 271.0043; 299.0117; 243.0197
Isorhamnetin-4-glucoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	478.1122	NS	A	18.21	477.1037	**477.1051**; 463.0893; 315.0393; 299.0150; 157.3284
Quercetin	$C_{15}H_{10}O_7$	302.0381	19.98	19.97	19.983	301.0357	301.0340; 273.0260; **245.0376**;**178.9937**; **151.0054** ;121.0313;107.0123
Isorhamnetin	$C_{16}H_{12}O_7$	316.0544	NS	A	21.97	315.0513	315.0508; 299.9147; 285.9066; 258.9187; 161.0463
Hydroxycinnamic acids							
Neochlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	354.0951	NS	4.485	A	353.0878	**353.0885; 191.0585; 179.0410**; 173.0462;91.0585

Chlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	353.0881	6.0	6.016	A	353.0877	353.08905; 336.86028; **309.8683**; **291.868**; 191.0554; 87.0787
Cryptochlorogenic acid	$C_{16}H_{18}O_9$	354.0949	NS	7.772	A	353.0878	**353.0833; 191.0518; 179.0340**; 173.0437
Coumaric acid	$C_9H_8O_3$	164.046	11.29	10.867	A	163.04	163.0388; **145.9291**; 129.9739; **119.0363**; 102.94814; 96.9467
p-coumaroyl-quinic acid	$C_{16}H_{18}O_8$	338.0997	NS	11.076	A	337.0923	**337.0923**; 319.0818; **293.102**5; 291.0869;**275.0919**; **191.0556**; **173.045**; **163.0395**;145.0290;87.0083
Flavan-3-ols							
Procyanidin B1	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.1424	NS	4.39	A	577.1351	577.1360;**424.9118**;289.0700;179.0559
Catechin	$C_{15}H_{14}O_6$	290.0794	5.4	5.355	A	289.0717	289.0724; **245.0813**; 270.8308; 191.0536; 167.03521
Procyanidin B2	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.143	10.1	10.19	A	577.1351	577.3602; **425.0868**; 289.0697; 178.9776
Epicatechin	$C_{15}H_{14}O_6$	290.0787	10.94	10.947	A	289.0717	289.0727; **245.0787**; **203.0781**; 179.0435; **137.0248**; 125.0236;109.0306
Procyanidin-C2*	$C_{45}H_{38}O_{18}$	866.2058	NS	12.99	A	865.2	865.2007; 753.2624; 713.1482; 289.0715; 179.0580; 161.047
Tetramer of epicatechin*	$C_{60}H_{50}O_{24}$	1154.04	NS	13.74	A	577.1323	576.1290 [M-2H]-2/2; 289.0954; 179.0888; 161.0453
Dimer of epicatechin*	$C_{30}H_{26}O_{12}$	578.143	NS	15.688	A	577.13513	577.1317;425.0800;289.0709
Dihydrochalcones							
3-hydroxyphloretin-2'-*O*-xyloxyl-glucoside	$C_{26}H_{32}O_{15}$	584.1733	NS	15.427	A	583.1661	**583.1667;301.0356;**300.0334;271.0182
3-hydroxyphloretin-2'-*O*-glucoside	$C_{21}H_{24}O_{11}$	452.1293	NS	16.49	A	451.124	451.1256**;433.1607;**301.0423
Phloretin-2'- xyloglucoside	$C_{26}H_{32}O_{14}$	568.1801	NS	16.991	A	567.1714	567.1737; 549.2539; 433.0899; 273.0780; 225.0633; 149.0471; 59.0156
Phloretin-pentoxyl-hexoside	$C_{26}H_{32}O_{14}$	568.1808	NS	17.265	A	567.1711	567.1720;537.1320;**273.0790**
Phloridzin	$C_{21}H_{24}O_{10}$	436.1377	18.14	18.183	A	435.1296	435.1311; 288.9734; 259.1113
Phloretin	$C_{15}H_{14}O_5$	274.0847	21.63	21.535	A	273.0768	273.0654; 179.034; **167.0357**; 123.0333; 119.0384; 81.024

* Compounds identified only in the initial HPP-treated ingredients. NS: No standard, A: Absent

584 *3.3.1. Evolution of the phenolic compounds precursors*

585 Some of the phenolic compounds described in the undigested HPP-treated apple
586 and onion ingredients were found in the gut fermentation samples. In the case of HPP-
587 treated onion, 10 flavonols were detected but only in the ascending colon (AC) (Fig. 4). In
588 decreasing order of concentration, Q-3,4'-diglucoside followed by Q-4'-glucoside,
589 isorhamnetin-4'-glucoside, isorhamnetin-3,4'-diglucoside and Q-3-glucoside were found in
590 the AC of the onion ingredient reaching a maximum concentration on days 8, 10 and/or 12
591 of the intake period (Fig. 4). Other flavonols were also found in the AC but at
592 concentrations lower than 85 µg/100 g fw (Q-3,7,4'-triglucoside, Q-7,4'-diglucoside, Q-3-
593 rutinoside, isorhamnetin-3-glucoside and isorhamnetin aglycone). These minority
594 compounds showed a tendency to increase since day 8 to the end of the intake period,
595 except Q-3-rutinoside which presented at similar concentrations during the 14 days of the
596 intake period (Fig. 4). The continuous feeding of the colon fermentation model with the
597 gastrointestinal digested HPP-treated onion ingredient may cause an accumulation of non-
598 bioaccessibles phenolic compounds in the AC. Previous studies have shown that the
599 bioaccessibility of total flavonols in HPP-treated onion (400 MPa/25 ºC/5 min) was 17.47
600 %. In general, the phenolic compounds bioaccessibility has been estimated around 10-15%
601 which means that a great percentage of ingested phenolic compounds are able to reach the
602 colon and subjected to the gut microbiota metabolism (Cardona, Andres-Lacueva,
603 Tulipani, Tinahones, & Queipo-Ortuno, 2013).

604 These results obtained with a dynamic model that simulated a chronic feeding with
605 an onion ingredient differ from those obtained from static models of human colon
606 microbiota fermentation of phenolic compounds which show a rapid biotransformation of
607 initial phenolic compounds, with only trace levels of these compounds remaining at end of
608 the assay (Parkar, et al., 2013).

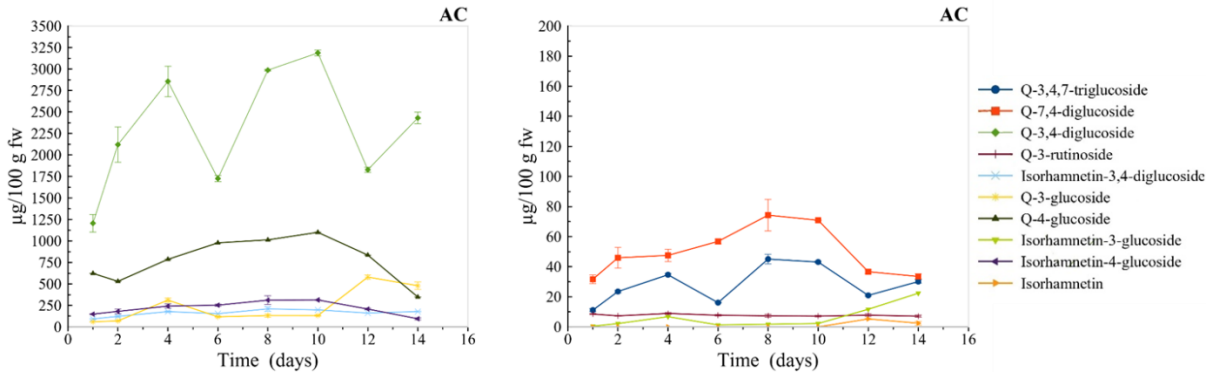


Figure 4: Mean values ± standard deviation (n=3) of flavonols concentration (µg/100 g fw of slurry) in the ascending colon (AC) during the colonic fermentation process of HPP-treated onion ingredient.

Contrary to result with onion ingredient, 22 phenolic compounds of the HPP-treated apple were identified and quantified mainly in the ascending colon (AC) although some of them were also found in the transverse and descending colon (TC and DC). These phenolic compounds belong to the flavonols, hydroxycinnamic acids, flavan-3-ols and dihydrochalcones groups and were mainly identified in the AC (Fig. 5) although some of them reached the TC and very few of them the DC.

The main phenolic compounds found in AC were chlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, *p*-coumaroyl quinic acid, Q-3-galactoside, Q-3-rhamnoside, procyanidin B2, epicatechin, phloretin-2'-xyloglucoside and phloridzin. The observed trend was the decrease in the concentration of the majority of these compounds in AC as the intake period advanced, from day 1 or 2 to day 14. However, some compounds such as Q-3-galactoside, Q-3-rhamnoside, phloridzin, procyanidin B2, epicatechin, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid and *p*-coumaroylquinic acid showed a tendency to increase its concentrations towards the end of the intake period (from day 8 to 14).

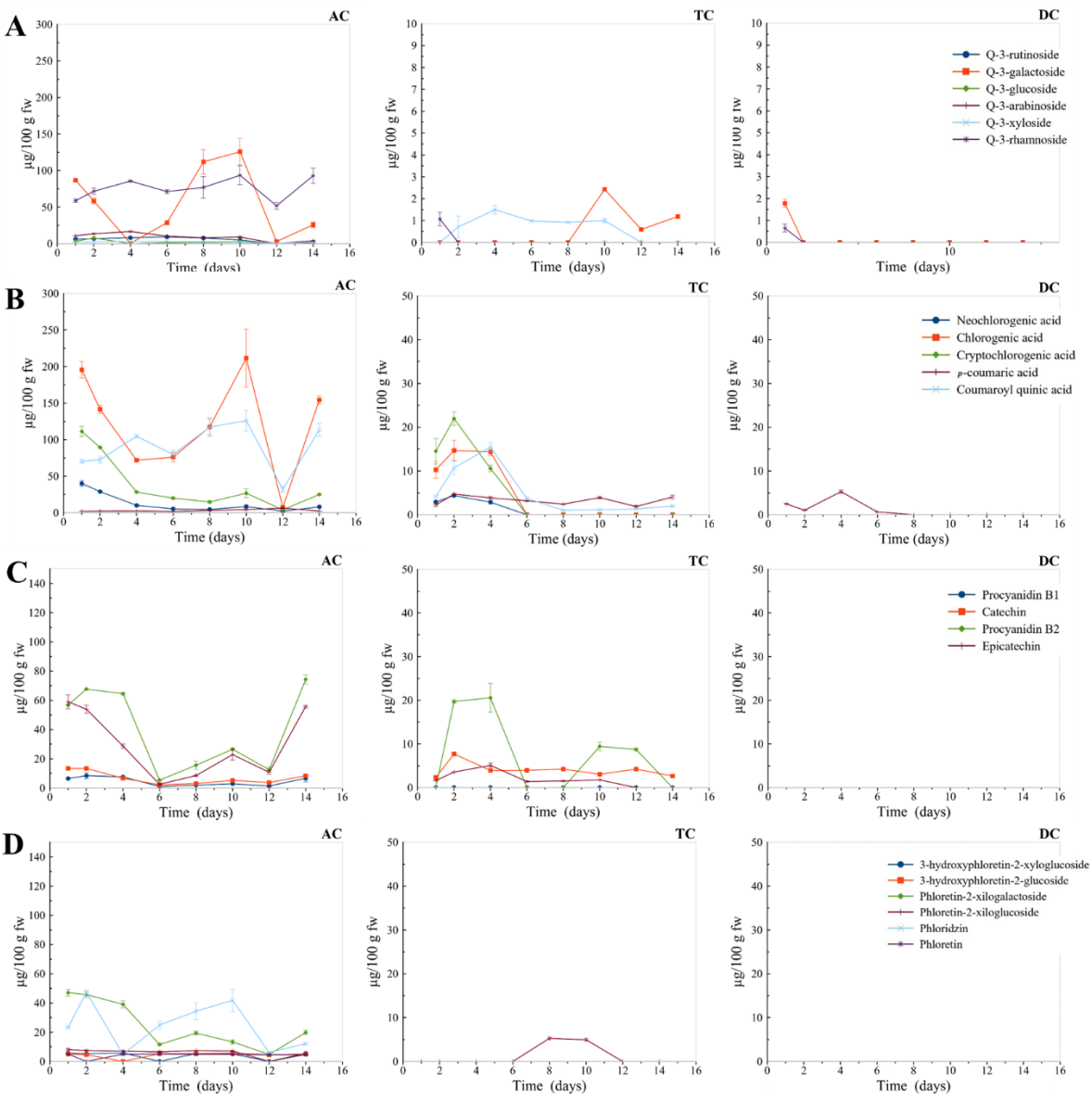


Figure 5: Mean values ± standard deviation (n=3) of flavonols (A), hydroxycinnamic acids (B), flavan-3-ols (C) and dihydrochalcones (D) concentrations (µg/100 g fw of slurry) in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation process of HPP-treated apple ingredient.

623

624 The continuous feeding of the colon fermentation model with the gastrointestinal
625 digested HPP-treated apple ingredient may cause an accumulation of non-bioaccessibles
626 phenolic compounds in the AC. The bioaccessibility of total phenolic compounds has been
627 estimated in 10.89 % in HPP-treated apple ingredient (400 MPa/35 ºC/5 min) (Fernández-
628 Jalao, et al., 2017), so the majority of them are able to arrive intact at AC. Indeed, the

bioaccessibility of some of main phenolic compounds was quite lower which could justify its content in this colon region. As example, Q-3-galatoside and Q-3-rhamnoside showed bioaccessibilities of 9% and 6%, respectively, and neither procyanidin B2 nor epicatechin were detected in the bioaccessible fraction of HPP-treated apple. However, some compounds such as chlorogenic acid showed a good bioaccessibility (48%) (Fernández-Jalao, Balderas, Sánchez-Moreno, & De Ancos, 2020). In the study of Rechner, et al. (2004) observed that gut metabolism of hydroxycinnamic acids, flavanones and flavonols was time and concentration dependent and related to inter-individual variations in the composition of gut microbiota. It could be probable that gut metabolism of flavan-3-ols and flavonols was faster than chlorogenic acid which caused a greater accumulation of high bioaccessible chlorogenic acid in the AC.

In the TC for HPP-treated apple ingredient, very few compounds were observed and at very low concentrations (≤ 22 μg/100 g fw). Some of these phenolic compounds were detected during the first days of intake period (Q-3-xyloside, Q-3-rhamnoside, procyanidin-B2, epicatechin, chlorogenic, neochlorogenic and cryptochlorogenic acids) and others at the end of the intake period of 14 days (Q-3-galactoside, phloretin-pentoxyl-hexoside). However, both *p*-coumaric acid and *p*-coumaroyl quinic acid were presented during all the intake period in the TC. It is remarkable that the *p*-coumaric acid content was very similar during the majority of the intake days and indeed it presented higher concentration than in AC.

This compound was also found on days 1 to 6 of the intake period in the DC. Even if *p*-coumaric acid was found in the undigested HPP-treated apple ingredient, its presence in the three colon regions could be also related with the microbial metabolism of some phenolic acids. In the study of Ekbatan, et al. (2016), coumaric acid was detected as microbial metabolite of a polyphenol mixture consisting on chlorogenic acid, caffeic acid,

654 ferulic acid and rutin which was subjected to an *in vitro* colon fermentation. Also, Cueva,
655 et al. (2015) observed the presence of coumaric acid in the AC, TC and DC of red wine
656 colonic gut fermentation samples.

657 Catechin, a minor compound in the undigested HPP-treated apple ingredient, was
658 observed during all the intake period in the AC and TC in a range from 2.32 to 13.45
659 µg/100 g fw. A possible conversion of epicatechin to catechin described by many authors
660 could explain the presence of catechin in these colon regions (Stoupi, Williamson, Drynan,
661 Barron, & Clifford, 2010; Tzounis, et al., 2011).

Table 6: Quercetin evolution during a dynamic *in vitro* gastrointestinal digestion and colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

		HPP-treated apple	HPP-treated onion
Daily Quercetin (µg) supply		8.62	150.39
AC[1]	4 d	27.19 ± 0.84^{bC}	360.22 ± 18.82^{bB}
	9 d	5.05 ± 0.28^{aC}	118.51 ± 13.44^{aB}
	14 d	3.82 ± 0.37^{aC}	529.73 ± 68.79^{cB}
TC[1]	4 d	6.97 ± 0.44^{cA}	5.24 ± 1.74^{bA}
	9 d	1.79 ± 0.02^{aB}	1.7 ± 0.28^{aA}
	14 d	2.56 ± 0.17^{bB}	10.1 ± 0.51^{cA}
DC[1]	4 d	23.12 ± 0.09^{cB}	0.89 ± 0.21^{aA}
	9 d	1.28 ± 0.14^{bA}	1.54 ± 0.2^{aA}
	14 d	0.99 ± 0.09^{aA}	2.37 ± 1.03^{aA}

Data (µg/100 g fw of slurry) are expressed as mean ± standard deviation. [1]Colon fermentation products were collected in the AC (ascending colon), TC (transverse colon) and DC (descending colon) at days 4, 9 and 14. Different small letters indicate significant differences (p<0.05) between different sample collection days for the same HPP-treated ingredient and colon region (AC, TC, DC). Different capital letters indicate significant differences (p<0.05) between colon region for the same HPP-treated ingredient and collection day.

662

663 The effect of gut microbiota on the evolution of quercetin aglycone was shown in
664 Table 6. In general, undigested HPP-treated onion ingredient (5.57 µg/g dw) showed a
665 higher quercetin content than HPP-treated apple (0.23 µg/g dw) (Table 3 and 4). According

to the dynamic gastrointestinal-colon fermentation model, the system is feeding each day with 27 g of HPP-treated onion ingredient and 37.5 g of HPP-treated apple ingredient which represent a daily supply of 150.39 µg and 8.26 µg of quercetin, respectively, that after the gastrointestinal digestion and taking into account the quercetin bioaccessibility of onion (10.47%) and apple (50%) (Fernández-Jalao, et al., 2020; Fernández-Jalao, et al., 2017) , the daily amount of quercetin that reached the colon simulator could be about 135 µg (89.53% of 150.39 µg) for onion and 4 µg (50% of 8.26 µg) for apple. The low amount of quercetin aglycone that daily feed the colon fermentation system did not justify the quercetin concentration found in the AC for apple and onion assays that could be most related with the deglycosilation of quercetin glycosides by gut microbiota previously reported by many authors (Serra, et al., 2012). In fact, the higher quercetin concentration found in the AC of onion in comparison to apple agree with the higher content of quercetin-glycosides that has the onion ingredient respect to the corresponding of apple (Table 3 and 4) although this trend was not maintained in the TC and DC where a progressive reduction of quercetin content was observed which coincides with the disappearance of quercetin glycosides or with the degradation of quercetin in these colon regions.

Deglycosilation of quercetin glycosides is catalysed by gut microbial enzymes such as β-glucosidases, β-glucuronidases and α-rhamnosidades able to cleavage the glycosylic moieties resulting in the quercetin aglycone release. Also, quercetin deglycosilation may occurs at different rates depending on the moiety attached to the aglycone (Aura, 2008). Juaniz, et al. (2016), observed a rapid metabolism of quercetin glycosides during the first few minutes of faecal fermentation of green pepper together the simultaneous increase of quercetin aglycone (reaching a maximum at 5 hours). In the study of Koutsos, et al. (2017), was observed a major content of quercetin than quercetin glycosides since 5 h at 24 h of an

691 *in vitro* fermentation 'Golden Delicious' apple. In that case, no quercetin aglycone was
692 quantified in the undigested fresh apple.

693 Also was remarkable the lower quercetin content found in the middle of the assay
694 (day 9) compared to the beginning (day 4) and the end (day 14), mainly in AC and TC of
695 both ingredients (Table 6). Also, it was observed that a continuous feeding with the apple
696 ingredient allowed a quercetin content in the DC (day 4) similar than in the AC being
697 significantly (p<0.05) higher than in onion. Some authors suggest that gut metabolism of
698 phenolic compounds could be subjected to inter-individual variation of microbiota
699 composition (Rowland, et al., 2018). Rechner, et al. (2004) demonstrated that the rate of
700 metabolism was dependent of rutin (Quercetin-3-rutinoside) concentration (inverse
701 association between concentration and rate of deglycosilation) and also subjected to inter-
702 individual variation of colonic microbiota profile. Also it has been suggested that food
703 matrix where the phenolic compounds are embedded could modulate their interaction with
704 gut microbiota (Tomás-Barberán & Espín, 2019). Microbial metabolism of phenolic
705 compounds was different among different pomegranate products (juice, pulp and peel)
706 which could confirm the influence of food matrix on phenolic gut metabolism (Mosele, et
707 al., 2015).

708 *3.3.2. Evolution of the phenolic compounds metabolites*

709 The gut microbiota metabolism of phenolic compounds involves numerous
710 reactions (hydrolysis, hydrogenation, α- and β-oxidation, demethoxylation,
711 dihydroxylation, decarboxylation) that results in the formation of a wide range of
712 metabolites. A total of 26 compounds were identified in the gut fermentation samples,
713 including benzoic acids, phenylacetic acids, phenylpropionic acids and phenylvaleric acids
714 derivatives, simple phenols, phenolic acids, and others (Table 7).

Table 7: Phenolic derived metabolites identification by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS in HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients subjected to a dynamic *in vitro* colonic fermentation.

Compound	Formula	Mass	RT standard	RT Apple[a]	RT Onion[a]	*m/z* (M-H)	Mayor ESI *m/z* $[M-H]^-$ and fragments
PHENOLIC COMPOUNDS METABOLITES							
Benzoic acid derivatives							
3,4-dihydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_4$	154,0243	1,89	1,89	1,913	153,0193	153.0199; 133,0260; **109.0291**; 91.0226; 81.0286
Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)	$C_7H_6O_5$	170,0191	0,96	A	2,1	169,0151	169.0153;**125.0229**; 107.0226;**96.9588**; 97.0280; 89.027; 68.9951
Salicylic acid (2-hydroxybenzoic acid)	$C_7H_6O_3$	138,033	NS	2,986	3,03	137,0244	**137.0266**; 129.0563; 119.0363; 112.9852; **93.0347;** 89.0252; 68.9969
4-hydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_3$	138,0322	3,46	3,486	3,429	137,0257	137.0284; 124.0280; 112.9876; 108.1550; 98.9575; **93.0345**
3,5-dihydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_4$	154,0267	NS	5,258	5,25	153,0193	**153.0267**;137.0336; 131.0709; **109.0295; 91.00381;** 68.9951
3-hydroxybenzoic acid	$C_7H_6O_3$	138,0323	5,53	5,532	5,533	137,0255	137.0251;123.0451; 121.0295; **93.0351**; 91.0046
Syringic acid (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid)	$C_9H_{10}O_5$	198,0512	NS	A	6,2	197,0455	**197.0458**; 187.02155; 161.029; **153.0405;** 151.0416; **137.03198**
Benzoic acid	$C_7H_6O_2$	122,0364	12,53	12,51	12,533	121,0294	121.0646, 102.9488; 89.0262; 77.0457
Phenylacetic acid derivatives							
3,4-dihydroxyphenylacetic acid	$C_8H_8O_4$	168,0425	2,47	2,503	2,478	167,035	167.0343; **123,0447**; 137.0271; 96.4594; 61.9887
Homovanillic acid (3methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid)	$C_9H_{10}O_4$	182,0586	NS	2,696	2,661	181,0506	181.0584; 167.0358; **137.0305**; 123.0461; **122.03504**
4-hydroxyphenylacetic acid	$C_8H_8O_3$	152,0474	4,65	4,662	4,61	151,0407	151.0534; 137,0281; 128.0355;**121.0295**; 112.9862; **107.0497;** 96.9503
3-hydroxyphenylacetic acid	$C_8H_8O_3$	152,0478	6,16	6,177	6,116	151,0406	151,0406; **107.0512**; 112,9861; 108,0542; 119,0363; 65.0368
Phenylacetic acid	$C_8H_8O_2$	136,0527	NS	12,994	12,99	135,0451	135.0452; 128.03566; **117.21072**; 105.0039;

							91.0479; 650357
Phenylpropionic acid derivatives							
Dihydrocaffeic acid (3,4-dihydroxyphenylacetic acid)	$C_9H_{10}O_4$	182,0544	4,82	4,787	4,8	181,0471	181.0517; **137.0257**;**121.0274**; 119,0363; 112.9832; 109.0270
3-(3-hydroxypheny)-propionic acid	$C_9H_{10}O_3$	166,0602	9,3	9,61	9,311	165,0557	165.0417; **147.3718**;137.0349; **121.0909**; 107.4270
3-(4-hydroxypheny)-propionic acid	$C_9H_{10}O_3$	166,0618	11,79	11,592	11,796	165,0551	165.0462; **148.3569**; **121.0439**; 107.0339; **92,8287**
Phenylpropionic acid	$C_9H_{10}O_2$	150,0665	NS	18,183	18,15	149,0607	149.0689; 105.2957; 133.4147; 88.1326, 74.0109
Phenylvaleric acid derivatives							
3-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid	$C_{11}H_{14}O_3$	194,0917	NS	21,375	A	193,0867	193.0854; 176.5354; 149.660; 59.6636
4-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid	$C_{11}H_{14}O_3$	194,0917	NS	23,679	A	193,0867	193.0759; 175.9572; 152.9061; 148.6544; 59.0124
Simple phenols							
Phloroglucinol	$C_6H_6O_3$	126,0335	0,86	0.81	0.77	125,0249	125.0214; 108.3153; 121.3252; **83.0178**
Catechol	$C_6H_6O_2$	110,0366	2,65	2,696	2,656	109,0298	**109.0308**, 108.0225,96.9602; **91.0153;** 89.0244
Hydroxycinnamic derivatives							
Caffeic acid	$C_9H_8O_4$	180,0446	6,2	6,306	6,204	179,0356	179.0367,161.0325; **135.04595**, 134.0401, **109.0283, 61.9901**
Ferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	194,0584	13,08	12,994	A	193,0514	193.0521; **177.0602**; 164.9641; 149.0641; 134.0384
Isoferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	194,057	NS	16,813	16,72	193,0506	193.0515; 178.9886; 149.2177; 96.9549
Others							
Quinic acid	$C_7H_{12}O_6$	192,0644	0,55	0,553	A	191,0551	**191.0556;**173.0450;**147.0293**;145.0501**;129.0188**;87.0446
Dihydroquercetin	$C_{15}H_{12}O_7$	304,0557	NS	14,267	14,22	303,051	303.0528; 285.0332; 260.9191; **151.9627; 125.0254**; 110.9089

ND:no standard, A:Absent

715 Some of these microbial metabolites appeared in the ascending colon (AC) and
716 continued through the transverse colon (TC) and descending colon (DC), along with the
717 disappearance of parent phenolic compounds. The evolution of phenolic compounds
718 metabolites by families during the intake period (14 days) in the three colon regions (AC,
719 TC and DC) is shown in Fig. 6 to 12. The description of phenolic metabolites evolution
720 during the fermentation process of both ingredients was described by families as follows:

721 **Benzoic acids derivatives**: Benzoic acid derivatives are amongst the end-products
722 of gut microbiota metabolism of phenolic compounds (Williamson, et al., 2010; Stalmach,
723 Edwards, Wightman, & Crozier, 2013). The benzoic acids derivatives identified were 3,4-
724 dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid), 3,5-dihydroxybenzoic acid, salicylic acid, 3-
725 hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, syringic acid, gallic acid and benzoic acid
726 (Fig. 6). Benzoic acids derivatives have been described in a number of *in vitro* and *in vivo*
727 gut microbiota fermentations with phenolic compounds (Mosele, et al., 2015). As
728 previously reported, 3,4-dihydroxybenzoic acid could be formed through the B-ring
729 degradation of some phenolic compound such as anthocyanins or quercetin (Juaniz, et al.,
730 2016; Williamson, et al., 2010). Also 3,4-dihydroxyphenylacetic acid produced from
731 catabolic pathways of different phenolic compounds, could be degraded into 3,4-
732 dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid), and subsequently into hydroxybenzoic acids
733 and finally into benzoic acid (Mosele, et al., 2015; Stalmach, et al., 2013).

734 In the AC of both HPP-treated ingredients, the content of 3,4-dihydroxybenzoic
735 acid (protocatechuic acid) was increasing progressively towards the end of the intake
736 period. In the TC and DC, the content of 3,4-dihydroxybenzoic acid was higher for HPP-
737 treated apple ingredient although it showed a trend to decrease from day 1 to 14.

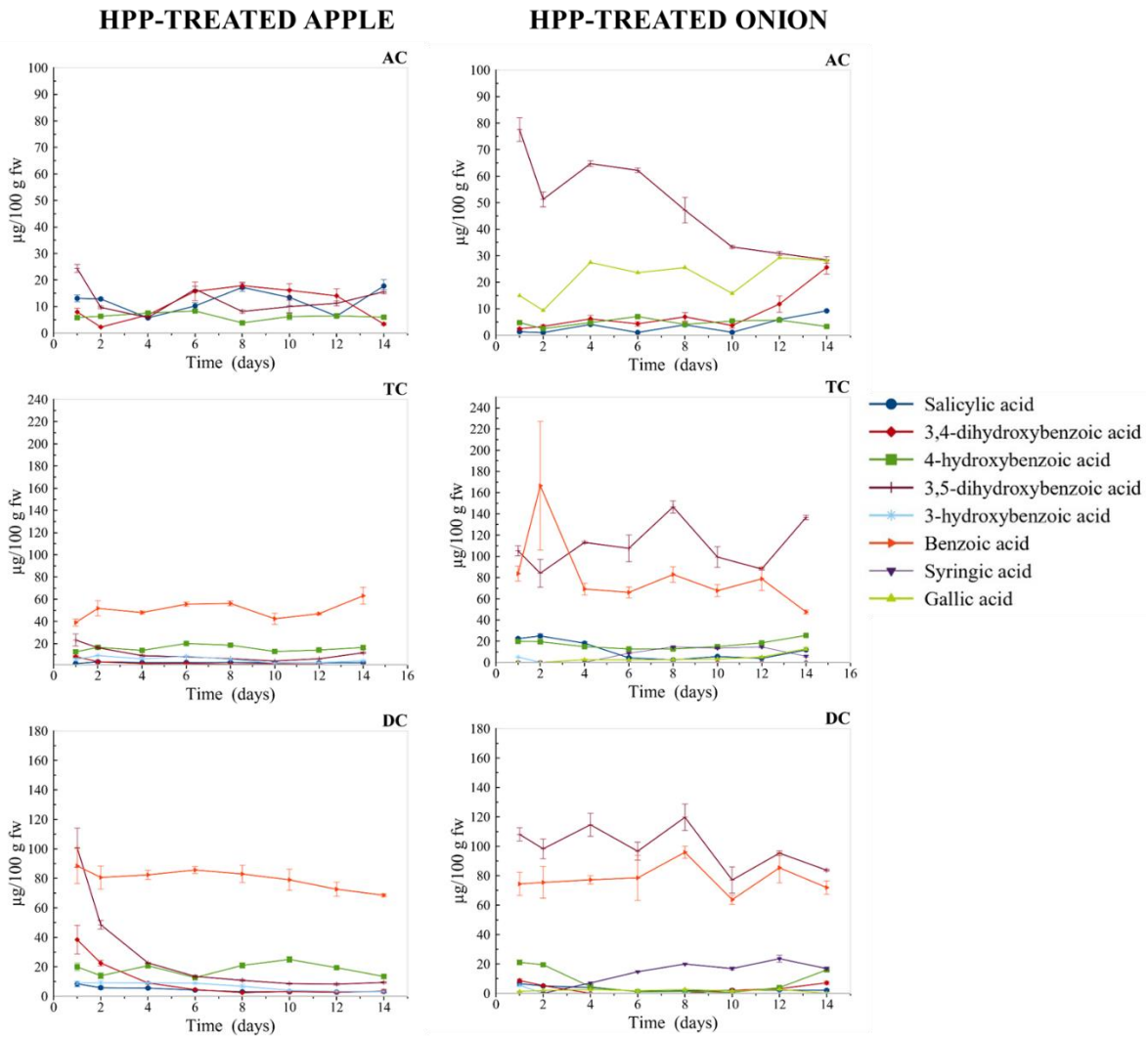


Figure 6: Mean values ± standard deviation (n=3) of the concentration (µg/100 g fw of slurry) of benzoic acids derivatives in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

738

739 3,5-dihydroxybenzoic acid was quantified in the three colon regions for both HPP-
740 treated ingredients. For HPP-treated apple, the content of 3,5-dihydroxybenzoic acid
741 showed a trend to decrease since day 1 in the three colon regions. In the TC and DC of
742 HPP-treated onion, 3,5-dihydroxybenzoic acid together benzoic acid were the most
743 abundant within this group of metabolites. However, only in the TC was observed a trend
744 to increase with a peak level on days 8 and 14 (146.56 and 136.62 µg/100 g fw,
745 respectively). This compound was also described as microbial metabolite in human faeces

albeit it content was not increased after the incorporation of a flavan-3-ols supplement (Sánchez-Patán, Monagas, Moreno-Arribas, & Bartolomé, 2011).

The derivative 3-hydroxybenzoic acid was only identified in the TC and DC of HPP-treated apple ingredient. Its content was higher from day 1 to 8 and lower in the last intake days (from day 10 to 14). The metabolite 4-hydroxybenzoic acid was quantified in the AC, TC and DC of both ingredients. This compound showed a non-uniform tendency during fermentation in the three colon regions in both ingredients. Benzoic acid was quantified in the TC and DC of both ingredients. The content of benzoic acid stood out within this group of metabolites in the TC and DC of both HPP-treated ingredients. However, non-significant differences ($p<0.05$) were observed during all the intake period. It could be highlighted the content of benzoic acid on day 2 of TC in the HPP-treated onion fermentation products (166.58 µg/100 g fw).

Gallic acid was found in the three colon regions of HPP-treated onion fermentation products, especially in the AC. The accumulation of gallic acid in the AC could be related with the presence of this compound in the initial ingredient. In the TC and DC, the level of gallic acid is lower than AC, although it content was increasing progressively. Similar to this, Cueva, et al. (2015) observed a rapid increase of gallic acid in the AC compartment of an *in vitro* red wine colonic metabolism. In that case, gallic acid was also presented in the initial red wine.

Also, syringic acid (3,4-dimethoxybenzoic acid) was only detected in the HPP-treated onion fermentation products since day 4 to 14 in the TC and DC. This compound was not detected in the initial matrix what that means its identification is related to gut metabolism. Some authors have indicated that syringic acid could be formed from gallic acid (Boto-Ordoñez, Urpi-Sarda, Queipo-Ortuno, Tulipani, Tinahones, & Andres-Lacueva, 2014).

771 Salicylic acid (2-hydroxybenzoic acid) was observed in the initial HPP-treated
772 apple and onion ingredients albeit at low concentrations (0.62 and 1.87 µg/100 fw,
773 respectively). In the fermentation products, a trend to increase the content of salicylic acid
774 was only observed in the AC of both ingredients. However, in the TC and DC, salicylic
775 acid was almost unaffected or instead decreased towards the end of the intake period. In
776 the study of Sánchez-Patán, et al. (2015) described the presence of salicylic in the initial
777 phenolic extract of grape and cranberry seeds and also during the incubation with gut
778 microbiota. However, contrary to our results, in that case the increase of salicylic acid was
779 observed towards the end of the incubation period (48 h) in the DC.

780 **Phenylacetic acids derivatives:** 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, homovanillic acid
781 (3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid), 4-hydroxyphenylacetic acid, 3-
782 hydroxyphenylacetic acid and phenylacetic acid were detected in the fermentation products
783 of both ingredients (Fig. 7).

784 Phenylacetic acid derivatives, specifically di- and mono- hydroxylated phenylacetic
785 acids, have been described by many authors as the main gut microbial metabolites from
786 quercetin and quercetin glycosides. The degradation pathway of quercetin starts with the
787 formation of dihydroquercetin (also identified in this study) which is further degraded into
788 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid thorough the C-ring fission. Subsequent degradation
789 forms the 3,4-dihydroxyphenylacetic acid which may be dehydroxylated to
790 hydroxyphenylacetic acids and phenylacetic acids (Mosele, et al., 2015; Serra, et al.,
791 2012). Although, some phenylacetic acids derivatives has been identified in the metabolic
792 pathways of different flavonoids (i.e flavan-3-ols) and phenolic acids, they have not been
793 described as the main metabolites of those phenolic compounds families (Parkar, et al.,
794 2013; Serra, et al., 2011).

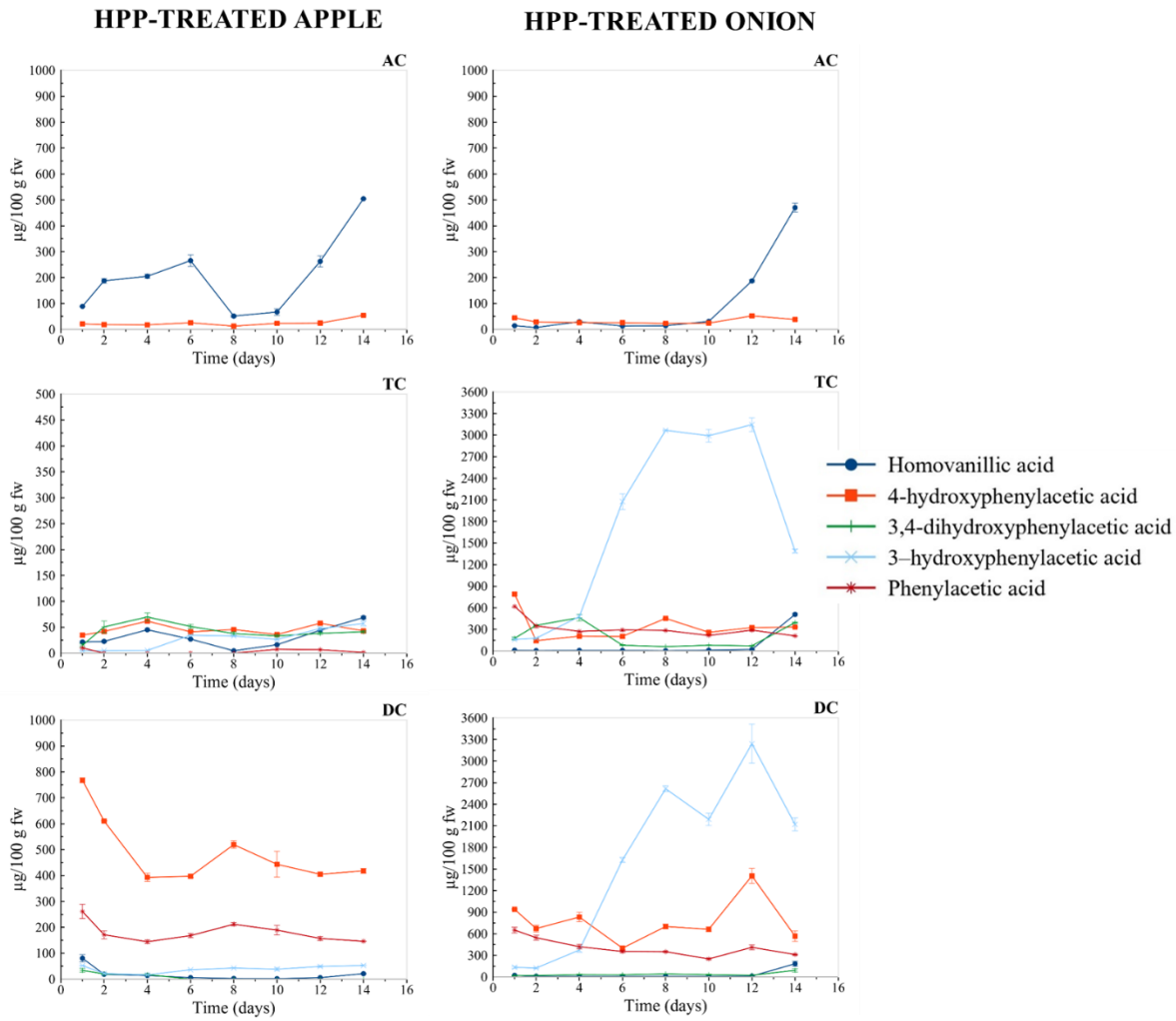


Figure 7: Mean values ± standard deviation (n=3) of the concentration (µg/100 g fw of slurry) of phenylacetic acids derivatives in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

Indeed, the phenylacetic acids derivatives were most abundant in the HPP-treated onion than HPP-treated apple fermented samples which could be related with the major flavonols content in the initial onion ingredient (6765.16 vs 187.87 µg/ g dw). 3,4-dihydroxyphenylacetic acid was present in the TC and DC of both ingredients. Its content was remarkable in the TC of HPP-treated onion fermentation products with a peak content on day 4 (462.66 µg/100 g fw).

3-hydroxyphenylacetic acid was not presented in the AC of any HPP-treated ingredients. In both TC and DC of HPP-treated onion fermentation products, 3-

803 hydroxyphenylacetic acid was increasing progressively from day 1 to 14, reaching a
804 concentration up to 1600 µg/100 g fw from sixth day. It was the major metabolite observed
805 in the whole fermentation process of HPP-treated onion ingredient. In the HPP-treated
806 apple ingredient, a progressive accumulation of this compound was only observed in the
807 TC albeit its content was quite lower than that observed in the HPP-treated onion. In line
808 with our results, Parkar, et al. (2013) showed that an *in vitro* batch fermentation of
809 quercetin generated higher amounts of 3-hydroxyphenylacetic acid than other phenolic
810 compounds such as chlorogenic acid and caffeic acid.

811 4-hydroxyphenylacetic acid was observed in the AC, TC and DC of both
812 ingredients fermentation products. A major content of this compound was observed on TC
813 and DC of HPP-treated onion products and on DC of HPP-treated apple. Phenylacetic acid
814 was only detected in the TC and DC showing a trend to decrease since day 1 to day14 for
815 both ingredients. A possible explanation is that compound could be originated before the
816 ingredients reached the colon. Gil Sánchez et al. 2018 detected the presence of
817 phenylacetic acid before the chronic feeding with grape pomace extract which could be
818 attributed to the metabolic activity of gut microbiota per se.

819 Homovanillic acid was observed in the three colon regions during the whole intake
820 period and for both ingredients. In the AC and TC, homovanillic showed a major content
821 on day 14 for both ingredients, being remarkable the increase in the TC of HPP-treated
822 onion products (50 times higher than first day). Homovanillic acid was one of the major
823 phenolic metabolites found in the HPP-treated apple particularly in the AC. It has been
824 mainly described in the quercetin aglycone degradation pathways (Serra, et al., 2012).

825 **Phenylpropionic acids derivatives:** Within the phenylpropionic acids derivatives
826 group were identified and quantified the following compounds: 3-(3-hydroxyphenyl)-
827 propionic acid, 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid, 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid

828 (also called dihydrocaffeic acid) and phenylpropionic acid (Fig. 8). These are expected to
829 be common metabolites products of different phenolic degradation pathways. It has been
830 described that progressive microbial transformations of phenylvaleric acids could result in
831 the appearance of phenylpropionic acid derivatives. In addition, after the deconjugation of
832 flavonoids and subsequent aglycones release and de-esterification of phenolic acids, latter
833 transformations (i.e. dehydroxylation, reduction and C-ring fission) allow the formation of
834 phenylpropionic acid derivatives (Mosele, et al., 2015; Selma, et al., 2009).

835 The presence of 3,4-dihydroxyphenylpropionic acid was more notable in the HPP-
836 treated apple than HPP-treated onion. In the AC, this metabolite was only observed at the
837 end of the intake period. In TC and DC was present during all the intake period reaching a
838 peak concentration, in both cases, on day 2.

839 The metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic acid was detected in the AC, TC
840 and DC during the whole intake period with both ingredients. In the HPP-treated onion,
841 this compound increased progressively in the three colon regions, reaching a maximum on
842 day 14. In the case of HPP-treated apple, the content of 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic
843 acid was similar among the three colon regions and higher than for HPP-treated onion.
844 This phenylpropionic acid derivative has been described during the chlorogenic acid
845 metabolic pathways. Indeed, after the cleavage of ester bond between caffeic acid and
846 quinic acid, subsequent transformation led the formation of 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic
847 acid (Ekbatan, et al., 2016).

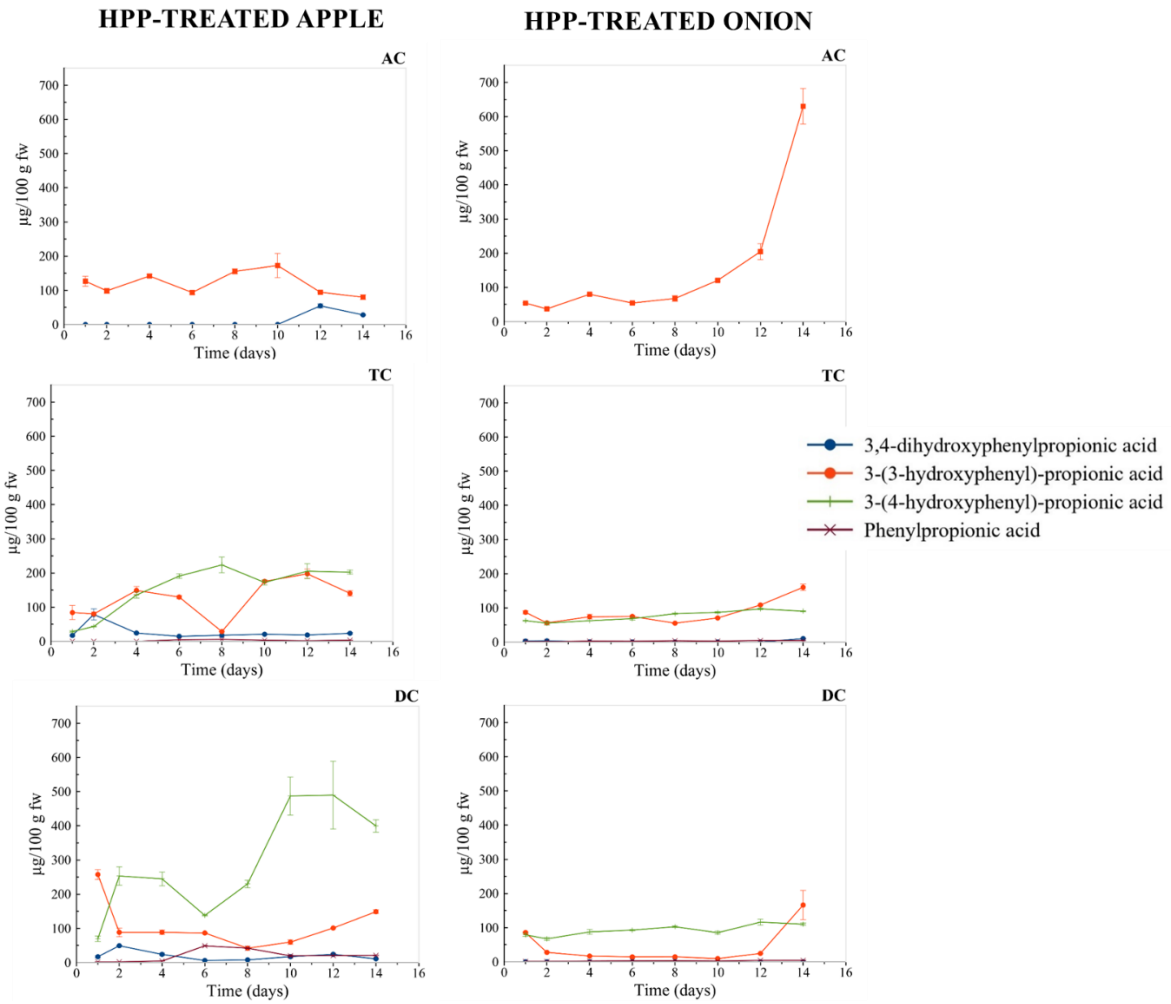


Figure 8: Mean values ± standard deviation (n=3) of the concentration (µg/100 g fw of slurry) of phenylpropionic acids derivatives in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

The metabolite 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid was not detected in the AC of any of the HPP-treated ingredients. In the TC and DC, this compound increased progressively towards the end of the intake period with both ingredients albeit it content seemed to be higher in HPP-treated apple fermentation products. For both HPP-treated ingredients, the content of both monohydroxylated phenylpropionic acids was higher than that found for the dihydroxylated form as observed in an *in vitro* faecal incubation of Concord grape juice (Stalmach, et al., 2013).

Phenylpropionic acid was detected in the last two colon regions but mainly in the DC and in this case, its content was higher in the HPP-treated apple fermentation products. Phenylpropionic acid has been described as a typical end metabolite of different phenolic degradation pathways but also as product of the gut basal medium fermentation. Gross, et al. (2010) identified this compound in both batch fermentation process of a blank (water and nutritive medium) and wine/grape and tea extracts.

Phenylvaleric acids derivatives: Several authors have proposed a metabolic pathway of flavan-3-ols that start with the formation of diaryl-propanols through the C-ring fission of monomeric flavan-3-ols and the subsequent formation of di- and hydroxyphenyl-γ-valerolactones and di- and hydrodroxyphenylvaleric acids. All of these compounds have been described as exclusives microbial metabolites of flavan-3-ols (Serra, et al., 2011). Mena, et al. (2019) noted that phenylvalerolactones and phenylvaleric acids are the main responsibles of flavan-3-ols bioavailability basis on the high percentage of these phenolic compounds that reach the colon intact (>70%).

In our study two phenylvaleric acids derivatives, 3-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid and 4-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid were identified in the HPP-treated apple fermentation products (Fig. 9). No identification of diaryl-propanols and hydroxyphenyl-γ-varelolactones was possible. These compounds have been described as initial or intermediate gut metabolites of flavan-3-ols (Sánchez-Patán, et al., 2012). The non-detection of these metabolites in any colon regions could be related with their rapid bioconversion to hydroxyphenylvaleric acids.

3-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid was identified from day 6 to 14 in the TC which could be related with the decrease of flavan-3-ols during this period in the same colon region. In the DC, this compound was identified from day 4 to 14 even in a major

880 concentration than those observed in the TC for the same day. 4-hydroxy-5-(phenyl)-
881 valeric acid was identified and quantified during all the intake period in the three colon
882 regions, albeit it concentration was quite constant.

In the study of Appeldoorn, Vincken, Aura, Hollman, and Gruppen (2009) were described both hydroxylated phenylvaleric acids after the *in vitro* gut microbiota fermentation of grape seeds procyanidins. Many authors have pointed out the formation of these compounds through the acid hydrolysis of phenylvalerolactones or by the reduction of dihydroxyphenylvaleric acids. The formation of 3-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid or 4-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid could be related with the probability of remove the 4 hydroxyl or 3 hydroxyl group by the gut microbiota (Stoupi, et al., 2010).

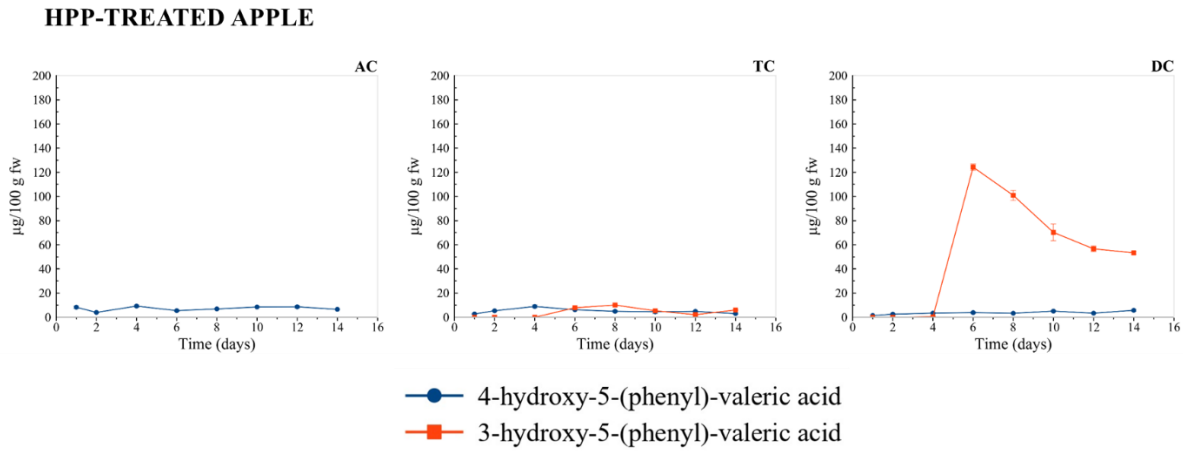


Figure 9: Mean values ± standard deviation (n=3) of the concentration (µg/100 g fw of slurry) of phenylvaleric acids derivatives in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

883
884 **Simple phenols:** With regards to simple phenols, two compounds were identified
885 and quantified in the colonic fermentation process of both ingredients, catechol and
886 phloroglucinol (Fig. 10). Both compounds are low molecular weight dihydroxy- and
887 trihydroxybencene derivatives characterized by containing a unique aromatic ring.

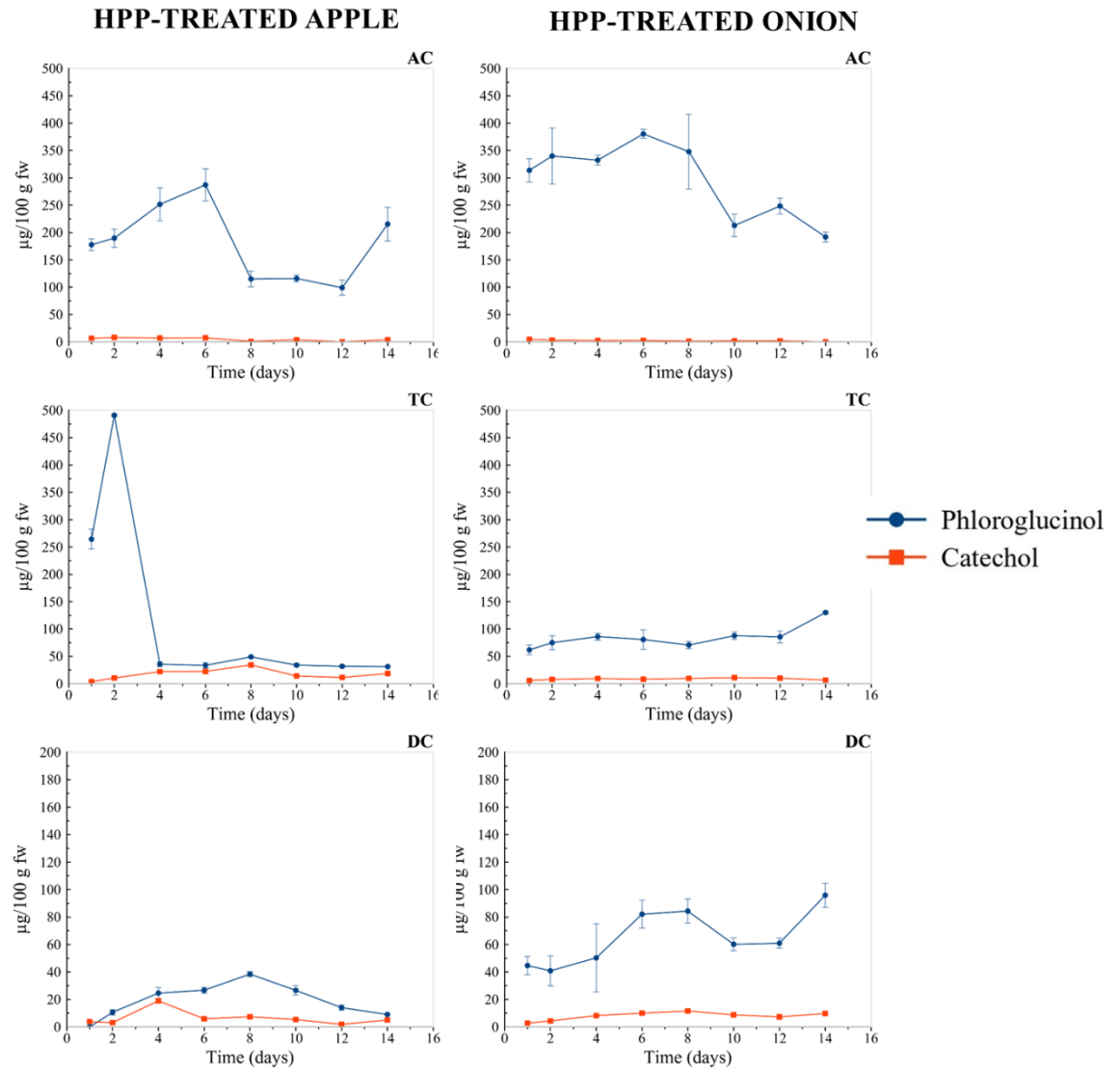


Figure 10: Mean values ± standard deviation (n=3) of the concentration (µg/100 g fw of slurry) of simple phenols in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

In general, the content of phloroglucinol in the HPP-treated onion fermentation products was higher than those observed for HPP-treated apple. Phloroglucinol was described by many authors as a compound resulted from the metabolism of quercetin, procyanidins, chalcones and dihydrochalcones (Selma, et al., 2009; Stalmach, et al., 2013; Williamson, Kay, & Crozier, 2018). Phloroglucinol could be formed from any flavonoid with hydroxyl group at 5 and 7 position of A-ring (Stalmach, et al., 2013). Total phenolic

compounds content in the initial HPP-treated onion ingredient (sum of flavonols) was higher than HPP-treated apple, which could explain the major content of phloroglucinol in the first one. In both ingredients, the production of this metabolite was higher in the AC respect to TC and DC. In HPP-treated onion fermentation products, phloroglucinol showed a major content from day 1 to 8, with non-significant differences (p<0.05) among them. In the TC and DC of the same ingredient, the content of phloroglucinol seemed to be higher on day 14. In the case of HPP-treated apple, the major content of phloroglucinol in the AC was observed on day 6. In the TC it content was higher on day 1 and 2 then it went down and remained constant (p<0.05).

Catechol was quantified during all the intake period for the three colon regions in both ingredients. Its concentration was similar between the AC, TC and DC in both ingredients. Catechol could be formed by the decarboxylation of protocatechuic acid (3,4-dihydroxybenzoic acid) (Mosele, Macia, Romero, & Motilva, 2016).

Hydroxycinnamic acids: Caffeic acid were found in the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients (Fig. 11). Among them, it should be noted the evolution of caffeic acid in the fermentation process of HPP-treated apple ingredient. The presence of caffeic acid during the intake period in the three colon regions could be correlated with the metabolism of chlorogenic acid and its isomers. Gut microbial metabolism of chlorogenic acid could result in the cleavage of ester bond between caffeic acid and quinic acid (Ekbatan, et al., 2016). Caffeic acid was presented in a major content in the AC of apple ingredient, also it was quantified during all the intake period in the TC and days 1 to 4 in the DC. Caffeic acid was also described as phenolic microbial metabolite during the *in vitro* batch culture fermentation of different fresh apple varieties albeit its content decreased significantly after 5 h of incubation (Koutsos, et al., 2017).

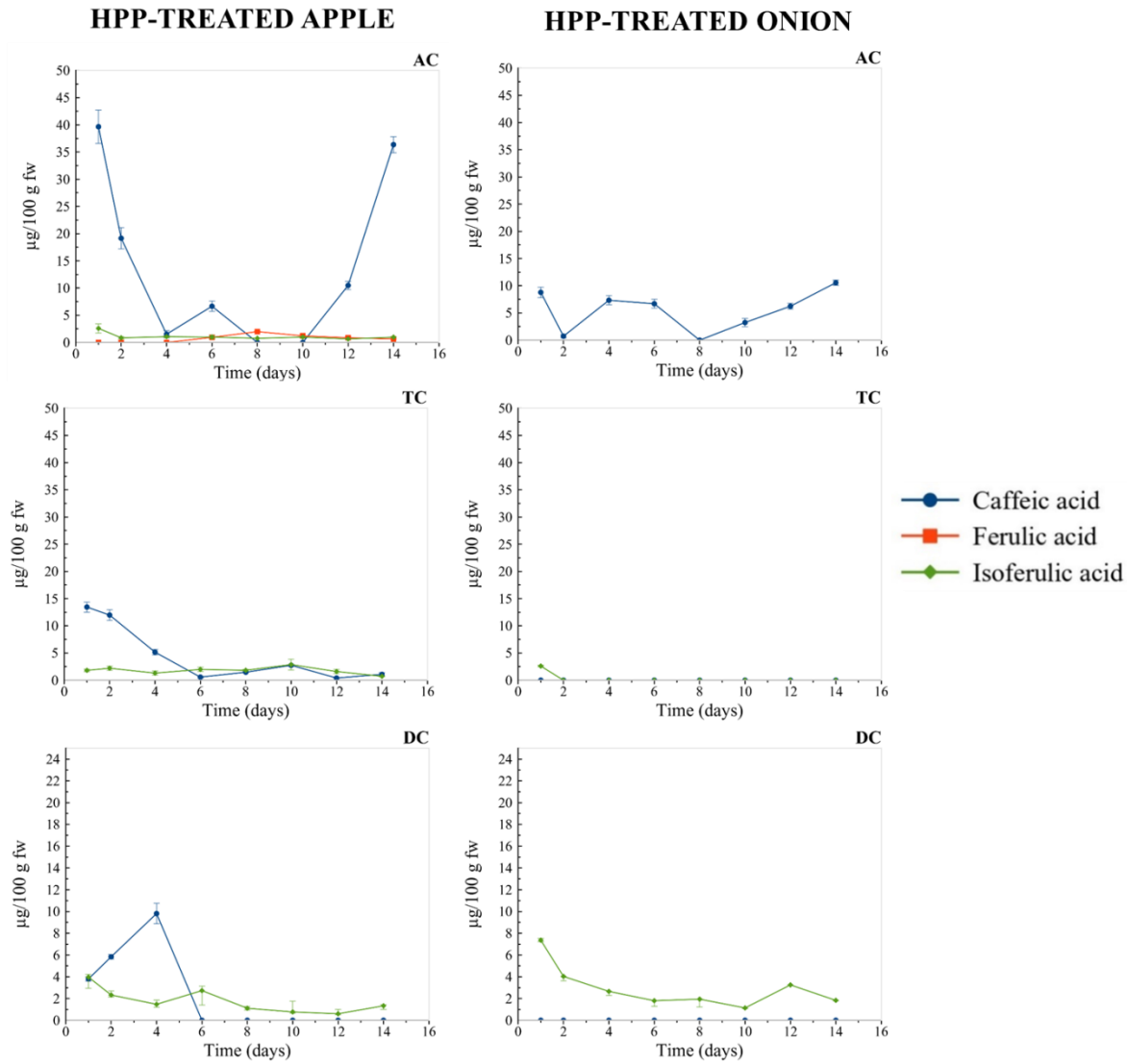


Figure 11: Mean values ± standard deviation (n=3) of the concentration (µg/100 g fw of slurry) of derived hydroxycinnamic acids in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

Ferulic and isoferulic acids were also detected in the AC of HPP-treated apple fermentation products from day 4 to day 14 but at lower concentration than caffeic acid. These two compounds have been described as products of the metabolism of caffeic acid esters (Rechner, Spencer, Kuhnle, Hahn, & Rice-Evans, 2001).

Caffeic acid was also found in the AC of HPP-treated onion fermentation products but at lower concentration than those observed in the AC of HPP-treated apple ingredients.

925 **Others metabolites:** Two compounds were identified as quinic acid and
926 dihydroquercetin (Fig. 12). Quinic acid was only detected in the AC and TC of HPP-
927 treated apple fermentation products. In the AC, quinic acid showed a major content since
928 day 1 to 6 with no significant (p<0.05) differences among them. In the TC was observed a
929 peak content on day 4. The presence of both quinic acid and caffeic acid suggests that gut
930 microbiota has the capacity to rapidly hydrolyse the caffeoylquinic acids (Stalmach,
931 Steiling, Williamson, & Crozier, 2010).

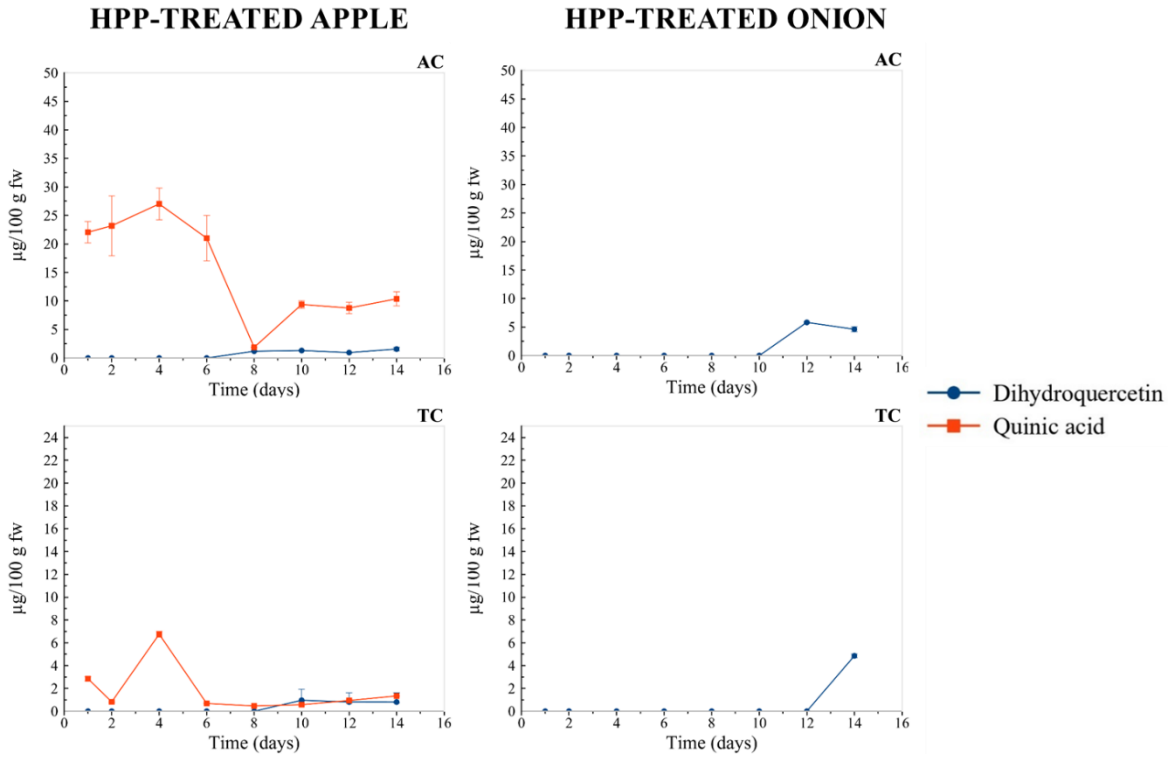


Figure 12: Mean values ± standard deviation (n=3) of the concentration (µg/100 g fw of slurry) of other compounds in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients.

932 Dihydroquercetin was only detected few days at the end of the intake period in the
933 AC and TC of both ingredients. This compounds also called taxifolin has been described as
934 an initial metabolite formed from quercetin which could be further metabolized to di- and
935 hydroxyphenylpropionic acids (Mosele, et al., 2015).

936 Several studies have revealed that some of the phenolic metabolites described
937 above can exert different beneficial properties on health. As example, 3,4-
938 dihydroxyphenylacetic acid whose content was higher during the fermentation process of
939 HPP-treated onion ingredient, have shown *in vitro* and *in vivo* antiproliferative (Gao, et al.,
940 2006), hepatoprotective (Xue, et al., 2016), antiinflammatory (Monagas, et al., 2009) and
941 antioxidant properties (Tang, et al., 2016). Hydroxyphenyl valeric acids derivatives,
942 exclusives metabolites of flavan-3-ols and only identified during the fermentation process
943 of HPP-treated apple ingredients may be the main responsibles for the biological effects of
944 flavan-3-ols, such as the cardioprotective effect (Hooper, et al., 2012; Mena, et al., 2019).
945 Also, 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic acid, identified in the fermentation process of both
946 ingredients but mainly in the HPP-treated apple, have shown its potential as vasodilator
947 even more than quercetin (Najmanova, et al., 2016). Therefore, a greater production and
948 accumulation of certain metabolites during the fermentation process of HPP-treated apple
949 ingredient respect to HPP-treated onion and vice versa, can lead to different biological
950 effects.

951 **3.4. Modulation of microbiota population**

952 A bidirectional relation between phenolic compounds and microbiota has been
953 suggested based on the role of colon microbiota in the metabolism of phenolics and at the
954 same time the influence of phenolic metabolites in the microbiota composition (Valdes,
955 Cuervo, Salazar, Ruas-Madiedo, Gueimonde, & González, 2015). By this reason, the
956 influence of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients on gut microbiota
957 population was evaluated. The colon microbial population analysed were
958 Enterobacteriaceae and anaerobic bacteria as indicators of total colon microbiota,
959 *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. considered part of beneficial bacteria,
960 *Clostridium* spp. and total coliforms as potential harmful colon bacteria (Fig. 13). An

961 increase in the anaerobic bacteria counts (1 log CFU/mL) was observed in the AC and DC
962 of HPP-treated apple, respect to the stabilization period (basal level). However, the
963 anaerobic bacteria content was stable during the HPP-treated onion intake period in the
964 three colon regions (AC, TC, DC). The level of Enterobacteriaceae decreased about 1.5 log
965 CFU/mL in the AC, and remained stable in the TC and DC, after the 14 days of intake with
966 both ingredients, respect to the basal level.

967 In the HPP-treated apple, a light decrease was observed in the AC (0.5 log
968 CFU/mL) and no changes were observed in the TC and DC at the end of the intake period,
969 respect to the basal level. In the case of HPP-treated onion, the level of *Clostridium* spp.
970 decreased in the three colon regions being more remarkable in the AC (1.5 log CFU/mL,
971 approximately). The level of total coliforms was reduced in the AC of both HPP-treated
972 apple and onion ingredients (1 and 1.5 log CFU/mL, respectively) and remained stable in
973 the TC and DC.

974 Respect to the beneficial bacteria population, the level of *Bifidobacterium* spp. and
975 *Lactobacillus* spp. increased in the three colon regions for both ingredients. The major
976 increment was observed in the AC of HPP-treated apple (2.5 log CFU/mL for both
977 populations) and HPP-treated onion (3 and 3.5 log CFU/mL, respectively).

978 Therefore, both HPP-treated ingredients seemed to favour the microbiota
979 composition balance thought the increment on *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp.
980 and a tendency to decrease the level of Enterobacteria, total coliforms and *Clostridium* spp.
981 Several studies have suggested that phenolic compounds supplied to gut microbiota
982 through different dietary sources and also phenolic metabolites produced may exert
983 selective prebiotic effects and antimicrobial activities against gut pathogenic bacteria
984 (Ozdal, et al., 2016; Valdes, et al., 2015). In the study of Duque, Monteiro, Adorno,

985 Sakamoto, and Sivieri (2016), the treatment with fresh and pasteurized orange juice
986 allowed a 1 log CFU increase on *Biffidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in the three
987 colon regions using the SHIME *in vitro* fermentation model. In the study by Koutsos, et al.
988 (2017), *Bifidobacterium* spp. was increased significantly (p<0.05) after the batch-culture
989 fermentation of fresh 'Renetta Canada' and 'Golden Delicious' apples compared to cellulose
990 and to a greater extent than the increase observed after inulin (a known prebiotic)
991 administration. The reduction of Enterobacteria and *Clostridium* spp. populations by
992 several phenolic compounds food sources have been reported. As example, Sánchez-Patán,
993 et al. (2015) observed a significant reduction in the Enterobacteriaceae population in the
994 ascending and descending colon after the *in vitro* fermentation of cranberry and grape seed
995 extract. In the other hand, an intervention study of flavan-3-ols cocoa (catechin and
996 epicatechin) in healthy volunteers limited the growth of *Clostridium histolyticum* group
997 (Tzounis, et al., 2011). Also, a red wine extract subjected to an *in vitro* fermentation
998 process showed a slight inhibition of the *Clostridium histolyticum* group (Sánchez-Patán, et
999 al., 2012).

1000 It is important to highlight that although both HPP-treated ingredients resulted in an
1001 increase of *Biffidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp., the increase obtained after the
1002 fermentation process of HPP-treated onion ingredient was higher than those observed in
1003 the HPP-treated apple, especially in the AC. This could be related with a major
1004 accumulation of some phenolic compounds and certain metabolites in the fermentation
1005 products of onion. Indeed, quercetin and 3-hydroxyphenylacetic acid, (the major
1006 metabolite observed in the HPP-treated onion fermentation products), increased the
1007 proliferation of *Bifidobacterium* longum, 61% and 35%, respectively, respect to the control
1008 sample (Parkar, et al., 2013).

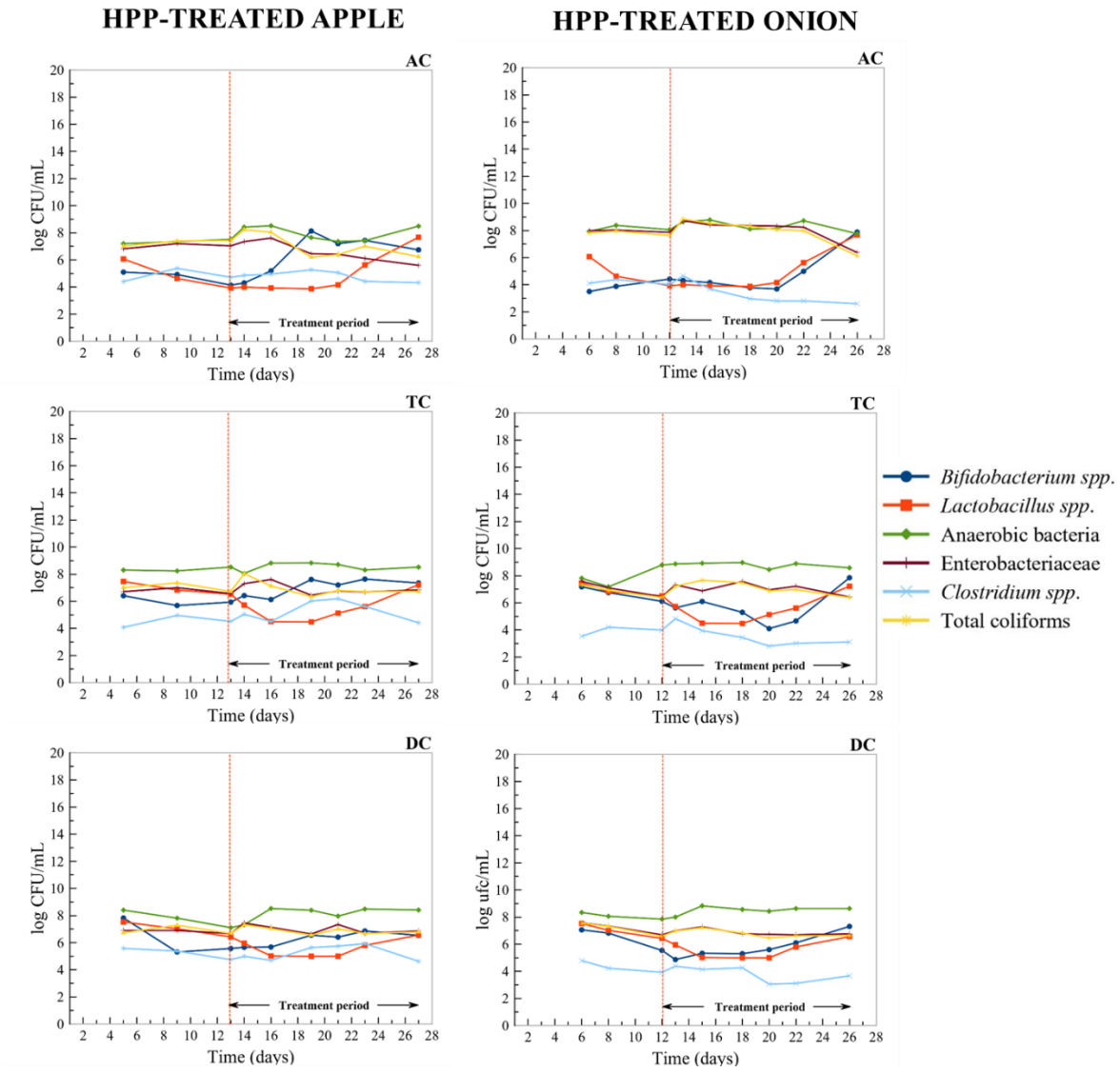


Figure 13: Changes in bacterial populations during the stabilization period and during the intake period with HPP-treated apple and onion ingredients. Results are expressed as log CFU/mL.

3.5. Short chain fatty acids content

The analysis of short chain fatty acids (SCFAs) in the fermentation products of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients was conducted. The SCFAs analysed were acetic acid (C2:0), propionic acid (C3:0) and butyric acid (C4:0) (Fig.14). Other minor fatty acids analysed were isobutyric acid (C4:0), valeric acid (C5:0), caproic acid (C6:0) and heptanoic acid (C7:0) (Fig. 15).

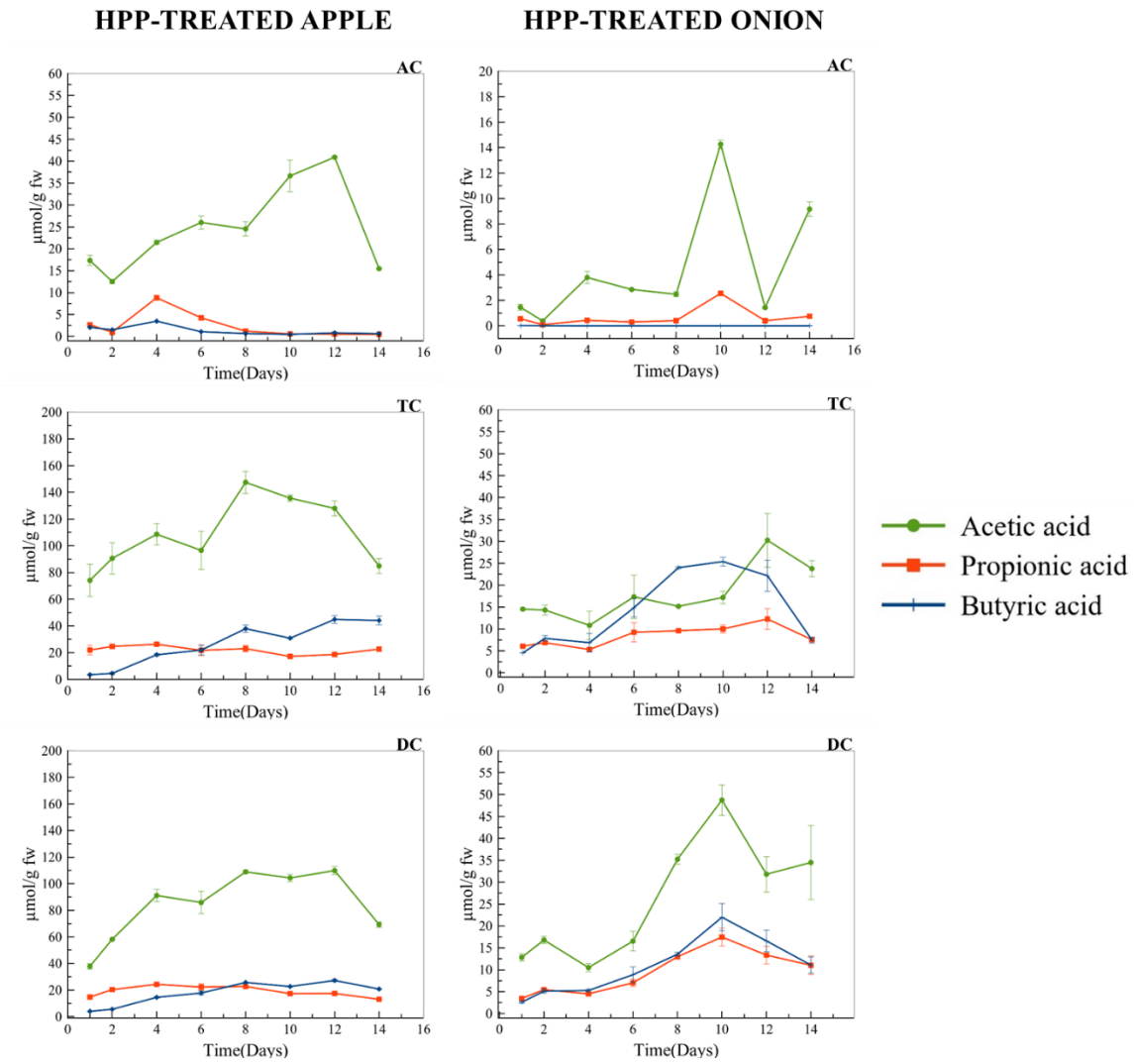


Figure 14: SCFAs (acetic, propionic and butyric acids) evolution in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients. Results are expressed as µmol/g fw of slurry.

The SCFAs content represented more than 95% of total fatty acids analysed. Acetic, propionic and butyric acids increased progressively in the three colon regions during the intake period with both ingredients, albeit its content was higher in the TC and DC (Fig. 14). Similar to our results, the content of acetic, propionic and butyric acids represented more than 90% of total SCFA analysed of *in vitro* cranberry and grape seed extracts fermentation samples. In this case, the content of these SCFA was also higher in the DC than in the AC (Sánchez-Patán, et al., 2015).

In the HPP-treated apple, the content of acetic acid stood out in the three colon regions, especially in the TC during all the intake period. Peak contents were observed on day 8 in the TC and DC (147.45 and 108.91 µmol/g fw of slurry, respectively) and on day 12 in the AC and also DC (40.90 and 109.84 µmol/g fw of slurry). Butyric acid was presented during all the intake period in the AC and its content was significantly (p<0.05) higher in the TC. In the TC was observed a trend to increase progressively the content of butyric acid since day 1 to 14. In general, propionic acid showed non-significant differences between TC and DC. Also, several apple varieties subjected to an *in vitro* batch fermentation process get to increase the level of acetic and propionic acids, and only a variety ('Renetta Canada') increased the level of butyric acid to a much greater extent compared to those observed for inulin and cellulose (Koutsos, et al., 2017).

In the HPP-treated onion products, acetic acid stands out in the AC and DC, which showed a peak content on day 10 of both colon regions (17.17 and 48.74 µmol/g fw of slurry, respectively). Butyric acid in the AC was only detected on day 1 and 2 but at lower concentration (≤ 0.02 µmol/g fw of slurry) and during all the intake period in the last two colon regions, mainly in the TC. The content of propionic acid in the AC was quite lower. In the TC and DC, the content of propionic acid was minor than those observed for acetic and butyric acids. Total SCFAs production was also higher in rats fed with an onion supplemented diet compared to control group (Pascoal, Filisetti, Alvares, Lajolo, & Menezes, 2013).

In summary, the continuous feeding of the system with both HPP-treated ingredients resulted in an accumulation of SCFA towards the end of the intake period. In the case of HPP-treated apple was obtained an increase of about 2 times for acetic and propionic acids and 7 times for butyric acid, respect to day 1 of the intake period. Respect to the HPP-treated onion ingredient was observed an increase of about 5 times for acetic

acid and butyric acid and 4 times for propionic acid respect to day 1. Therefore, the fermentation process of the HPP-treated apple ingredient resulted in a major accumulation of butyric acid, and in the case of HPP-treated onion, a major accumulation of acetic acid and propionic acid was observed. These differences could be again attributed to the phenolic compounds and metabolites identified in the AC, TC and DC of both ingredients. In line with our results, Parkar, et al. (2013) showed that *in vitro* batch fermentation of quercetin, whose content was especially greater in the AC fermentation products of HPP-treated onion respect to HPP-treated apple, resulted in the highest accumulation of propionic acid respect to other phenolic compounds. In the same study, caffeic acid, a metabolite identified during the whole intake period of the HPP-treated apple ingredient, showed the highest increment of butyric acid respect to other phenolic compounds such as quercetin.

Other minor fatty acids analysed were isobutyric acid, valeric acid, caproic acid, and heptanoic acid (Fig. 15). In general, a major content was observed in the DC for both HPP-treated ingredients. No production was observed in the AC, expect for caproic and heptanoic acids (0.28 and 0.23 µmol/g fw of slurry) on day 1 in the AC of HPP-treated apple fermentation products. In the TC of HPP-treated apple ingredient, only valeric acid was identified showing a tendency to increase towards the end of the intake period. However, all of these compounds were detected in the DC, highlighting the progressive increase of caproic acid. In the HPP-treated onion, these compounds were presented in the TC and in a higher content in the DC. In the TC was also remarkable the content of valeric acid with a peak level on day 10. In the DC, the major content was observed for caproic acid which also showed a peak level on day 10. Contrary to our results, Sánchez-Patán, et al. (2015) only observed an increment of isobutyiric in the AC during an *in vitro* gut fermentation of cranberry and grape seed polyphenols. However, non-significant

differences were found in the isobutyric, valeric, isovaleric, caproic and heptanoic acids content in the cecum of blackcurrant, blackberry and raspberry feeding Wistar rats (Jakobsdottir, et al., 2013).

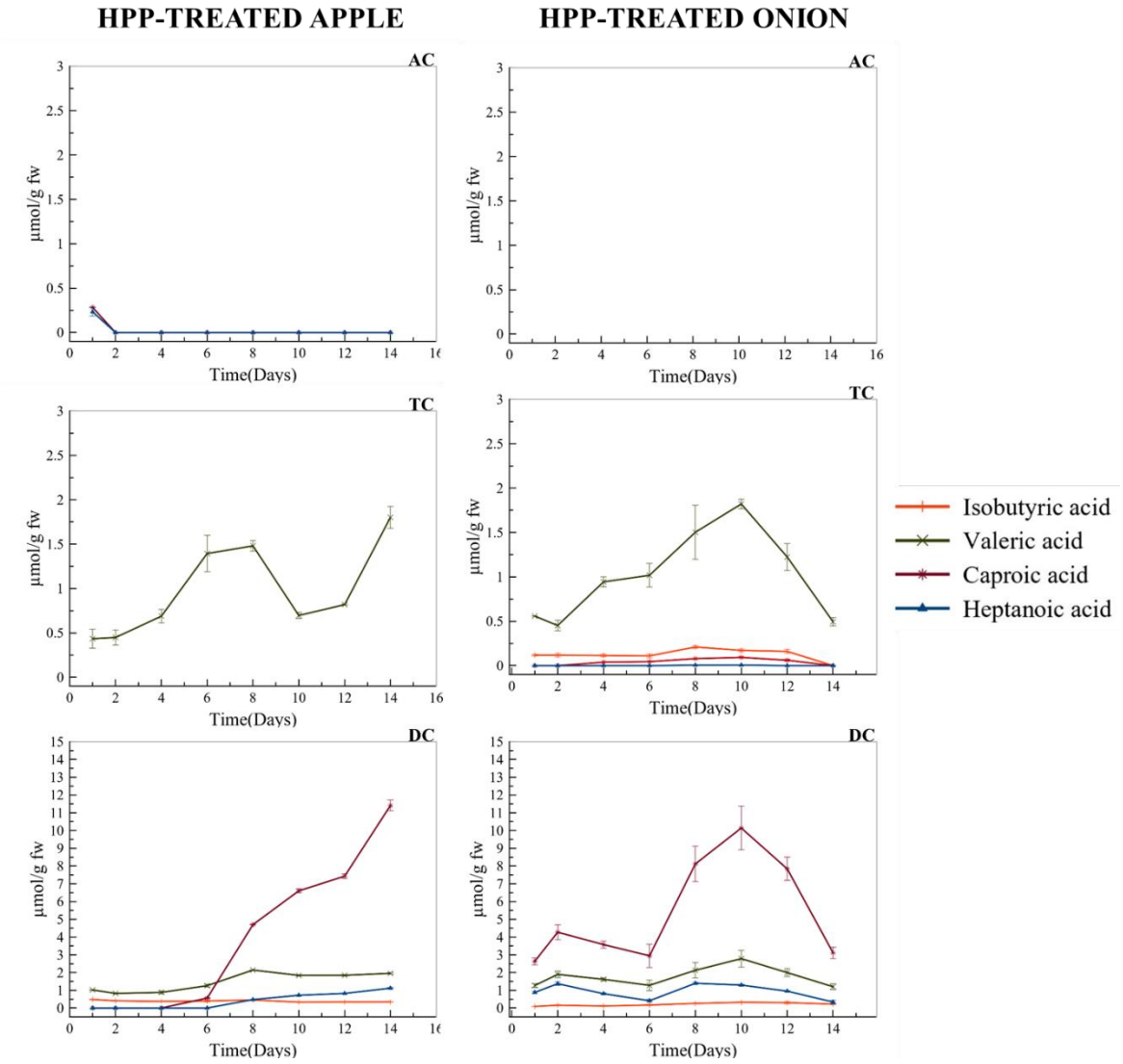


Figure 15: Minor SCFAs (valeric and caproic acids), isobutyric acid and heptanoic acid evolution in the ascending colon (AC), transverse colon (TC) and descending colon (DC) during the colonic fermentation of HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients. Results are expressed as µmol/g fw of slurry.

4. Conclusions

The dynamic *in vitro* gastrointestinal and fermentation digester used in this study was composed by different reactors that mimic the stomach, small intestine and the three

colon regions (ascending (AC), transverse (TC) and descending colon (DC)). To our knowledge, there is not much published studies about the microbiota metabolism of natural food sources of phenolic compounds treated by high hydrostatic pressure and subsequent lyophilisation.

In general, the phenolic metabolites profile in the three colon regions (AC, TC, DC) was quite different which could be attributable to different microbiota composition among them (Barroso, Cueva, Peláez, Martínez-Cuesta, & Requena, 2015). Therefore, to analyse properly the gut microbiota metabolism of phenolic compounds it requires the use of fermentation models that mimic the microbial and metabolic changes in the three colon regions.

It has been shown that a great percentage of phenolic compounds presented in the initial HPP-treated apple and HPP-treated onion ingredients reached the colon where they underwent an extensive metabolism by gut microbiota. The content of some phenolic compounds in the colon fermented samples was in accordance with the content in the initial samples such as chlorogenic acid, *p*-coumaroylquinic acid, Q-3-galactoside, Q-3-rhamnoside, procyanidin-B2, epicatechin, phloretin-2'-xyloglucoside and phloridzin in the HPP-treated apple or as Q-3,4'-diglucoside, Q-4'-glucoside and isorhamnetin-4'-glucoside in the HPP-treated onion ingredients. It was remarkable that only in the TC and DC of HPP-treated apple ingredient were detected some phenolic compounds such as *p*-coumaric acid.

Different benzoic acids, phenylacetic acids, phenylpropionic acids, phenylvaleric acids, simple phenols, phenolic acids and other compounds were detected as microbial metabolites of phenolic compounds from both HPP-treated ingredients. All of these compounds have also been described in the metabolic pathways of gut microbiota

metabolism of phenolic compounds (Mosele, et al., 2015; Serra, et al., 2011; Serra, et al., 2012). The evolution of different families of phenolic metabolites was analysed in the three colon regions and for both ingredients. It is worth to mention the differences observed in the concentration and evolution of certain phenolic metabolites between both ingredients. In the HPP-treated apple, was remarkable the content and evolution of caffeic acid whose metabolism seemed to be related to caffeoylquinic acids as described by many authors (Ekbatan, et al., 2016; Koutsos, et al., 2017). Quinic acid was also detected in the HPP-treated apple which emphasizes the metabolism of caffeoylquinic acids by colon microbiota. Some characteristics metabolites derived from flavan-3-ols microbial metabolism were detected in the HPP-treated apple, among which the evolution of 3-hydroxy-5-(phenyl)-valeric acid stood out. Many differences were also observed for phenylpropionic acids derivatives albeit for HPP-treated apple was remarkable the content of 3-(3-hydroxyphenyl)-propionic acid and 3-(4-hydroxyphenyl)-propionic acid. Respect to phenylacetic acids derivatives, a major content was observed for HPP-treated onion which could be related with the major content of flavonols since it has been described by many authors that phenylacetic acids constitute the main degradation products of quercetin and quercetin glycosides (Aura, 2008; Serra, et al., 2012). Although the content of benzoic acids derivatives was not the most outstanding, the evolution of some compounds can be pointed out such as 3,4-dihydroxybenzoic acid, benzoic acid and gallic acid in the HPP-treated onion and 3-hydroxybenzoic acid in the HPP-treated apple. Phloroglucinol, a simple phenol derived from gut metabolism of different phenolic families was also detected in both samples, especially in the AC.

In summary, phenolic compounds from two HPP-treated and lyophilized ingredients (apple and onion) were metabolized by colonic microbiota, leading to different phenolic metabolites profile in the different colon regions. The findings also suggest that

phenolic compounds and its metabolites could exert positive effects in the gastrointestinal health due to stimulation of beneficial bacteria. In this case, both ingredients led the increase in the *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. populations, albeit HPP-treated onion showed higher increases than the HPP-treated apple ingredient. The beneficial effects on microbiota composition for both ingredients can also be reflected in the increased production of SCFAs, mainly acetic, propionic and butyric acids. The intake period with HPP-treated apple ingredient allowed a major accumulation of butyric acid and the HPP-treated onion ingredient resulted in a major accumulation of acetic and propionic acids. Differences in the increase of beneficial bacteria and SCFAs production between both ingredients, could be attributable to the accumulation of certain phenolic compounds and phenolic metabolites during the intake period with the HPP-treated apple or HPP-treated onion ingredient. Also other minor fatty acids were analysed, among which highlighted the content of valeric acid in the TC and caproic acid in the DC of both ingredients. Data provide evidence that both ingredients, apple and onion, high-pressure processed and subjected to lyophilisation may be interesting as a rich dietary source of phenolic compounds with beneficial properties. However, differences on metabolites production and accumulation, microbiota modulation and SCFAs production could explain different beneficial properties derived from apple and onion consumption.

Acknowledgements

This study has been funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (MINECO) by the projects AGL2013-46326-R and AGL2016-76817-R.

REFERENCES

Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T., & Santos, C. N. (2014). *In*

vitro models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13*(4), 413-436.

Appeldoorn, M. M., Vincken, J. P., Aura, A. M., Hollman, P. C. H., & Gruppen, H. (2009). Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(3), 1084-1092.

Aura, A. M. (2008). Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews, 7*(3), 407-429.

Barroso, E., Cueva, C., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M. C., & Requena, T. (2015). Development of human colonic microbiota in the computer-controlled dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract SIMGI. *Lwt-Food Science and Technology, 61*(2), 283-289.

Benítez, V., Molla, E., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., López-Andreu, F. J., & Esteban, R. M. (2012). Onion (Allium cepa L.) by-products as source of dietary fiber: physicochemical properties and effect on serum lipid levels in high-fat fed rats. *European Food Research and Technology, 234*(4), 617-625.

Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Ward, N. C., Hodgson, J. M., & Croft, K. D. (2017). The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology, 69*, 243-256.

Boto-Ordoñez, M., Urpi-Sarda, M., Queipo-Ortuno, M. I., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Andres-Lacueva, C. (2014). High levels of Bifidobacteria are associated with increased levels of anthocyanin microbial metabolites: a randomized clinical trial. *Food & Function, 5*(8), 1932-1938.

Bouayed, J., Deusser, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry, 131*(4), 1466-1472.

Boyer, J., & Liu, R. H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal, 3*, 15.

Bradford, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry, 72*(1-2), 248-254.

Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M., & Maureira, H. (2011). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry, 128*(2), 520-529.

Cani, P. D., Van Hul, M., Lefort, C., Depommier, C., Rastelli, M., & Everard, A. (2019). Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nature Metabolism, 1*(1), 34-46.

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13*(2), 155-171.

Cardona, F., Andres-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuno, M. I. (2013). Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry, 24*(8), 1415-1422.

Castro-Gómez, F., Fontecha, J., & Rodríguez-Alcalá, L. M. (2014). A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta, 128*, 518-523.

Colina-Coca, C., Rodríguez-Alcalá, L. M., Fontecha, J., González-Peña, D., de Ancos, B., & Sánchez-Moreno, C. (2014). Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. *Food Research International, 64*, 546-552.

Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Muñoz-González, I., Esteban-Fernández, A., Gil-Sánchez, I., Dueñas, M., Martín-Álvarez, P. J., Pozo-Bayon, M. A., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2015). Application of a new Dynamic Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of red wine in colonic metabolism. *Food Research International, 72*, 149-159.

Cummings, J. H., Macfarlange, T., & Drasarb, D. (1989). *The gut microgflora and its significance.* :In Gastrointestinal Pathology.

De Boever, P., Deplancke, B., & Verstraete, W. (2000). Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *Journal of Nutrition, 130*(10), 2599-2606.

Dueñas, M., Surco-Laos, F., González-Manzano, S., González-Paramas, A. M., & Santos-Buelga, C. (2011). Antioxidant properties of major metabolites of quercetin. *European Food Research and Technology, 232*(1), 103-111.

Duque, A., Monteiro, M., Adorno, M. A. T., Sakamoto, I. K., & Sivieri, K. (2016). An exploratory study on the influence of orange juice on gut microbiota using a dynamic colonic model. *Food Research International, 84*, 160-169.

Ekbatan, S. S., Sleno, L., Sabally, K., Khairallah, J., Azadi, B., Rodes, L., Prakash, S., Donnelly, D. J., & Kubow, S. (2016). Biotransformation of polyphenols in a dynamic multistage gastrointestinal model. *Food Chemistry, 204*, 453-462.

Espín, J. C., González-Sarrias, A., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. *Biochemical Pharmacology, 139*, 82-93.

FAOSTAT. (2018). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops. Onions, dry. http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC, Accessed date: 21 April 2020.

Fernández-Jalao, I., Balderas, C., Sánchez-Moreno, C., & De Ancos, B. (2020). Impact of an *in vitro* dynamic gastrointestinal digestion on phenolic compounds and antioxidant activity of apple treated by high-pressure processing. *Manuscript submitted for publication*.

Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., & De Ancos, B. (2017). Influence of food matrix and high-pressure processing on onion flavonols and antioxidant activity during gastrointestinal digestion. *Journal of Food Engineering, 213*, 60-68.

Fernández-Jalao, I., Sánchez-Moreno, C., & De Ancos, B. (2019). Effect of high-pressure processing on flavonoids, hydroxycinnamic acids, dihydrochalcones and antioxidant activity of apple 'Golden Delicious' from different geographical origin. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 51*, 20-31.

Galdón, B. R., Rodríguez, C. T., Rodríguez, E. R., & Romero, C. D. (2008). Organic acid contents in onion cultivars (Allium cepa L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(15), 6512-6519.

Gao, K., Xu, A. L., Krul, C., Venema, K., Liu, Y., Niu, Y. T., Lu, J. X., Bensoussan, L., Seeram, N. P., Heber, D., & Henning, S. M. (2006). Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. *Journal of Nutrition, 136*(1), 52-57.

González-Peña, D., Colina-Coca, C., Char, C. D., Cano, M. P., de Ancos, B., & Sánchez-Moreno, C. (2013). Hyaluronidase inhibiting activity and radical scavenging potential of flavonols in processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*(20), 4862-4872.

González-Peña, D., Dudzik, D., García, A., De Ancos, B., Barbas, C., & Sánchez-Moreno, C. (2017). Metabolomic fingerprinting in the comprehensive study of liver changes associated with onion supplementation in hypercholesterolemic Wistar rats. *International Journal of Molecular Science. 2, 267.*

Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Najman, K., Drzewieck, J., Cvikrova, M., Martíncova, O., Katrich, E., & Trakhtenberg, S. (2008). Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(12), 4418-4426.

Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B., & Smith, B. (2002). Onions - A global benefit to health. *Phytotherapy Research, 16*(7), 603-615.

Gross, G., Jacobs, D. M., Peters, S., Possemiers, S., van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., & van de Wiele, T. (2010). *In vitro* bioconversion of polyphenols from black tea and red wine/grape juice by human intestinal microbiota displays strong interindividual variability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58*(18), 10236-10246.

Hartemink, R., & Rombouts, F. M. (1999). Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods, 36*(3), 181-192.

Hecke, K., Herbinger, K., Veberic, R., Trobec, M., Toplak, H., Stampar, F., Keppel, H., & Grill, D. (2006). Sugar-, acid- and phenol contents in apple cultivars from organic and integrated fruit cultivation. *European Journal of Clinical Nutrition, 60*(9), 1136-1140.

Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P. A., Cohn, J. S., Rimm, E. B., & Cassidy, A. (2012). Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *American Journal of Clinical Nutrition, 95*(3), 740-751.

Jakobek, L. (2015). Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry, 175*, 556-567.

Jakobsdottir, G., Blanco, N., Xu, J., Ahrné, S., Molin, G., Sterner, O., & Nyman, M. (2013). Formation of short-chain fatty acids, excretion of anthocyanins, and microbial diversity in rats fed blackcurrants, blackberries, and raspberries. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 1-12.

Juaniz, I., Ludwig, I. A., Bresciani, L., Dall'Asta, M., Mena, P., Del Rio, D., Cid, C., & de Peña, M. P. (2016). Catabolism of raw and cooked green pepper (Capsicum annuum) (poly)phenolic compounds after simulated gastrointestinal digestion and faecal fermentation. *Journal of Functional Foods, 27*, 201-213.

Kontula, P., Jaskari, J., Nollet, L., De Smet, I., von Wright, A., Poutanen, K., & Mattila-Sandholm, T. (1998). The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology, 50*(2), 246-252.

Koutsos, A., Lima, M., Conterno, L., Gasperotti, M., Bianchi, M., Fava, F., Vrhovsek, U., Lovegrove, J. A., & Tuohy, K. M. (2017). Effects of commercial apple varieties on human gut microbiota composition and metabolic output using an *in vitro* colonic model. *Nutrients, 9*(6), 23.

Krzysztoforska, K., Mirowska-Guzel, D., & Widy-Tyszkiewicz, E. (2019). Pharmacological effects of protocatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of *in vitro* and *in vivo* studies in rodents and humans. *Nutritional Neuroscience, 22*(2), 72-82.

Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C., Lodovici, M., Moneti, G., & Dolara, P. (2009). Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. *Molecular Nutrition & Food Research, 53*(8), 1044-1054.

Liguori, L., Califano, R., Albanese, D., Raimo, F., Crescitelli, A., & Di Matteo, M. (2017). Chemical composition and antioxidant properties of five white onion (Allium cepa L.) Landraces. *Journal of Food Quality*, 9.

Marzorati, M., Verhelst, A., Luta, G., Sinnott, R., Verstraete, W., Van de Wiele, T., & Possemiers, S. (2010). *In vitro* modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. *International Journal of Food Microbiology, 139*(3), 168-176.

Mena, P., Bresciani, L., Brindani, N., Ludwig, I. A., Pereira-Caro, G., Angelino, D., Llorach, R., Calani, L., Brighenti, F., Clifford, M. N., Gill, C. I. R., Crozier, A., Curti, C., & Del Rio, D. (2019). Phenyl-gamma-valerolactones and phenylvaleric acids, the main colonic metabolites of flavan-3-ols: synthesis, analysis, bioavailability, and bioactivity. *Natural Product Reports, 36*(5), 714-752.

Monagas, M., Khan, N., Andres-Lacueva, C., Urpi-Sarda, M., Vázquez-Agell, M., Lamuela-Raventos, R. M., & Estruch, R. (2009). Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *British Journal of Nutrition, 102*(2), 201-206.

Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordoves, C., Andres-Lacueva, C., & Bartolomé, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function, 1*(3), 233-253.

Mosele, J. I., Macia, A., & Motilva, M. J. (2015). Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: A Review. *Molecules, 20*(9), 17429-17468.

Mosele, J. I., Macia, A., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2016). Stability and metabolism of Arbutus unedo bioactive compounds (phenolics and antioxidants) under *in vitro* digestion and colonic fermentation. *Food Chemistry, 201*, 120-130.

Najmanova, I., Pourova, J., Voprsalova, M., Pilarova, V., Semecky, V., Novakova, L., & Mladenka, P. (2016). Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Molecular Nutrition & Food Research, 60*(5), 981-991.

Nebra, Y., & Blanch, A. R. (1999). A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology, 65*(11), 5173-5176.

Ornelas-Paz, J., Quintana-Gallegos, B. M., Escalante-Minakata, P., Reyes-Hernández, J., Pérez-Martínez, J. D., Rios-Velasco, C., & Ruíz-Cruz, S. (2018). Relationship between the firmness of Golden Delicious apples and the physicochemical characteristics of the fruits and their pectin during development and ripening. *Journal of Food Science and Technology-Mysore, 55*(1), 33-41.

Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J. B., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients, 8*(2), 36.

Parkar, S. G., Trower, T. M., & Stevenson, D. E. (2013). Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe, 23*, 12-19.

Pascoal, G. B., Filisetti, T. M. C. C., Alvares, E. P., Lajolo, F. M., & Menezes, E. W. (2013). Impact of onion (Allium cepa L) fructans fermentation on the cecum of rats and the use of *in vitro* biomarkers to assess *in vivo* effects. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 1*(1), 89-97.

Patel, R. V., Mistry, B. M., Shinde, S. K., Syed, R., Singh, V., & Shin, H. S. (2018). Therapeutic potential of quercetin as a cardiovascular agent. *European Journal of Medicinal Chemistry, 155*, 889-904.

Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C., & Lacroix, C. (2012). Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modeling. *Trends in Biotechnology, 30*(1), 17-25.

Pérez, A., González-Manzano, S., Jiménez, R., Pérez-Abud, R., Haro, J. M., Osuna, A., Santos-Buelga, C., Duarte, J., & Pérez-Vizcaino, F. (2014). The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: Correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacological Research, 89*, 11-18.

Plaza, L., Colina, C., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., & Cano, M. P. (2012). Influence of ripening and astringency on carotenoid content of high-pressure treated persimmon fruit (Diospyros kaki L.). *Food Chemistry, 130*(3), 591-597.

Primec, M., Micetic-Turk, D., & Langerholc, T. (2017). Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. *Analytical Biochemistry, 526*, 9-21.

Rastogi, N. K., Raghavarao, K., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 47*(1), 69-112.

Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Moore, K. P., & Rice-Evans, C. A. (2004). Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine, 36*(2), 212-225.

Rechner, A. R., Spencer, J. P. E., Kuhnle, G., Hahn, U., & Rice-Evans, C. A. (2001). Novel biomarkers of the metabolism of caffeic acid derivatives *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine, 30*(11), 1213-1222.

Ribas-Agusti, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58*(15), 2531-2548.

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms, 7*(1), 22.

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition, 57*(1), 1-24.

Russell, W. R., Labat, A., Scobbie, L., Duncan, G. J., & Duthie, G. G. (2009). Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. *Food Chemistry, 115*(1), 100-104.

Sánchez-Patán, F., Barroso, E., van de Wiele, T., Jiménez-Girón, A., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., Martínez-Cuesta, M. C., Peláez, C., Requena, T., & Bartolomé, B. (2015). Comparative *in vitro* fermentations of cranberry and grape seed polyphenols with colonic microbiota. *Food Chemistry, 183*, 273-282.

Sánchez-Patán, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G. E., Gibson, G. R., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2012). Gut microbial catabolism of grape seed flavan-3-ols by human faecal microbiota. Targetted analysis of

precursor compounds, intermediate metabolites and end-products. *Food Chemistry, 131*(1), 337-347.
Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2011). Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*(6), 2241-2247.
Schloissnig, S., Arumugam, M., Sunagawa, S., Mitreva, M., Tap, J., Zhu, A., Waller, A., Mende, D. R., Kultima, J. R., Martín, J., Kota, K., Sunyaev, S. R., Weinstock, G. M., & Bork, P. (2013). Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature, 493*(7430), 45-50.
Selma, M. V., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57*(15), 6485-6501.
Serra, A., Macia, A., Romero, M. P., Angles, N., Morello, J. R., & Motilva, M. J. (2011). Metabolic pathways of the colonic metabolism of procyanidins (monomers and dimers) and alkaloids. *Food Chemistry, 126*(3), 1127-1137.
Serra, A., Macia, A., Romero, M. P., Reguant, J., Ortega, N., & Motilva, M. J. (2012). Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry, 130*(2), 383-393.
Singh, A. K., Cabral, C., Kumar, R., Ganguly, R., Rana, H. K., Gupta, A., Lauro, M. R., Carbone, C., Reis, F., & Pandey, A. K. (2019). Beneficial effects of dietary polyphenols on gut microbiota and strategies to improve delivery efficiency. *Nutrients, 11*(9), 21.
Sinha, N. K. (2012). Chapter 22: Apples and pears, production, physicochemical and nutritional quality, and major products. In N. K. Sinha, J. S. Sidhu, J. S. B. Barta, J. Wu & M. P. Cano (Eds.), *Handbook of Fruits and Fruit Processing* (pp. 365-383).
Slimestad, R., Fossen, T., & Vagen, I. M. (2007). Onions: A source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*(25), 10067-10080.
Stalmach, A., Edwards, C. A., Wightman, J. D., & Crozier, A. (2013). Colonic catabolism of dietary phenolic and polyphenolic compounds from Concord grape juice. *Food & Function, 4*(1), 52-62.
Stalmach, A., Steiling, H., Williamson, G., & Crozier, A. (2010). Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. *Archives of Biochemistry and Biophysics, 501*(1), 98-105.
Stoupi, S., Williamson, G., Drynan, J. W., Barron, D., & Clifford, M. N. (2010). A comparison of the *in vitro* biotransformation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research, 54*(6), 747-759.
Tang, Y., Nakashima, S., Saiki, S., Myoi, Y., Abe, N., Kuwazuru, S., Zhu, B. W., Ashida, H., Murata, Y., & Nakamura, Y. (2016). 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid is a predominant biologically-active catabolite of quercetin glycosides. *Food Research International, 89*, 716-723.
Teshika, J. D., Zakariyyah, A. M., Zaynab, T., Zengin, G., Rengasamy, K. R. R., Pandian, S. K., & Fawzi, M. M. (2019). Traditional and modern uses of onion bulb (Allium cepa L.): a systematic review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59*, S39-S70.
Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2019). Effect of food structure and processing on (poly)phenol-gut microbiota interactions and the effects on human health. In M. P. Doyle & D. J. McClements (Eds.), *Annual Review of Food Science and Technology, Vol 10* (Vol. 10, pp. 221-238). Palo Alto: Annual Reviews.

Tsao, R., Yang, R., Christopher, J., Zhu, Y., & Zhu, H. H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51*(21), 6347-6353.

Tu, S. H., Chen, L. C., & Ho, Y. S. (2017). An apple a day to prevent cancer formation: Reducing cancer risk with flavonoids. *Journal of Food and Drug Analysis, 25*(1), 119-124.

Tzounis, X., Rodríguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G. R., Kwik-Uribe, C., & Spencer, J. P. E. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition, 93*(1), 62-72.

USDA, United States Department of Agriculture. Fresh apples, grapes, and pears: World markets and trade. (2019). https://www.fas.usda.gov/data/fresh-apples-grapes-and-pears-world-markets-and-trade. Accesed date: 17 February 2020.

Valdes, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., & González, S. (2015). The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food & Function, 6*(8), 2424-2439.

Van de Wiele, T. R., Oomen, A. G., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., Cornelis, C., Rompelberg, C. J. M., De Zwart, L. L., Klinck, B., Van Wijnen, J., Verstraete, W., & Sips, A. (2007). Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 42*(9), 1203-1211.

Vázquez-Gutiérrez, J. L., Plaza, L., Hernando, I., Sánchez-Moreno, C., Quilés, A., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2013). Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. *Food & Function, 4*(4), 586-591.

Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleivelan, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., & Wichers, H. (2015). *The Impact of food bioactives on health. In Vitro and Ex Vivo models*: Springer International Publishing.

Vinholes, J., Silva, B. M., & Silva, L. R. (2015). Hydroxycinnamic acids (HCAS): Structure, biological properties and health effects. In *Advances in Medicine and Biology* (Vol. 88): Nova Science Publishers.

Waldecker, M., Kautenburger, T., Daumann, H., Busch, C., & Schrenk, D. (2008). Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *Journal of Nutritional Biochemistry, 19*(9), 587-593.

Wang, W. Y., Sun, C. X., Mao, L. K., Ma, P. H., Liu, F. G., Yang, J., & Gao, Y. X. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology, 56*, 21-38.

Williamson, G., & Clifford, M. N. (2010). Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity? *British Journal of Nutrition, 104*, S48-S66.

Williamson, G., Kay, C. D., & Crozier, A. (2018). The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17*(5), 1054-1112.

Xue, H. T., Xie, W. Y., Jiang, Z. H., Wang, M., Wang, J., Zhao, H. Q., & Zhang, X. Y. (2016). 3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, attenuates acetaminophen (APAP)-induced liver injury through activation of Nrf-2. *Xenobiotica, 46*(10), 931-939.

CAPÍTULO V:

DISCUSIÓN GENERAL

SECCIÓN 1: Obtención de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por altas presiones hidrostáticas.

Una parte del **objetivo 1** durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral fue estudiar el efecto del procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) sobre los compuestos fenólicos de manzana 'Golden Delicious' y de cebolla 'Recas', principalmente sobre el flavonol quercetina y sus derivados glicosilados. Manzana y cebolla son consideradas las principales fuentes dietéticas de estos flavonoles en base al elevado consumo de estos dos vegetales en todo el mundo. Además, se seleccionaron las variedades 'Golden Delicious' de manzana y 'Recas' de cebolla por ser las de mayor producción en España.

Inicialmente se estudiaron manzanas 'Golden Delicious' procedentes de dos orígenes geográficos distintos, Aragón (España) (manzana-E) (clima de tierras bajas, cálido y seco) y norte de Italia (manzana-I) (clima de montaña, frío y húmedo) con el fin de comprobar la importancia de seleccionar no sólo la variedad de una determinada fruta sino también conocer su origen geográfico (condiciones medioambientales, métodos de cultivo, tratamientos pre- y postcosecha, etc.) a la hora de diseñar un tratamiento por altas presiones hidrostáticas (APH). En función del material vegetal seleccionado, el procesado puede contribuir a mantener o incrementar las características antioxidantes y bioactivas del producto tratado respecto al no tratado.

Ambas manzanas (España e Italia) presentaron un grado de madurez similar y dentro de los parámetros físico-químicos comerciales indicados para 'Golden Delicious' (ºBrix, 13 y 11; pH, 3,64 y 3,72; acidez titulable, 0,12 y 0,13%, respectivamente). La cebolla 'Recas' estudiada procedía de la Huerta de Carabaña, zona de cultivo en la ribera del río Tajuña en Madrid, y presentó el grado de madurez comercial para las cebollas de este tipo (ºBrix, 7,4; pH, 5,3; acidez, 0,07%).

En manzana se ensayaron distintos tratamientos de alta presión a 400, 500 y 600 MPa a una temperatura máxima de procesado de 35 ºC y con un tiempo de duración de 5 minutos. Estos tratamientos fueron inicialmente ensayados con el fin de seleccionar aquel que mejores resultados diera en cuanto al mantenimiento o incluso incremento de la extracción de compuestos fenólicos. Las condiciones de procesado ensayadas (400, 500 y 600 MPa, 35 ºC y 5 minutos) se seleccionaron en base a trabajos previamente publicados que mostraban la necesidad de aplicar los tratamientos de altas presiones hidrostáticas a 35

ºC, como mínimo, para conseguir el mayor grado de inactivación de las enzimas polifenoloxidasa (PPO) y peroxidasa (POD). Estas enzimas, y en especial la PPO, son difíciles de inactivar por APH llegando a ser frecuente la activación de las mismas (Terefe *et al.*, 2014). Para la cebolla se seleccionó el tratamiento a 400 MPa/25 ºC/5 min en base a los buenos resultados obtenidos en términos de extracción de compuestos fenólicos en estudios previos realizados por el grupo de investigación (González-Peña *et al.*, 2013).

Los productos de manzana y cebolla procesadas por APH fueron liofilizados y pulverizados con el objetivo de obtener ingredientes de manzana y cebolla en polvo de fácil uso como aditivo, con una elevada vida útil y que serán utilizados en los estudios de simulación de digestión gastrointestinal y fermentación colónica empleando un modelo dinámico.

1.1. Caracterización de los compuestos fenólicos solubles de los ingredientes de manzana 'Golden Delicious' y cebolla 'Recas' sin procesar por APH.

La separación, identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos solubles tanto de manzana (artículos 1 y 3) como de cebolla (artículo 2) se realizó mediante análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS y HPLC-DAD utilizando una metodología similar a la descrita por otros autores con algunas modificaciones (González-Peña *et al.*, 2013; Jakobek *et al.*, 2013) y empleando distintas bases de datos (FoodDB, PhenolExplorer, Pubchem).

En el ingrediente de manzana en polvo, se analizaron los compuestos fenólicos utilizando dos métodos de extracción diferentes. Se realizó una extracción con una solución tradicional de un disolvente orgánico en agua, metanol/agua (80:20, v/v). También se ensayó la extracción con un tampón fosfato-salino (PBS) por considerar que estas condiciones de extracción podrían ser más parecidas a las que tienen lugar durante la digestión gastrointestinal que las disoluciones con disolventes orgánicos tradicionalmente utilizadas.

En el extracto hidrometanólico de las manzanas, se identificaron 22 compuestos fenólicos pertenecientes a diferentes grupos o familias: flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, y dihidrochalconas.

El grupo mayoritario de compuestos fenólicos en los extractos hidrometanólicos fue el de los flavan-3-oles que representaba el 65% de los compuestos fenólicos totales. La concentración de flavan-3-oles totales en la manzana-E (2321,69 µg/g ps, peso seco) fue un 20% mayor que en la manzana-I (1855,90 µg/g ps). Se identificaron los siguientes compuestos en orden decreciente de concentración: procianidina B2, epicatequina, trímero y tetrámero de epicatequina, procianidina B1, un dímero de epicatequina y catequina.

El segundo grupo más abundante en el extracto hidrometanólico con un 23% de participación en la concentración total de compuestos fenólicos en ambas manzanas (España e Italia) fueron los ácidos hidroxicinámicos, principalmente ácido clorogénico (626,0 y 592,64 µg/g ps, respectivamente), seguido en orden decreciente de concentración por dos de sus isómeros, ácidos criptoclorogénico y neoclorogénico, y un derivado del ácido cumárico, el ácido *p*-cumaroil quínico.

Los flavonoles constituyeron aproximadamente el 10% del contenido total de compuestos fenólicos en ambas manzanas. La concentración de flavonoles totales en el extracto hidrometanólico fue un 31% mayor en la manzana-I (341,05 µg/g ps) que en la manzana-E (261,11 µg/g ps). Este grupo estaba formado por derivados glicosilados de quercetina (Q), que en orden decreciente de concentración fueron: Q-3-*O*-ramnósido, Q-3-*O*-galactósido, Q-3-*O*-xilósido, Q-3-*O*-glucósido, Q-3-*O*-arabinósido y Q-3-*O*-rutinósido. También se identificó a la quercetina aglicona.

El grupo minoritario fue el de las dihidrochalconas (4% del contenido total de compuestos fenólicos) en manzana-E y en manzana-I, constituido fundamentalmente por florizina y floretin-2'-xiloglucósido.

Por tanto, los compuestos fenólicos mayoritarios en ambas manzanas fueron: procianidina B2 y epicatequina (flavan-3-oles), ácido clorogénico (ácidos hidroxicinámicos), Q-3-galactósido y Q-3-ramnósido (flavonoles) y por último florizina (dihidrochalconas).

Si bien el perfil de compuestos fenólicos fue similar en las manzanas 'Golden Delicious' procedentes de España e Italia, y estuvo en línea con lo publicado para esta variedad de manzanas (Lamperi *et al.*, 2008; Alarcón-Flores *et al.*, 2015), la concentración de compuestos fenólicos individuales y totales por grupo fue diferente dependiendo del origen geográfico de la manzana. Así, la manzana-E presentó un contenido en flavan-3-oles y dihidrochalconas un 20% superior que la manzana-I, mientras que ésta última

mostró un mayor contenido en flavonoles (23%). La concentración de ácidos hidroxicinámicos fue similar en ambas manzanas. Por tanto, parece claro que el contenido de compuestos fenólicos estuvo condicionado por factores relacionados con el origen geográfico de ambas manzanas. Además de las diferentes condiciones climatológicas (clima caluroso y seco en España; clima frío y húmedo en Italia) pueden existir otras variables relacionadas con las prácticas agrícolas, los tratamientos pre- y postcosecha, etc. que también influyen en la composición fenólica de esta fruta (Lamperi *et al.*, 2008).

El análisis de los extractos obtenidos con PBS de los ingredientes en polvo de manzana (España e Italia) mostraron una composición cualitativa de compuestos fenólicos similar a la obtenida con la solución de metanol/agua (80:20, v/v) pero en una menor concentración. Los extractos obtenidos con tampón PBS de manzana-E y manzana-I mostraron una menor concentración en flavonoles totales (30% y 47%, respectivamente), ácidos hidroxicinámicos (36% y 13 %, respectivamente), flavan-3-oles (74% y 68%, respectivamente) y dihidrochalconas (51% y 29%, respectivamente), en comparación con los resultados obtenidos con la solución hidrometanólica. Resultados similares utilizando PBS como disolvente de extracción de compuestos fenólicos fueron obtenidos por otros autores (Vijayalaxmi *et al.*, 2015). Por tanto, la extracción con PBS puede subestimar el contenido real de compuestos fenólicos en estas muestras y tampoco reproduce las condiciones que se dan durante una digestión gastrointestinal donde tienen lugar cambios de pH, temperatura, concentración salina, movimientos peristálticos, etc. Por tanto, en los siguientes estudios de la presente Tesis Doctoral se decidió emplear la extracción tradicional con metanol/agua (80:20, v/v).

El ingrediente de cebolla 'Recas' presentó un perfil fenólico compuesto fundamentalmente por flavonoles, principalmente derivados glucosilados (mono-, di- y tri-glucósidos) de quercetina aglicona (Q) así como diferentes glucósidos de isoramnetina (mono- y di- glucósidos). Los flavonoles mayoritarios fueron Q-3,4'-diglucósido y Q-4'-glucósido, representando aproximadamente un 58% y un 32,5% del total de flavonoles. El resto de compuestos identificados fueron (en orden decreciente de concentración): isoramnetina-4'-glucósido, quercetina, isoramnetina-3,4'-diglucósido, Q-3-glucósido, Q-7,4'-diglucósido y Q-3,7,4'-triglucósido. Un ingrediente de cebolla similar pero obtenido de cebolla 'Recas' de otra zona de cultivo (Cataluña, España) fue previamente caracterizado por el grupo de investigación (González-Peña *et al.*, 2013).

La concentración de los compuestos fenólicos totales determinados por HPLC-DAD fue significativamente superior en cebolla (8651 µg/g ps, exclusivamente flavonoles) que en manzana-E (3492,59 µg/g ps, de los que flavonoles fueron 264,1 µg/g ps) y en manzana-I (3032,01µg/g ps, de los que flavonoles fueron 341,1 µg/g ps). Aunque el contenido de flavonoles (principalmente derivados glicosilados de quercetina) fue superior en cebolla que manzana, ambos vegetales han sido considerados fuentes dietéticas de estos compuestos (Slimestad *et al.*, 2007; Bondonno *et al.*, 2017), los cuales se han relacionado con importantes efectos beneficiosos para la salud (Sharma *et al.*, 2018). La manzana además destacó por su alto contenido en otros compuestos fenólicos como el ácido clorogénico, epicatequina, procianidina B2 y florizina relacionados con los efectos saludables del consumo de esta fruta y productos derivados (Boyer y Liu, 2004).

1.2. Caracterización de los compuestos fenólicos solubles de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH. Influencia de la matriz vegetal y del procesado.

El estudio del efecto del procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) sobre los compuestos fenólicos de manzanas 'Golden Delicious' procedentes de dos orígenes geográficos distintos, Aragón (España) (manzana-E) y norte de Italia (manzana-I) (artículos 1 y 3) y de cebolla variedad 'Recas' (artículo 2) se planteó como un estudio preliminar con el objetivo de seleccionar aquellos tratamientos de APH que serán utilizados en los siguientes ensayos para evaluar el efecto combinado de la matriz vegetal (manzana y cebolla) y el procesado (APH) sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos.

Los tratamientos por APH (400, 500 y 600 MPa/35 ºC/ 5 min) aplicados a las manzanas 'Golden Delicious' procedentes de dos zonas geográficas distintas (Aragón-España y norte de Italia) y a cebolla 'Recas' (Carabaña, Madrid, España) (400 MPa/25 ºC/5 min) no modificaron el perfil fenólico identificado en las correspondientes muestras sin tratar.

El efecto del procesado por APH sobre el contenido de compuestos fenólicos de las manzanas 'Golden Delicious' dependió de la intensidad del tratamiento, así como de su origen geográfico. De manera general, el tratamiento de 400 MPa/35 ºC/5 min en la manzana-E y el de 600 MPa/35 ºC/5 min en la manzana-I fueron los que mostraron los

mejores resultados incrementando la concentración de compuestos fenólicos en el extracto hidrometanólico. En la manzana-E, el procesado a 400 MPa/35 ºC/5 min incrementó de forma significativa (p<0,05) la extracción de los flavonoles totales (30%) respecto a las muestras sin tratar (principalmente, Q-3-ramnósido, Q-3-galactósido, Q-3-glucósido, Q-3-arabinósido y Q-3-xilósido). El mismo tratamiento por APH incrementó significativamente (p<0,05), pero en menor grado (3%), la concentración de flavan-3-oles (fundamentalmente procianidina B2, catequina y dímero de epicatequina) y no modificó el contenido total de dihidrochalconas (florizina y floretin-2'-xiloglucósido). Sin embargo, la concentración de ácidos hidroxicinámicos totales extraídos disminuyó un 13% (principalmente ácido clorogénico). En la manzana-E, el tratamiento por APH de mayor intensidad (600 MPa/35 ºC/5 min) dio lugar a una reducción significativa (p<0,05) del contenido de compuestos fenólicos, sobre todo de los compuestos mayoritarios de cada grupo: procianidina B2, ácido clorogénico, derivados de quercetina, florizina y floretin-2'-xiloglucósido.

Sin embargo, el tratamiento de 600 MPa/35 ºC/5 min en la manzana-I dio lugar a un efecto contrario al observado en la manzana-E ya que, en este caso, aumentó la extracción de los compuestos fenólicos totales (53%), 75% la concentración de flavonoles totales (principalmente Q-3-rutinósido, Q-3-galactósido y Q-3-glucósido), 58% el contenido de flavan-3-oles (epicatequina, trímero y dímero de epicatequina y procianidina B2), 29% la concentración de ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico y ácido *p*-cumaroil quínico) y 63% la concentración de dihidrochalconas.

El procesado de cebolla 'Recas' a 400 MPa/25 ºC/5 min también incrementó la concentración de flavonoles totales en el extracto hidrometanólico (13%). Los flavonoles mayoritarios que incrementaron su concentración en la cebolla-APH fueron: Q-3,4'-diglucósido (5%), Q-4'-glucósido (30%), isoramnetina-4-glucósido (5%) y Q-3-glucósido (14%). Sin embargo, estudios anteriores realizados por el grupo de investigación utilizando el mismo tratamiento de APH (400 MPa/25 ºC/5 min) con la misma variedad de cebolla pero procedente de otra región (Cataluña, España) y distinto año de recolección, mostraron mayores incrementos para los compuestos Q-4'-glucósido (63,2%) y Q-3,4'-diglucósido (69,6%) (González-Peña *et al.*, 2013).

Al igual que lo observado con las manzanas 'Golden Delicious' de diferentes orígenes geográficos, los distintos resultados obtenidos con la aplicación de un mismo procesado por APH (400 MPa/25 ºC/5 min) en cebollas de la misma variedad pueden estar

relacionados con factores relacionados con la distinta zona geográfica de producción (Madrid y Cataluña) y con el diferente año en el que fueron recolectadas.

Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de seleccionar el material vegetal de partida en el diseño de cada tratamiento por APH para conseguir incrementar la concentración de compuestos fenólicos lo que permitiría funcionalizar el producto. El aumento o la disminución de la concentración de compuestos fenólicos extraídos en las muestras tratadas por APH puede estar relacionado con distintos factores, entre ellos se destacan los siguientes: i) Los tratamientos por APH producen la disrupción de la pared celular en los tejidos de los alimentos vegetales favoreciendo la liberación de compuestos fenólicos al espacio extracelular y por tanto su extracción (Roldán-Marín *et al.*2009; Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2013); ii) La reducción de los compuestos fenólicos tras el tratamiento por APH podría estar relacionado con la actividad residual de las enzimas polifenoloxidasa y la peroxidasa. La inactivación de estas enzimas depende de la intensidad, temperatura y duración del tratamiento y de otros factores como la composición de la matriz alimentaria (Koutchma *et al.*, 2016).

1.3. Caracterización de la actividad antioxidante de los ingredientes de manzana y cebolla. Influencia de la matriz vegetal y del procesado por APH.

Los mecanismos de acción de los compuestos fenólicos en el organismo humano no son completamente conocidos, si bien en numerosos estudios han demostrado ser potentes antioxidantes gracias a su capacidad de neutralizar el exceso de especies reactivas de oxígeno y radicales libres que se producen en una situación de estrés oxidativo (Williamson, 2017).

El estudio de la actividad antioxidante (AA) de los ingredientes de manzana (artículos 1 y 3) y cebolla (artículo 2) no tratadas y tratadas por APH se realizó utilizando cuatro métodos distintos: capacidad secuestrante del radical 2,2'-difenil-1-picrilhidracil ($DPPH^{\bullet}$) y del radical catión 2,2´-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato ($ABTS^{\bullet+}$), capacidad reductora del ion férrico (FRAP) y fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu (TP-FC).

En general, la manzana-I mostró mayor AA medida por TP-FC y FRAP que la manzana-E. Sin embargo, la manzana-E presentó una mayor AA determinada por $ABTS^{\bullet+}$

y $DPPH^{\bullet}$ que la manzana-I. Por tanto, la manzana-I mostró mayor capacidad reductora y la manzana-E mayor capacidad de atrapar radicales libres. Estas diferencias pueden estar relacionadas con la naturaleza de los compuestos fenólicos mayoritarios en ambos tipos de manzana. Así, la manzana-I presentó una mayor concentración de flavonoles y en la manzana-E se observó una mayor concentración de flavan-3-oles y dihidrochalconas.

Los tres tratamientos por APH (400, 500 y 600 MPa/35 ºC/5 min) afectaron a la AA de las manzanas de forma distinta en función de su origen geográfico, al igual que lo observado con los compuestos fenólicos. En la manzana-I, el tratamiento a 600 MPa/35 ºC/5 min dio lugar a un incremento de la AA medida por los 4 métodos, comparado con la manzana-I no tratada, TP-FC (41,7%), FRAP (13%), $DPPH^{\bullet}$ (30%) y $ABTS^{\bullet+}$ (20%). Sin embargo, en la manzana-E, los tres tratamientos por APH redujeron la AA, TP-FC (14-47%), FRAP (15-48%), $DPPH^{\bullet}$ (16-54%) y $ABTS^{\bullet+}$ (25-57%), si bien el tratamiento a 400 MPa fue el que mostró la menor reducción de la AA, siendo también el tratamiento, de los tres ensayados, que mejor conservó el contenido de compuestos fenólicos de esta manzana.

La disminución de la actividad antioxidante como consecuencia del procesado por APH también ha sido descrito en otras variedades de manzana (Landl *et al.*, 2010; Briones-Labarca *et al.*, 2011) lo que podría relacionarse con la destrucción de los compuestos antioxidantes debido a distintos factores como la presencia de oxígeno ocluido en las muestras o con el efecto de la actividad residual de enzimas como la polifenoloxidasa (Terefe *et al.*, 2014). Los valores de AA de manzana medidos por los cuatro métodos se correlacionaron de forma positiva con el contenido de compuestos fenólicos totales (suma de compuestos individuales por HPLC) en manzana-E (R= 0,723-0,889) y manzana-I (R= 0,755-0,945).

En la cebolla 'Recas' (Carabaña, Madrid), el procesado por APH (400 MPa/25 ºC/5 min) no modificó la capacidad reductora (FRAP y TP-FC) ni la capacidad de capturar radicales libres ($ABTS^{\bullet+}$). Sin embargo, estudios previos realizados por el grupo de investigación con cebolla de la misma variedad, pero de diferente procedencia (Cataluña) y año de cultivo, observaron que el mismo tratamiento por APH (400 MPa/25 ºC/5 min) incrementó un 25,4% la AA determinada por $ABTS^{\bullet+}$ y un 15% por FRAP, respecto las muestras no tratadas (González-Peña *et al.*, 2013). El incremento o disminución de la AA como consecuencia de un tratamiento por APH se puede relacionar con la extracción o destrucción de compuestos antioxidantes (compuestos fenólicos, ácido ascórbico, etc.) (Oey *et al.*2008b).

Por tanto, de forma similar a lo observado en los compuestos fenólicos, el efecto de las APH sobre la actividad antioxidante de manzanas 'Golden Delicious' de orígenes geográficos distintos y sobre cebolla 'Recas' depende de las condiciones del procesado por APH utilizadas, así como del tipo de matriz vegetal, a su vez influenciada por factores relativos al origen geográfico.

1.4. Caracterización físico-química, química, bioquímica y microbiológica de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH.

El ingrediente de manzana 'Golden Delicious' procesada por altas presiones hidrostáticas (APH) a 400 MPa/35 ºC/5 min presentó valores similares a los del ingrediente de manzana no tratada para pH, acidez titulable, ácidos orgánicos (málico, cítrico, fumárico, acético) y azúcares (fructosa, glucosa y sacarosa). El ingrediente de cebolla 'Recas' procesada por un tratamiento similar de APH (400 MPa/25 ºC/5 min), comparado con el ingrediente de cebolla no tratada, tampoco modificó sus valores de pH, acidez titulable y ácidos orgánicos, pero mostró un incremento del 30% de glucosa. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los tratamientos por APH modifican mínimamente la estructura química de los compuestos relacionados con las características nutricionales y sensoriales de los alimentos vegetales (como los azúcares y ácidos orgánicos, responsables del sabor y aroma) (Oey *et al.*2008b).

Sin embargo, el tratamiento por APH en manzana (400 MPa/35 ºC/5 min) y en cebolla (400 MPa/25 ºC/5 min) dio lugar a una disminución del 21% y 35% de ácido ascórbico, respectivamente, y del 4,4% y 22% de vitamina C total (ácido ascórbico + ácido dehidroascórbico). En ambos ingredientes, manzana y cebolla, se observó una mayor pérdida de ácido ascórbico que de vitamina C total, lo que podría deberse a que los tratamientos por APH pudieron favorecer la oxidación del ácido ascórbico a dehidroascórbico, quizás debido a la presencia de oxígeno ocluido en el material vegetal o debido a la acción de la actividad de determinadas enzimas como la peroxidasa (POD) (Balasubramaniam *et al.*, 2016). Dado que los dos tratamientos por APH utilizados para manzana y cebolla fueron similares, la mayor pérdida de ácido ascórbico y vitamina C en cebolla que en manzana puede estar relacionado con el efecto de la matriz. En este sentido, la cebolla presenta un pH más alto (pH 5,34) que la manzana (pH 3,64) y es conocido que los compuestos bioactivos son mejor preservados en tejidos a pH<4,5.

En la manzana 'Golden Delicious', no se observaron diferencias significativas (p<0,05) en el contenido de fibra total antes y después del procesado por APH. Sin embargo, el tratamiento por APH dio lugar a una disminución de fibra insoluble (4%) y un aumento de la fibra soluble (24%). Esta redistribución de fibra insoluble a fibra soluble se ha observado en otros productos vegetales procesados por APH (Xie *et al.*, 2017). Sin embargo, en la cebolla 'Recas' procesada por APH, el contenido de fibra total, soluble e insoluble fue significativamente (p<0,05) mayor (14%, 15% y 23%, respectivamente) que en la cebolla sin procesar. De nuevo las diferencias obtenidas en el contenido de fibra tras aplicar un tratamiento similar por APH en manzana y cebolla pueden relacionarse con el efecto de la matriz vegetal.

Por otro lado, el tratamiento por APH en las manzanas dio lugar a un aumento de las pectinas totales (8%) y del grado de esterificación (32%). Estos resultados muestran que las APH dan lugar a la despolimerización de las pectinas presentes en la pared celular favoreciendo su solubilidad y disminuyendo así la unión entre las cadenas pécticas y en consecuencia provocar la pérdida de la integridad de la pared celular y por tanto la liberación de compuestos bioactivos.

Los ingredientes de manzana y cebolla tratadas por APH presentaron un menor contenido de proteínas (85% y 40%, respectivamente) que las muestras no tratadas debido a una posible desnaturalización proteica ocasionada por el tratamiento por APH (Terefe *et al.*, 2010). Este efecto tiene como consecuencia la reducción de la actividad de la enzima peroxidasa (POD) en manzana y cebolla (55% y 29%). En cambio, los tratamientos por APH utilizados en manzana y cebolla no consiguieron inactivar la enzima polifenoloxidasa (PPO).

Los ingredientes de manzana y cebolla mostraron una buena calidad microbiológica. Los recuentos de aerobios mesófilos totales iniciales fueron bajos en los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH (2,57 ± 0,04 y 3,48 ± 0,02 log UFC/g ps, respectivamente). Después de 24 meses de almacenamiento a 4 ºC, sólo se incrementaron en 1 unidad logarítmica.

SECCIÓN 2: Efecto de la digestión gastrointestinal dinámica *in vitro* sobre la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por altas presiones hidrostáticas.

El proceso de digestión gastrointestinal contribuye a la liberación de compuestos fenólicos presentes en la matriz vegetal e influye en su absorción, disponibilidad y posterior utilización por el organismo. De este hecho, se deriva la necesidad de estudiar la estabilidad de los compuestos fenólicos durante las diferentes etapas de la digestión gastrointestinal y cuantificar la concentración de compuestos fenólicos capaces de ser absorbidos a nivel del intestino delgado (bioaccesibilidad). La estructura química de los compuestos fenólicos, la matriz alimentaria que los contiene, las interacciones con otros componentes del alimento o de la dieta, así como el tipo de procesado de dicho alimento son algunos de los factores que influyen (favoreciendo / obstaculizando) la liberación de estos compuestos durante la digestión gastrointestinal y que consecuentemente afectan a su bioaccesibilidad (Ribas-Agusti *et al.*, 2018).

Entre los factores que pueden influir en la liberación de los compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal, se han estudiado principalmente el efecto de la matriz alimentaria y el efecto del procesado por altas presiones hidrostáticas (APH). El efecto de la matriz se estudió utilizando los ingredientes obtenidos a partir de dos productos vegetales distintos, manzana y cebolla, siendo ambos considerados importantes fuentes dietéticas de quercetina y sus derivados glicosilados. El estudio del efecto del procesado sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos se realizó comparando los ingredientes obtenidos de manzana y cebolla procesadas por APH con los ingredientes obtenidos a partir de los correspondientes productos sin procesar.

Por tanto, para la consecución del **objetivo 2** de la presente Tesis Doctoral se llevó a cabo el estudio del efecto de las diferentes fases de digestión gastrointestinal (DGI) sobre la estabilidad y bioaccesibilidad de compuestos fenólicos en general y sobre los derivados de quercetina (flavonoles) en particular presentes en los dos ingredientes en polvo obtenidos a partir de manzana 'Golden Delicious' y de cebolla 'Recas'. El mismo estudio de DGI se realizó sobre un suplemento dietético de quercetina con el fin de comparar los resultados obtenidos del proceso de DGI de los ingredientes de manzana y cebolla, en los cuales la quercetina y sus glicósidos se encuentran inmersos en una matriz vegetal, con los de la quercetina libre, sin matriz (suplemento dietético).

2.1. Influencia de la matriz vegetal (manzana y cebolla) y del procesado por APH sobre la bioaccesibilidad de flavonoles. Comparación con un suplemento dietético de quercetina.

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron los ingredientes de manzana (37,5 g) y cebolla (27 g) tratadas por altas presiones hidrostáticas (APH) y se compararon con los correspondientes ingredientes de manzana (37,5 g) y cebolla (27 g) no tratadas. Estas cantidades fueron seleccionadas teniendo en cuenta la relación de 1,3 encontrada entre el consumo de manzana (9,84 kg/persona/año) y cebolla (7,35 kg/persona/año) en el año 2017 en España (MAPA, 2017) El ingrediente de manzana se obtuvo a partir de manzana 'Golden Delicious' procedente de Aragón (España) y procesada a 400 MPa/35 ºC/5 min. El ingrediente de cebolla se obtuvo a partir de cebolla 'Recas' procedente de Carabaña (Madrid, España) procesada a 400 MPa/25 ºC/5 min. Para estudiar el efecto de la matriz y del procesado por APH, se utilizaron los flavonoles por ser el grupo de compuestos fenólicos presentes en los dos ingredientes, principalmente derivados de quercetina.

Todos los flavonoles identificados en los ingredientes de manzana y cebolla sin digerir (no tratadas y tratadas por APH) (artículos 2 y 3) se encontraron también en todas las fases de la digestión gastrointestinal (DGI): fase oral (FO), fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI). Sin embargo, se observó una disminución progresiva de la concentración de los flavonoles totales en los dos ingredientes, manzana y cebolla y en el suplemento dietético de quercetina durante las distintas fases de la DGI (Figura 50).

El efecto del procesado por APH, que dio lugar al incremento de la concentración de flavonoles totales en ambos ingredientes antes de la digestión (30% en manzana y 13% en cebolla), sólo se puso de manifiesto en las fases de la DGI de la cebolla tratada por APH ya que en éstas se observó una mayor concentración de flavonoles totales que en las de cebolla no tratada (Figura 50). En manzana, únicamente en la FDI de manzana-APH se observó una mayor concentración de flavonoles que en la no tratada. Si bien ambos ingredientes de manzana y cebolla tratadas por APH presentaron mayor concentración de flavonoles totales en la FDI que las no tratadas, las dos fracciones bioaccesibles (no tratadas y tratadas por APH) mostraron concentraciones similares (Figura 50).

El contenido en flavonoles totales del suplemento dietético presentó una mayor degradación durante las distintas fases de DGI (Figura 50) que el de los ingredientes de manzana y cebolla. Así, mientras que, en la FO y en la FDG, los ingredientes de manzana

y cebolla retuvieron aproximadamente el 86% y 83%, respectivamente, del contenido inicial de flavonoles antes de la digestión, el suplemento sólo retuvo el 67% en la FO y 10% en la FDG.

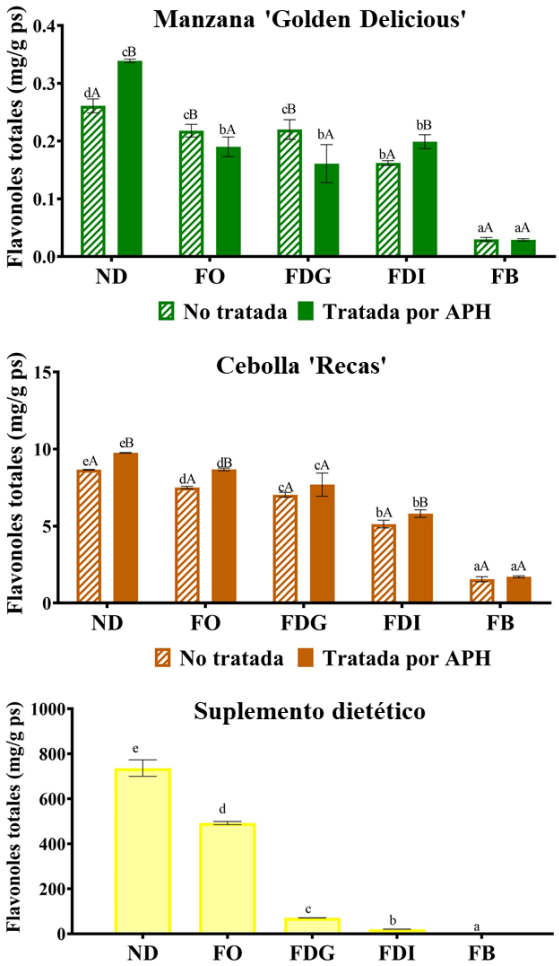


Figura 50: Evolución del contenido de flavonoles totales (mg/g ps) durante las fases de la digestión gastrointestinal (DGI) de los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por APH) y de un suplemento dietético de quercetina. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0,05) entre la muestra no digerida (ND), las diferentes fases de DGI [fase oral (FO), fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI)] y fracción bioaccesible (FB) para la misma muestra (manzana no tratada, manzana-APH, cebolla no tratada, cebolla-APH y suplemento dietético). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas (p<0,05) entre muestra no tratada y muestra tratada por APH (manzana y cebolla) para la misma fase (ND, FO, FDG, FDI, FB).

En términos de bioaccesibilidad de flavonoles totales, se observaron diferencias significativas (p<0,05) entre las distintas matrices estudiadas y también debidas al tratamiento por APH. Así, se observó que la bioaccesibilidad de los flavonoles totales en

cebolla no tratada (17,8%) fue mayor que en la manzana no tratada (11,58%) y que en el suplemento dietético (0,028%). Respecto al tratamiento por APH, mientras que en la cebolla no hubo diferencias entre cebolla no tratada y tratada por APH (~17,6%), en la manzana se observaron diferencias significativas (p<0,05) entre la bioaccesibilidad de los flavonoles totales de manzana no tratada (11,58%) y de manzana-APH (8,58%). Por tanto, el incremento en la extracción de flavonoles debido al tratamiento por APH en los ingredientes de manzana (30%) y cebolla (13%) antes de la digestión no se vio reflejado en un incremento de la bioaccesibilidad de estos compuestos.

La evolución de los flavonoles individuales de los ingredientes de cebolla y manzana durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal (DGI) se muestra en la Figura 51 (cebolla) y Figura 52 (manzana).

Los flavonoles mayoritarios en cebolla mostraron una evolución diferente durante la DGI ya que mientras la concentración de Q-3,4'-diglucósido disminuyó progresivamente durante las distintas fases de la digestión, Q-4'-glucósido fue aumentando hasta la FDG.

Teniendo en cuenta el tratamiento por APH en cebolla, se observó que la concentración del flavonol mayoritario Q-4'-glucósido fue significativamente (p<0,05) mayor en las fases de DGI del ingrediente de cebolla-APH que en las del ingrediente de cebolla no tratada (Figura 51).

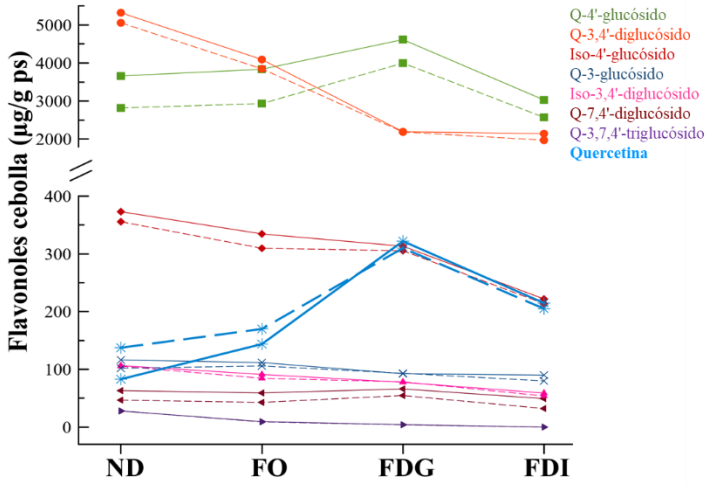


Figura 51: Evolución de los flavonoles individuales del ingrediente de cebolla no tratada (----) y cebolla-APH (—) durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal (DGI): muestra no digerida (ND), fase oral (FO), fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI). Datos expresados como µg/g peso seco (ps) como media de n=4.

En la manzana, la concentración de los flavonoles mayoritarios, Q-3-ramnósido y Q-3-galactósido disminuyó progresivamente en todas las fases de la DGI a la vez que aumentó la concentración de quercetina. Al contrario de lo observado en la cebolla, la concentración de los flavonoles mayoritarios de manzana (Q-3-ramnósido y Q-3-galactósido) fue mayor en las fases de DGI del ingrediente de manzana no tratada que en las de manzana-APH, excepto en la FDI (Figura 52).

La concentración de la quercetina aglicona se incrementó durante las primeras fases de DGI (FO y FDG). Cabe destacar que, en la FDG de cebolla y manzana, las muestras tratadas por APH mostraron un mayor incremento de la concentración de quercetina que las no tratadas (2 y 2,2 veces mayor que en la FO, respectivamente). Estos resultados nos indican que durante la DGI tiene lugar la ruptura de los enlaces glicosídicos, lo que permite la liberación de la quercetina aglicona que en teoría podría ser más bioaccesible que sus glicósidos.

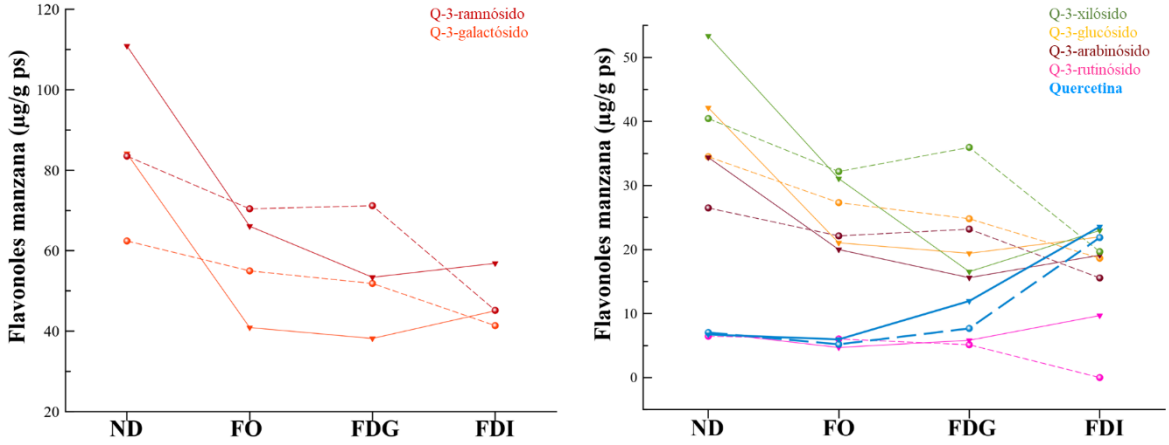


Figura 52: Evolución de los flavonoles individuales del ingrediente de manzana no tratada (----) y manzana-APH (—) durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal (DGI): muestra no digerida (ND), fase oral (FO), fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI). Datos expresados como µg/g peso seco (ps) como media de n=4.

Todos los glicósidos de quercetina identificados en los ingredientes sin digerir, tanto de cebolla como de manzana (no tratadas y tratadas por APH), se encontraron también en las correspondientes fracciones bioaccesibles (FB) aunque en una concentración significativamente (p<0,05) menor. En el caso de la cebolla, los compuestos de mayor peso molecular y con mayor número de grupos hidroxilo (diglucósidos y triglucósido de quercetina) presentaron una mayor bioaccesibilidad tanto en cebolla no tratada (21-70%)

como en cebolla-APH (37-96%) que los de menor peso molecular y menos hidroxilos (monoglucósidos de quercetina e isoramnetina) (5-22,5%). Además, la bioaccesibilidad de los derivados de quercetina en cebolla fue mayor que en la manzana, que osciló entre 8-15% en manzana no tratada y entre 5-9% en la tratada por APH. Así, el flavonol Q-3-glucósido identificado en ambos ingredientes, presentó mayor bioaccesibilidad en cebolla (22,5%) que en manzana (13%).

En la Figura 53 se muestra la evolución durante la DGI de la quercetina aglicona en los dos ingredientes de cebolla y manzana y en el suplemento diétetico de quercetina (sin matriz) y su bioaccesibilidad. A diferencia de lo observado en las muestras de manzana y cebolla donde la concentración de quercetina se incrementó durante las fases de la digestión por la posible ruptura de los enlaces glicosídicos de los derivados de quercetina, en el suplemento dietético, el contenido de quercetina en las FDG y FDI se redujo un 90% y un 97% respecto al contenido inicial en el suplemento sin digerir. De hecho, la bioaccesibilidad de la quercetina en el suplemento fue más baja (0,028%) en comparación con la bioaccesibilidad de la quercetina liberada de los ingredientes de cebolla no tratada y tratada por APH (5,49% y 9,37%) y de manzana no tratada y tratada por APH (44% y 50%). Por tanto, estos resultados mostraron que: i) La bioaccesibilidad de la quercetina fue mayor en manzana que en cebolla; ii) La bioaccesibilidad de la quercetina en los ingredientes de manzana y cebolla tratadas por APH fue mayor que en los de las no tratadas; iii) La bioaccesibilidad de la quercetina fue mayor cuando se encuentra inmersa en una matriz vegetal (manzana y cebolla) que cuando se digiere sin matriz.

La quercetina es un compuesto químico que presenta muy baja solubilidad en soluciones acuosas, y cuando alcanza la FDI, las condiciones de pH, bioquímicas y de concentración de sales, favorecen su micelación, reduciendo así su bioaccesibilidad. Sin embargo, cuando la quercetina se encuentra inmersa en una matriz vegetal, ésta la protege de las condiciones drásticas de las distintas fases de la DGI, llegando a la FDI en concentraciones más elevadas que si estuviera en forma libre (sin matriz), lo que hace que aumente la concentración de quercetina disponible para ser absorbida, es decir su bioaccesibilidad. Además, el grado de dispersión de la quercetina en una matriz vegetal también puede afectar su solubilidad en un medio acuoso (Kaushik *et al.*, 2012; Wiczkowski, 2018).

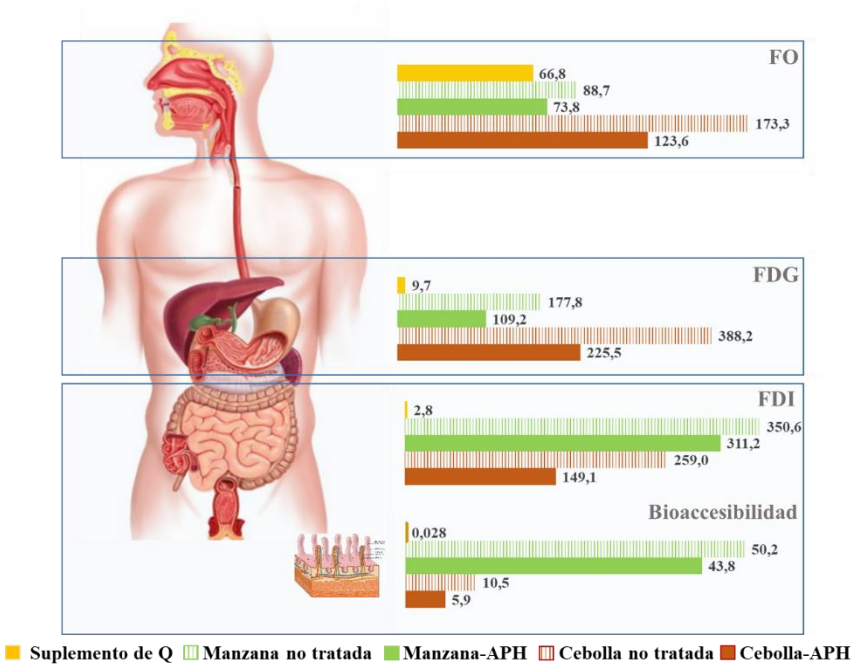


Figura 53: Porcentaje de retención y bioaccesibilidad de quercetina inmersa en un ingrediente de manzana y de cebolla (no tratadas y tratadas por APH) y en un suplemento dietético. FO, fase oral; FDG, fase de digestión gástrica; FDI, fase de digestión intestinal. Datos expresados como porcentaje de retención en cada fase de la DGI respecto al contenido inicial de la muestra sin digerir.

2.3. Influencia del proceso de digestión gastrointestinal sobre la microestructura y propiedades reológicas de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH y de un suplemento dietético de quercetina. Efecto sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el apartado anterior sobre la influencia de la matriz vegetal y del procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) sobre la bioaccesibilidad de flavonoles, el objetivo del siguiente estudio fue evaluar si los cambios que tienen lugar en la microestructura y propiedades reológicas de los ingredientes de manzana y cebolla, no tratadas y tratadas por APH, pueden estar relacionados con la diferente evolución de los compuestos fenólicos durante las fases de la digestión gastrointestinal (DGI) y su bioaccesibilidad. Para ello se llevó a cabo un estudio de la microestructura mediante microscopía electrónica que permitió evaluar la liberación de los compuestos fenólicos en cada fase de la DGI gracias a sus características de autofluorescencia. Por otro lado, los cambios reológicos de los dos ingredientes durante las

distintas fases de la DGI se midieron teniendo en cuenta los cambios en la viscosidad aparente.

Inicialmente, los ingredientes de manzana y cebolla antes de la digestión no mostraron cambios microestructurales evidentes debidos al procesado por APH. Sin embargo, se observó un incremento de la fluorescencia durante las distintas fases de la digestión de cebolla, especialmente en la fase de digestión intestinal (FDI) de la cebolla-APH, lo que indicó un aumento de la desintegración celular y liberación de compuestos fenólicos. En manzana, no se observaron cambios significativos en la fluorescencia durante las distintas fases de la DGI de la manzana no tratada. Sin embargo, en la manzana-APH se observó un incremento significativo de la fluorescencia, principalmente en la FDI, que al igual que en la cebolla, indicaban una mayor desintegración celular y liberación de compuestos fenólicos (flavonoles totales).

En general, el nivel de desintegración celular durante la DGI fue mayor en las muestras de cebolla que en las de manzana, y respecto al tratamiento, se observó mayor desintegración en las muestras tratadas por APH que en las no tratadas. Por tanto, los cambios en la microestructura ocasionados por el tratamiento por APH dependieron del tipo de matriz alimentaria (Janowicz & Lenart, 2018). Los tratamientos por APH pueden modificar la matriz vegetal de distintas maneras, desde provocar un aumento del grosor de la pared celular (Balasubramaniam *et al.*, 2007) hasta la pérdida de la integridad celular (Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2013). Por otro lado, el suplemento dietético de quercetina, mostró una disminución progresiva de la fluorescencia durante las distintas fases de DGI en consonancia con la disminución progresiva de los compuestos fenólicos (quercetina).

Los cambios en las propiedades reológicas de los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por APH) durante las distintas fases de la DGI fueron registrados mediante los cambios en el coeficiente de consistencia (K) y viscosidad aparente a una velocidad de corte de 10 s-1 ($\eta_{a,10}$) (Figura 54).

Se realizaron análisis de ANOVA de dos vías que nos permitieron estudiar de forma simultánea el efecto de dos variables. En primer lugar, se estudió el efecto de las fases de la DGI y los tratamientos de APH sobre las propiedades reológicas (K y $n_{a,10}$). En las muestras de cebolla se observó que tanto el factor fases de la DGI como el factor procesado por APH, así como la combinación de ambos, tuvieron efecto sobre las propiedades reológicas de este ingrediente, indicando que el efecto del procesado por APH

depende de las fases de DGI. Sin embargo, en manzana, sólo el factor fases de DGI tuvo efecto sobre las propiedades reológicas de la manzana.

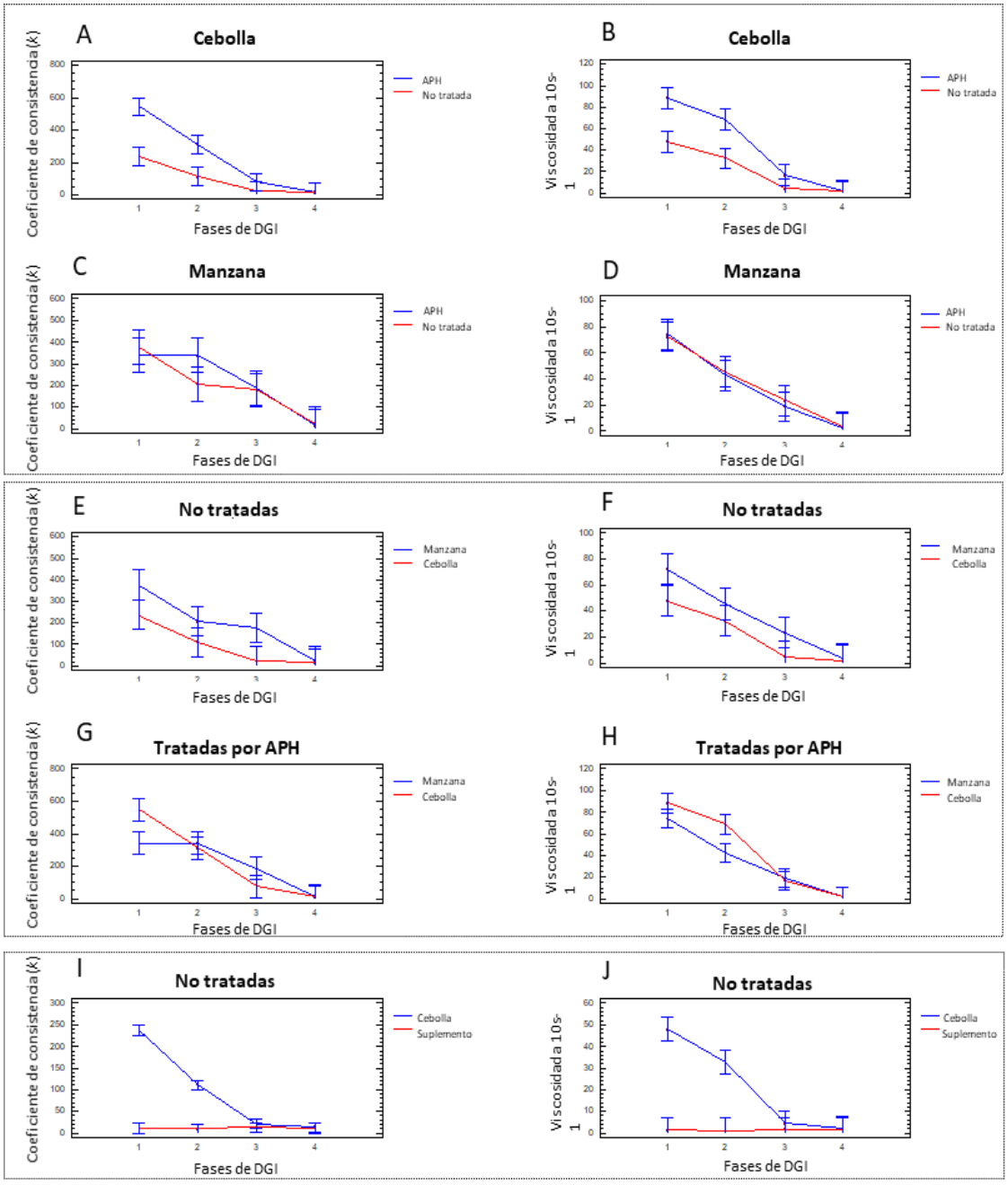


Figura 54: Gráficos de interacciones de ANOVA de dos vías. (A-D): efectos principales, fases de la digestión gastrointestinal (DGI) (1-no digerido, 2-fase oral, 3-fase de digestión gástrica, 4-fase de digestión intestinal) y tratamiento [no tratadas y tratadas por altas presiones hidrostáticas (APH)], realizado sobre el coeficiente de consistencia (*K*) y la viscosidad aparente ($\eta_{a,10}$) en los ingredientes de manzana y cebolla; (E-H): efectos principales, fases de la DGI y matriz vegetal (manzana y cebolla) realizado para *K* y $\eta_{a,10}$, comparando ingredientes (manzana y cebolla no tratadas y tratadas por APH); (I-J) efectos principales, fases de la DGI y matriz (cebolla y suplemento de quercetina), realizado para *K* y $\eta_{a,10}$, comparando el ingrediente de cebolla no tratada y el suplemento dietético.

El análisis por ANOVA de dos vías para estudiar la interacción entre las fases de la DGI x matriz alimentaria (manzana y cebolla) mostró que estos dos factores no influyeron sobre las propiedades reológicas de las muestras no tratadas y tratadas por APH, y por tanto no estaban relacionados.

Respecto al efecto de las fases de DGI, cabe destacar que tanto *K* como $n_{a,10}$ de los ingredientes de manzana, cebolla y del suplemento de quercetina disminuyeron de forma significativa (p<0,05) durante las distintas fases de la DGI lo que sugiere que conforme avanza la digestión se incrementa el efecto de dilución. Este efecto puede ser consecuencia de la incorporación de líquidos y enzimas durante las fases de DGI (Espinal-Ruíz *et al.*, 2016). Este efecto se intensificó en el suplemento de quercetina debido a la ausencia de una matriz alimentaria.

Respecto al tratamiento por APH, la cebolla-APH presentó valores de *K* y $n_{a,10}$ más altos que la no tratada en el producto sin digerir, en la fase oral (FO) y en la fase de digestión gástrica (FDG). Por tanto, el tratamiento por APH ejerció un efecto importante en el comportamiento del digerido de cebolla durante la DGI. Este efecto puede ser debido a que los tratamientos por APH pueden favorecer la salida de material soluble debido al incremento de la permeabilidad celular o desintegración de las paredes celulares (Vázquez-Gutiérrez *et al.*, 2014). Este efecto puede estar relacionado con la mayor extracción de compuestos fenólicos observada en la cebolla-APH en comparación con la no tratada. Por otro lado, en la manzana sólo se observaron diferencias significativas debidas al tratamiento por APH en la FDI, donde se observaron valores más bajos de viscosidad en manzana-APH que en la manzana no tratada.

Respecto a la matriz vegetal (manzana *vs*. cebolla), se ha observado que los valores de viscosidad en manzana fueron superiores a los de la cebolla sin digerir. Sin embargo, el comportamiento reológico de los ingredientes de manzana y cebolla tratadas por APH fue distinto dependiendo de la fase de la digestión.

La diferente respuesta de los dos ingredientes de manzana y cebolla frente a las fases de DGI, podría deberse a las diferencias en la composición química entre la manzana y la cebolla. El ingrediente de manzana presentó un mayor contenido en fibra soluble y pectinas y un menor contenido de agua que el ingrediente de cebolla lo que podría dar lugar a una mayor viscosidad debido a la capacidad de las pectinas de retener el agua (Espinal-Ruíz *et al.*, 2016). Las APH en manzana dieron lugar a un incremento en el

contenido de pectinas y el grado de esterificación (8% y 32%, respecto a la manzana no tratada) lo que podría justificar parcialmente, el incremento de las propiedades reológicas en las fases de DGI de manzana-APH con respecto a la cebolla-APH. Por otro lado, los valores de viscosidad de los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por APH) fueron significativamente (p<0,05) más altos que los del suplemento de quercetina en todas las fases de la DGI.

Como conclusión, el incremento en la extracción de compuestos fenólicos (flavonoles) del 13% en cebolla y 30% en manzana antes de la digestión debido a los tratamientos de APH, no se vio reflejado en una mayor concentración de compuestos fenólicos en las distintas fases de la DGI ni en el incremento de la bioaccesibilidad, que fue mayor en la cebolla (17%-no tratada y 18%-tratada por APH) que en manzana (9%-no tratada y 12%-tratada por APH). Estos resultados evidencian la influencia de la matriz vegetal y el procesado en la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos.

Los resultados obtenidos estudiando los cambios en la microestructura y propiedades reológicas durante las fases de DGI de cebolla, manzana y suplemento de quercetina pusieron de manifiesto que el efecto de la matriz alimentaria fue más significativo que el efecto del procesado por APH sobre el nivel de extracción y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos.

2.3. Influencia del procesado por APH sobre la bioaccesibilidad de compuestos fenólicos de manzana (flavonoles, ácidos hidroxicinámicos, flavan-3-oles y dihidrochalconas).

El ingrediente obtenido a partir de manzana 'Golden Delicious' procedente de Aragón (España) y procesada por altas presiones hidrostáticas (APH) (400 MPa/35º C/5 min) fue sometido a un proceso *in vitro* de digestión gastrointestinal (DGI) empleando un modelo dinámico. Los resultados obtenidos se compararon con los del ingrediente de manzana no tratada. Se estudió el efecto de las distintas fases de la DGI sobre 22 compuestos fenólicos pertenecientes a cuatro grupos distintos, que en orden decreciente de concentración fueron flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y dihidrochalconas.

En general, la concentración de los compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana (no tratada y tratada por APH), de distinta naturaleza química y grupo, disminuyó

de forma progresiva desde la fase oral (FO) hasta la fase de digestión intestinal (FDI), siendo el grupo de los flavan-3-oles el más afectado.

La evolución individual de los compuestos fenólicos de cada grupo durante las distintas fases de la DGI se muestra en las siguientes Figuras: Figura 52 (flavonoles); Figura 55 (flavan-3-oles); Figura 56 (ácidos hidroxicinámicos) y Figura 57 (dihidrochalconas).

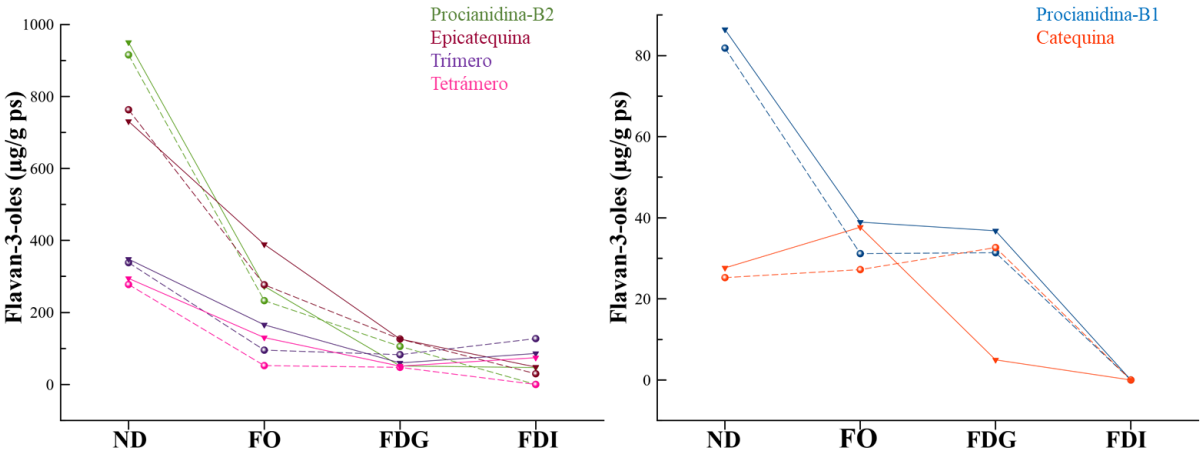


Figura 55: Evolución de la concentración de flavan-3-oles en los ingredientes de manzana no tratada (----) y manzana-APH (—) en las distintas fases de la DGI: no digerida (ND); fase oral (FO); fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI). Datos expresados como µg/g de peso seco (ps) media de n=4.

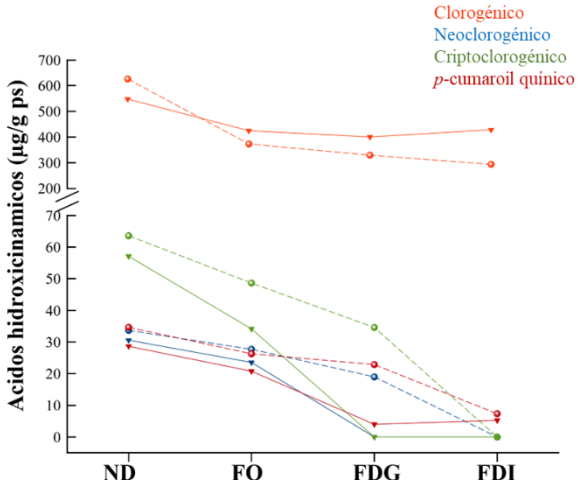


Figura 56: Evolución de la concentración de ácidos hidroxicinámicos en los ingredientes de manzana no tratada (----) y manzana-APH (—) en las distintas fases de la DGI: no digerida (ND); fase oral (FO); fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI). Datos expresados como µg/g de peso seco (ps) media de n=4.

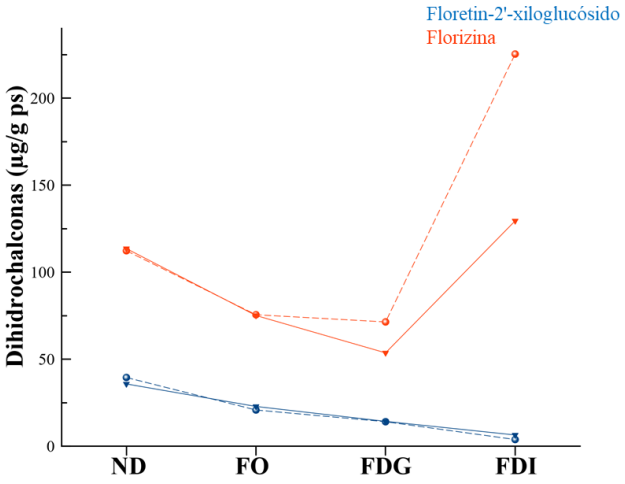


Figura 57: Evolución de la concentración de dihidrochalconas en los ingredientes de manzana no tratada (----) y manzana-APH (—) en las distintas fases de la DGI: no digerida (ND); fase oral (FO); fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI). Datos expresados como µg/g de peso seco (ps) media de n=4.

El efecto de las distintas fases de la DGI, fase oral (FO), fase digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI), sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos, se evaluó teniendo en cuenta su índice de recuperación (IR), o porcentaje de dicho compuesto fenólico (individual o por grupo) presente en cada fase, comparado con su concentración antes de la digestión y teniendo en cuenta que a mayor índice de recuperación mayor estabilidad de dicho compuesto en la correspondiente fase.

En general, el grupo de compuestos fenólicos que mostró mayores IR en la mayoría de las fases de DGI del ingrediente de manzana no tratada fueron los flavonoles (83,65% en FO, 84,14% en FDG y 62,21% en FDI), seguidos por las dihidrochalconas (63,47% en FO, 56,24% en FDG y 150,94% en FDI), ácidos hidroxicinámicos (62,76% en FO, 53,54% en FDG y 39,69% en FDI). Los IR de los flavan-3-oles fueron muy bajos en todas las fases de DGI (30,97% en FO, 18,42% en FDG y 10,39% en FDI). Respecto al efecto del procesado por APH, lo que se observó fue que sólo los ácidos hidroxicinámicos mejoraron los IR en la DGI del ingrediente de manzana tratada por APH respecto a los del ingrediente de manzana no tratada (de 39,69% a 65,24% en FDI), mientras que los IR de los flavonoles disminuyeron (artículo 3).

En la fracción bioaccesible (FB) de ambos ingredientes de manzana (no tratada y tratada por APH) no se detectó ningún compuesto perteneciente al grupo de los flavan-3-

oles, observándose fundamentalmente ácidos hidroxicinámicos (principalmente ácido clorogénico) (235 y 264 µg/g ps) y flavonoles (30,19 y 29,05 µg/g ps).

Por tanto, los resultados obtenidos sobre los flavan-3-oles, muestran que éstos compuestos tienen una gran dificultad para ser absorbidos a nivel de intestino delgado por lo que la mayor parte de los mismos pueden alcanzar el colon donde, por acción de microbiota intestinal, podrán ser transformados en diversos tipos de metabolitos, que serán los principales responsables de la bioactividad de estos compuestos en el organismo (Monagas *et al.*, 2010; L. Zhang *et al.*, 2016).

Respecto a la bioaccesibilidad, el tratamiento por APH incrementó la bioaccesibilidad de los ácidos hidroxicinámicos (de 31,10% a 39,78%) y de las dihidrochalconas (de 19,49% a 29,66%). Sin embargo, el efecto del tratamiento por APH en manzana que dio lugar al incremento del 30% de la concentración de flavonoles, no se vio reflejado ni en los IR en las fases de la DGI ni en la bioaccesibilidad, ya que ésta fue más baja en la manzana-APH (8,58%) que en la no tratada (11,58%). Finalmente, el contenido de compuestos fenólicos totales en la FB no presentó diferencias significativas (p<0,05) entre los ingredientes de manzana no tratada y tratada por APH y por tanto la bioaccesibilidad fue similar entre ambos (9% y 10%, respectivamente).

Estos resultados nos muestran que el tratamiento por APH puede ayudar a mejorar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos dependiendo de la naturaleza química del compuesto y de la matriz en la que se encuentren. Además, el efecto positivo del tratamiento por APH incrementando la extracción de compuestos fenólicos en alimentos vegetales antes de la digestión, no tiene por qué verse reflejado en el incremento de su bioaccesibilidad.

2.4. Influencia de la matriz vegetal (manzana y cebolla) y del procesado por APH sobre las características antioxidantes.

Los beneficios para la salud relacionados con el consumo de manzana y cebolla pueden estar relacionados con los compuestos fenólicos presentes en su composición, que, entre otras actividades biológicas, han mostrado ser potentes antioxidantes. Los compuestos fenólicos protegen al organismo del daño oxidativo a través de varios mecanismos, entre los cuales está la protección de la actividad de enzimas antioxidantes

como la catalasa (CAT) y la inhibición de enzimas oxidantes como la lipoxigenasa (LOX) y la xantina oxidasa (XO) (Hussain *et al.*, 2016). En consecuencia, se decidió estudiar por un lado el efecto de las distintas fases de la digestión gastrointestinal (DGI) sobre la actividad antioxidante (AA) de los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por APH) mediante cuatro métodos distintos (DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$, FRAP y fenoles totales por el método del Folin-Ciocalteu-TP-FC). Por otro lado, se evaluó la influencia del proceso de DGI sobre la capacidad de los compuestos fenólicos presentes en los ingredientes de manzana (no tratada y tratada por APH) de modular la actividad de las enzimas LOX, XO y CAT.

Los resultados obtenidos mostraron que la AA determinada por los cuatro métodos (DPPH$^{\bullet}$, ABTS$^{\bullet+}$, FRAP y TP-FC) disminuyó de forma progresiva desde la fase oral (FO) hasta la fase de digestión intestinal (FDI) de los dos ingredientes (manzana y cebolla) a la vez que lo hacían los compuestos fenólicos identificados en cada fase de DGI. No obstante, se observaron diferencias en el efecto de las distintas fases de la DGI sobre la actividad antioxidante en función del tipo de matriz y del tratamiento por APH según muestran los resultados recogidos en la Figura 58.

En general, antes de la digestión, el ingrediente de manzana presentó mayor capacidad de atrapar radicales libres (DPPH$^{\bullet}$ y ABTS$^{\bullet+}$) y la cebolla mejor capacidad reductora (FRAP y TP-FC). Durante la primera parte de la digestión se observó que en la FO y en la fase de digestión gástrica (FDG), los valores de AA del ingrediente de manzana-APH fueron similares a los de la manzana no tratada. Sin embargo, el efecto del tratamiento por APH incrementó significativamente (p<0,05) la AA del ingrediente de cebolla sobre todo en la FDG. Este incremento de la AA en la cebolla pudo estar relacionado con el incremento de la concentración de quercetina observado en esta fase (Figura 51).

En la FDI, la AA (TP-FC y FRAP) se incrementó de forma significativa (p<0,05) en manzana no tratada y manzana-APH probablemente debido al incremento del contenido de quercetina aglicona y florizina en ambas manzanas (Figuras 52 y 57). Sin embargo, el incremento significativo (p<0,05) de la AA (TP-FC y DPPH$^{\bullet}$) en cebolla (no tratada y tratada por APH) no se pudo relacionar con el incremento de flavonoles. Los incrementos de AA observados en la FDI de los ingredientes de manzana y cebolla podrían deberse a la liberación adicional de otros compuestos fenólicos, así como otros compuestos antioxidantes (ácido ascórbico, carotenoides, tocoferoles, pigmentos, carbohidratos o azúcares reductores) (Gullón *et al.*, 2015). Otra posible explicación podría estar

relacionada con los cambios conformacionales que pueden ocurrir en las estructuras químicas de los compuestos fenólicos cuando pasan de la FDG (pH ácido) a la FDI (pH básico), lo que podría traducirse en cambios en la AA (Tagliazucchi *et al.*, 2010).

La fracción bioaccesible (FB) mostró un valor de AA (medida por DPPH•, ABTS•+, FRAP y TP-FC) significativamente (p<0,05) menor al resto de fases de DGI, tanto en manzana como en cebolla (no tratadas y tratadas por APH) que coincide con la concentración más baja de compuestos fenólicos individuales y totales observada en esta fase para ambos ingredientes si se compara con las fases de la DGI. También se observó un efecto positivo del tratamiento por APH incrementando la AA en la FB de manzana (DPPH•, ABTS•+ y FRAP) y en la FB de cebolla (DPPH• y TP-FC).

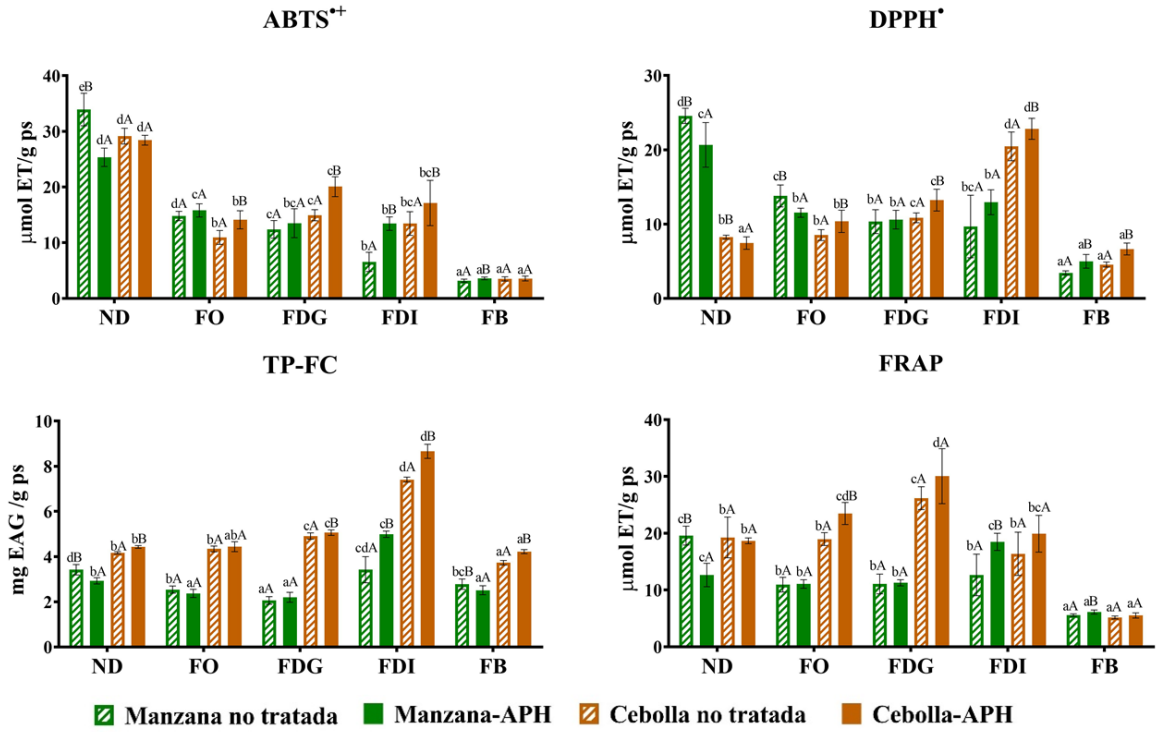


Figura 58: Evolución de la actividad antioxidante (ABTS•+, DPPH•, TP-FC, FRAP) en las muestras no digeridas (ND) y en las diferentes fases de DGI: fase oral (FO), fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI), y fracción bioaccesible (FB) de los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por APH). Datos expresados como media ± DE (n=3). TP-FC, mg equivalentes de ácido gálico/ g peso seco, ABTS•+, DPPH• y FRAP, µmol de equivalentes de Trolox/g peso seco. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas (p<0,05) entre la muestra ND, las diferentes fases de DGI y FB para la misma muestra (manzana no tratada, manzana-APH, cebolla no tratada y cebolla-APH). Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas (p<0,05) entre muestras no tratadas y tratadas por APH (manzana y cebolla) para la misma fase (ND, FO, FDG, FDI, FB).

Se encontraron correlaciones positivas entre el contenido de flavonoles totales medidos por HPLC (suma de compuestos individuales) de cebolla y la AA medida por el método $ABTS^{\bullet+}$ (R=0,838, p<0,01) y FRAP (R=0,794, p<0,01). En manzana también se observaron correlaciones positivas, en este caso, entre el contenido total de compuestos fenólicos por HPLC y la AA medida por $DPPH^{\bullet}$ (R=0,900, p<0,01) y $ABTS^{\bullet+}$ (R=0,809, p<0,01). Por tanto, estos resultados confirman que existe una correlación entre los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de los ingredientes de manzana y cebolla durante la digestión gastrointestinal (Carbonell-Capella *et al.*, 2015; Gullón *et al.*, 2015).

También se estudió la capacidad para modular la actividad de las enzimas prooxidantes, xantina oxidasa (XO) y lipoxigenasa (LOX), y de la enzima antioxidante, catalasa (CAT) del ingrediente de manzana (no tratada y tratada por APH) (Gawlik-Dziki, 2012, 2014). En general, la capacidad de inhibir las actividades XO y LOX y la capacidad de proteger la actividad CAT de los ingredientes de manzana (no tratada y tratada por APH) (Figura 59) disminuyeron progresivamente durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal a la vez que la concentración de compuestos fenólicos de los distintos grupos estudiados (flavan-3-oles, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos y dihidrochalconas) también redujeron su contenido.

En el ingrediente de manzana antes de la digestión, se observó que el tratamiento por APH incrementó la capacidad de inhibir a la xantina oxidasa (XO) (12%), mantuvo la capacidad de inhibir la lipoxigenasa (LOX) e incrementó significativamente (p<0,05) la capacidad para proteger la actividad catalasa (CAT) (9%) (Figura 59).

Durante las primeras etapas de la digestión (FO y FDG), se observó una disminución de la capacidad de inhibir a la XO (mayor IC_{50}) (Figura 59A) de ambos ingredientes de manzana (no tratada y tratada por APH) lo que podría estar relacionado con la disminución de los compuestos fenólicos en estas fases. Sin embargo, se observó una tendencia a incrementar la capacidad inhibitoria de la LOX (menor IC_{50}) respecto al ingrediente no digerido en estas dos fases de la digestión, FO y FDG, en ambos ingredientes, principalmente en manzana-APH (Figura 59B).

En la fase digestión intestinal (FDI) de los dos ingredientes de manzana, no tratada y tratada por APH, se observó un incremento significativo (p<0,05) de la capacidad inhibitoria de XO y LOX, lo que podría atribuirse a su vez al incremento de quercetina

aglicona (3 y 3,5 veces, respectivamente) y florizina (2 y 1,2 veces) observado en esta fase, respecto a las muestras iniciales, no digeridas.

Sin embargo, la fracción bioaccesible (FB) presentó menor capacidad inhibitoria de XO que los ingredientes no digeridos si bien mantuvo el 83% de la capacidad inhibitoria inicial del ingrediente de manzana no tratada y el 68% del ingrediente de manzana-APH. También la FB de manzana-APH retuvo el 100% de la actividad inhibitoria de LOX.

La capacidad de preservar la actividad de la CAT se redujo de forma significativa (p<0,05) durante la FO y FDG, tanto en manzana no tratada como tratada por APH. Sin embargo, en la FDI se observó también un incremento de la capacidad de preservar la actividad de esta enzima en ambos ingredientes (manzana no tratada y manzana-APH) (Figura 59C). Cabe destacar que sólo se observó un efecto positivo del tratamiento por APH en la FB del ingrediente de manzana-APH que mostró una capacidad de activar a la CAT 9 veces mayor que en la muestra no digerida.

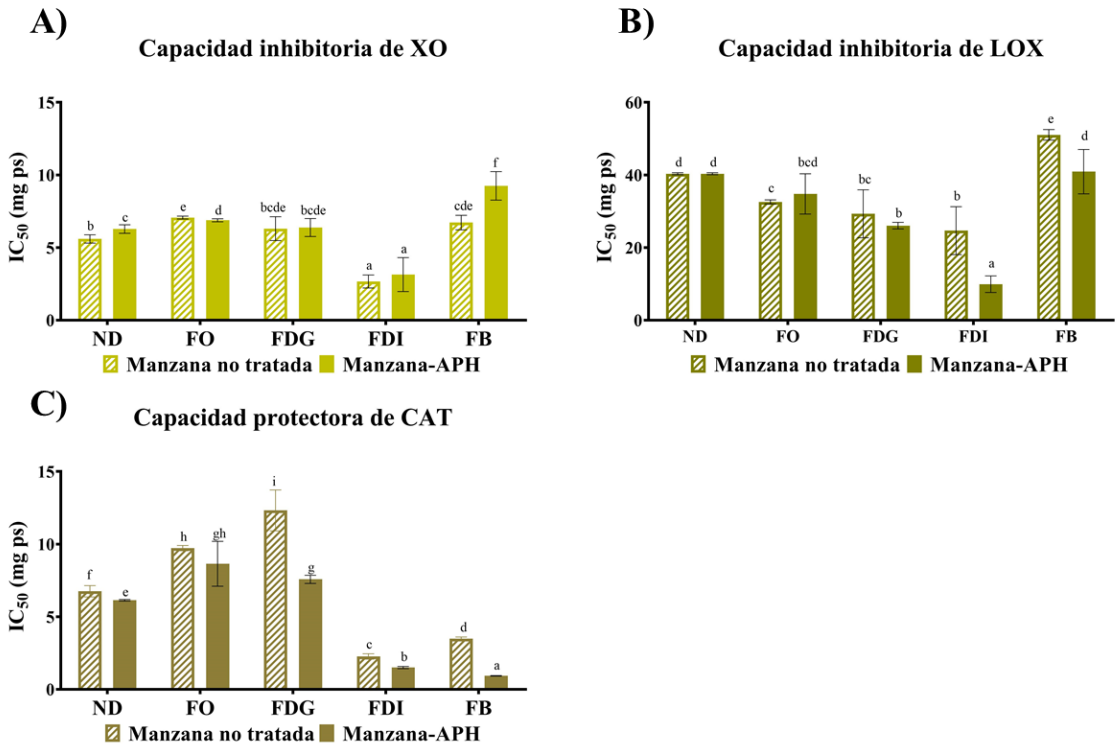


Figura 59: A) Capacidad inhibitoria de la actividad xantina oxidasa (XO); B) Capacidad inhibitoria de la actividad lipoxigenasa (LOX); C) Capacidad protectora de la actividad catalasa (CAT) de los ingredientes de manzana (no tratada y APH) en las muestras no digeridas (ND) y en las diferentes fases de DGI: fase oral (FO), fase de digestión gástrica (FDG) y fase de digestión intestinal (FDI), y fracción bioaccesible (FB). Diferentes letras indican diferencias significativas (p<0,05).

Los datos obtenidos muestran que la AA de los ingredientes de manzana (no tratada y tratada por APH) se reduce significativamente (p<0,05) tras la digestión gastrointestinal. Sin embargo, los resultados sobre la modulación de las actividades de las enzimas XO, LOX y CAT sugieren que los compuestos fenólicos que consiguen pasar a la FB conservan gran parte de sus propiedades antioxidantes y que en este caso el procesado por APH puede ayudar a mantener o incluso aumentar la concentración de compuestos fenólicos con actividad antioxidante en la FB. Por tanto, la utilización de modelos *in vitro* que simulan la digestión gastrointestinal de los ingredientes de origen vegetal constituyen, en la actualidad, una herramienta útil para determinar con mayor exactitud las propiedades antioxidantes con las que se publicitan determinados alimentos para dar respuesta a los requerimientos de los consumidores actuales.

SECCIÓN 3: Fermentación colónica *in vitro* de ingredientes de manzana 'Golden Delicious' y cebolla 'Recas' procesadas por altas presiones hidrostáticas y su efecto sobre la microbiota humana y su metabolismo: producción de metabolitos de compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta.

Los resultados obtenidos en la sección 2 de la presente Tesis Doctoral mostraron que los compuestos fenólicos tienen una bioaccesibilidad baja y que ésta dependió de distintos factores como la naturaleza química del compuesto, la matriz vegetal y el procesado por APH. Por tanto, los compuestos fenólicos que no son liberados de la matriz vegetal durante la digestión gastrointestinal y no son bioaccesibles, se pueden acumular en el colon donde podrían actuar como antioxidantes o prebióticos (Cardona *et al.*, 2013). Además, en el colon, los compuestos fenólicos no bioaccesibles pueden ser biotransformados por la acción de la microbiota intestinal dando lugar a distintos tipos de metabolitos bioactivos que pueden ser los verdaderos responsables de las propiedades beneficiosas para la salud atribuidas a los compuestos fenólicos originales (Monagas *et al.*, 2010). Para alcanzar el **objetivo 3** de la presente Tesis Doctoral, se estudió la biotransformación producida por la microbiota intestinal de los compuestos fenólicos no bioaccesibles de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH (artículo 5). Para ello se utilizó un modelo dinámico *in vitro* que integra el proceso de digestión gástrica, intestinal y de fermentación colónica, llevada a cabo en cinco reactores que simulan las condiciones específicas del estómago, intestino delgado y del colon ascendente, transversal y descendente, que permitió estudiar: 1) La

estabilidad de los compuestos fenólicos y la formación de metabolitos durante 14 días de ingesta de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH; 2) La influencia de los compuestos fenólicos y sus metabolitos sobre la composición de la microbiota; 3) La producción de ácidos grasos de cadena corta.

3.1. Evaluación del impacto de un proceso dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica (DGI-FC) de ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH mediante un estudio metabolómico.

El estudio metabolómico de las muestras obtenidas tras un proceso *in vitro* de digestión gastrointestinal y fermentación colónica (DGI-FC) de los ingredientes de manzana-APH (37,5 g/d) y cebolla-APH (27 g/d) simulando una ingesta crónica de 14 días de duración, se inició con la puesta a punto de los métodos de extracción y análisis por HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS/MS de los compuestos fenólicos y sus metabolitos presentes en los productos de la fermentación colónica. Estas cantidades de ingredientes de manzana y cebolla utilizadas en el estudio fueron seleccionadas teniendo en cuenta la relación de 1,3 encontrada entre el consumo de manzana (9,84 kg/persona/año) y cebolla (7,35 kg/persona/año) en el año 2017 en España (MAPA, 2017)

Teniendo en cuenta el gran número de muestras analizadas y de resultados obtenidos, se llevó a cabo un análisis multivariante que nos permitiera explicar el origen de la variabilidad del proceso y reducir la dimensionalidad de los datos y para ello se aplicó un Análisis por Componentes Principales (ACP o PCA en inglés). En ambos ingredientes (manzana-APH y cebolla-APH) se obtuvieron valores satisfactorios de los parámetros que evalúan la varianza explicada (R^2) y la capacidad de predicción (Q^2). Un componente principal (PC1) logró explicar el 56,6% de la variabilidad del proceso de fermentación en la manzana y un 63,8% de la variabilidad del proceso en cebolla (Figura 60). El análisis PCA mostró una clara separación de las muestras en función de la región del colon (ascendente, transversal y descendente) en ambos ingredientes, manzana-APH y cebolla-APH (Figura 60).

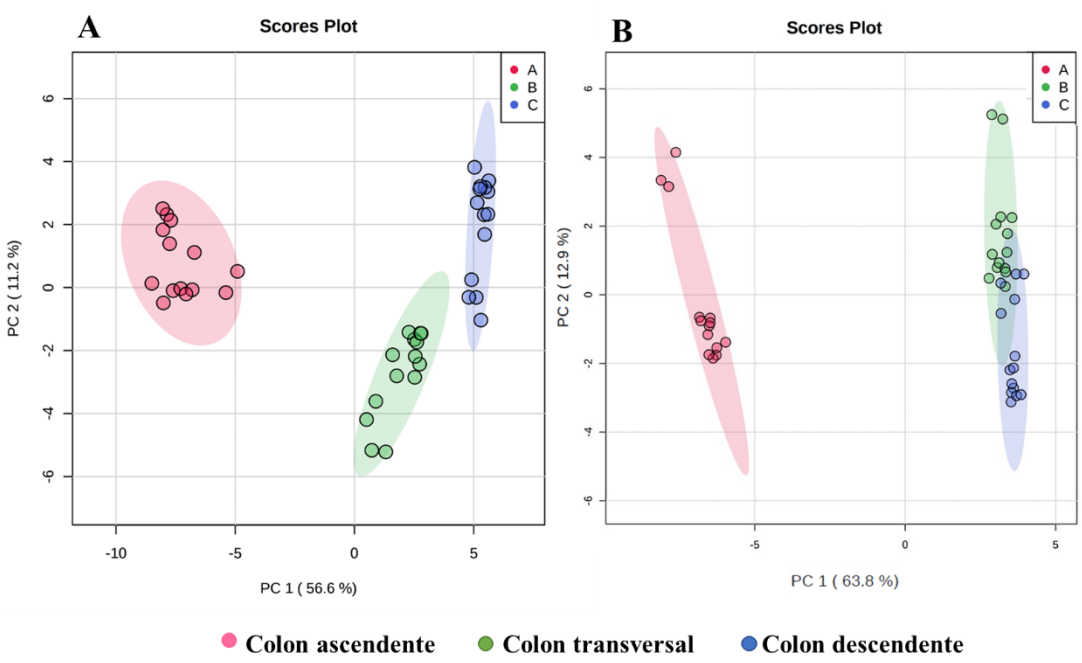


Figura 60: Análisis de Componentes Principales (PCA) de las muestras de fermentación colónica de manzana-APH (A) y cebolla-APH (B) obtenidos en las tres regiones del colon (ascendente, transversal y descendente).

Una vez realizado el análisis PCA se llevó a cabo la identificación de los compuestos fenólicos precursores y sus metabolitos mediante el análisis del perfil isotópico y analizando los datos obtenidos en el espectrómetro de masas. Con el objetivo de obtener mayor información estructural de los compuestos fenólicos y sus metabolitos, se realizó un análisis de fragmentación MS/MS, empleando para ello las mismas condiciones analíticas en las que se analizaron las muestras. Los fragmentos obtenidos fueron comparados con los disponibles en las distintas bases de datos (FoodDB, HMDB) y en la mayoría de los casos se realizó la confirmación mediante la inyección de patrones comerciales. Finalmente, se encontraron y evaluaron un total de 56 entidades moleculares de las cuales 33 eran compuestos fenólicos precursores y 26 eran metabolitos derivados de la acción de la microbiota (artículo 5). Se consideraron compuestos fenólicos precursores a aquellos compuestos fenólicos presentes en los ingredientes iniciales (no digeridos) de manzana-APH y cebolla-APH, identificados también en las muestras de fermentación colónica y a partir de los cuáles se espera la formación de diversos metabolitos por acción de la microbiota colónica.

En los productos de fermentación de manzana-APH se identificación un total de 22 compuestos fenólicos precursores, de los cuáles 7 flavonoles, 5 ácidos hidroxicinámicos, 7 flavan-3-oles y 3 dihidrochalconas fueron descritos previamente en los estudios relacionados con los objetivos 1 y 2 de la presente Tesis Doctoral (artículos 1 y 3). También se identificaron tres compuestos de la familia de las dihidrochalconas que no habían sido previamente identificados en el ingrediente de manzana-APH sin digerir, con m/z $[M-H]^-$ 583,1667, 451,1256 y 567,1720, tentativamente identificados como 3-hidroxifloretin-2'-xiloglucósido, 3-hidroxifloretin-2'-glucósido y floretin-pentoxil-hexósido (Lee *et al.*2003; Tsao *et al.*, 2003).

En los productos de fermentación de cebolla-APH se identificaron 11 flavonoles precursores, de los cuales 8 fueron también descritos en los estudios realizados para alcanzar los objetivos 1 y 2 de la presente Tesis Doctoral (artículo 2). También se identificaron tres compuestos con m/z $[M-H]^-$ 609,1471, 477,1031 y 315,0508 que fueron identificados como Q-3-rutinósido, isoramnetina-3-glucósido e isoramnetina aglicona, respectivamente, y que no se habían sido identificados anteriormente en el ingrediente de cebolla-APH si bien han sido descritos en cebolla por otros autores (Slimestad *et al.*, 2007).

Un total de 26 metabolitos fenólicos fueron identificados en las muestras de fermentación de colon ascendente, transversal y descendente de manzana-APH y cebolla-APH, divididos para su estudio en varios grupos: derivados del ácido benzoico, derivados del ácido fenilacético, derivados del ácido fenilpropiónico, derivados del ácido fenilvalérico, derivados del ácido hidroxicinámico, fenoles simples y otros. El análisis de los resultados mostró que la mayoría de los metabolitos de origen microbiano identificados, en concreto 20, se encontraron en los productos de fermentación de ambos ingredientes. Solo 2 fueron exclusivos de cebolla (ácido gálico y ácido siríngico) y 4 exclusivos de manzana (3-hidroxi-5-(fenil)-valérico, ácido 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico, ácido quínico y ácido ferúlico).

Los resultados obtenidos nos confirmaron que la microbiota empleada para llevar a cabo la fermentación de ambos ingredientes y obtenida a partir de muestras de voluntarios sanos tuvo la capacidad de transformar a los compuestos fenólicos en sus correspondientes metabolitos a través de diversas reacciones (p. ej. hidrólisis de las formas poliméricas y conjugadas y diversas reacciones de oxidación, deshidrogenación, deshidroxilación, desmetilación, isomerizaciones, etc.) (Mosele *et al.*, 2015).

3.2. Efecto del proceso dinámico de DGI-FC sobre los compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH.

El análisis de las muestras obtenidas de la digestión gastrointestinal y fermentación colónica (DGI-FC) durante los 14 días de ingesta de manzana-APH y cebolla-APH mostró que algunos de los compuestos fenólicos presentes en los ingredientes no digeridos fueron detectados en el colon, sin metabolizar.

La acumulación de los compuestos fenólicos durante el proceso de DGI-FC se observó fundamentalmente en el colon ascendente de ambos ingredientes, manzana-APH y cebolla-APH. La presencia de compuestos fenólicos en la primera región del colon podría explicarse en base a la baja bioaccesibilidad observada de los compuestos fenólicos totales en manzana-APH (10%) y cebolla-APH (17,47%) (artículo 2 y 3) que implicaría la llegada al colon de aproximadamente 367,81 µg/g ps y 1704 µg/g ps de compuestos fenólicos cada día, respectivamente. Cabe destacar que los compuestos fenólicos mayoritarios detectados en los productos de fermentación colónica de ambos ingredientes coincidían con los mayoritarios identificados en el ingrediente inicial sin digerir. Así, en las muestras de colon ascendente de manzana-APH destacó la presencia de Q-3-galactósido y Q-3-ramnósido (flavonoles), ácido clorogénico y ácido *p*-cumaroil quínico (ácidos hidroxicinámicos), procianidina B2 y epicatequina (flavan-3-oles), floretin-2'-xiloglucósido y florizina (dihidrochalconas). En el caso de la cebolla-APH, en colon ascendente destacó la presencia de los flavonoles Q-3,4'-diglucósido y Q-4'-glucósido.

En el caso de la manzana y a diferencia de lo observado en el proceso de fermentación del ingrediente de cebolla-APH, algunos compuestos fenólicos, como ácido clorogénico, criptoclorogénico, *p*-cumaroil quínico y procianidina B2 se identificaron también en colon transversal durante los primeros 6 días de ingesta. También destacamos la presencia de dos compuestos minoritarios en el ingrediente inicial como son catequina y *p*-cumárico que fueron detectados durante los 14 días de ingesta en colon transversal y en los primeros días en colon descendente (solo en el caso del *p*-cumárico). La presencia de estos compuestos en las dos últimas regiones del colon podría explicarse si se tiene en cuenta que el ácido *p*-cumárico es un producto del metabolismo de varios ácidos fenólicos y que la catequina podría originarse por la isomerización de epicatequina, compuesto que incrementa su concentración durante la fermentación colónica de los dímeros, trímeros y demás

polímeros de epicatequina presentes en la manzana (Stoupi *et al.*, 2010; Ekbatan *et al.*, 2016).

Los resultados obtenidos sobre la evolución de la quercetina durante el proceso de DGI-FC de ambos ingredientes (manzana-APH y cebolla-APH) mostraron la presencia de quercetina en las tres regiones de colon durante los 14 días de ingesta. Además, la cantidad de quercetina presente en colon ascendente fue superior a la cantidad estimada de quercetina no bioaccesible de manzana-APH y cebolla-APH que diariamente entraba en el fermentador (4 µg y 135 µg, respectivamente). Una posible explicación a estos resultados podría ser la ruptura de los enlaces glicosídicos de los derivados de quercetina no bioaccesibles por acción de la microbiota colónica (Serra *et al.*, 2012). Otro dato relevante fue que el nivel de quercetina en colon transversal y descendente, fue similar o incluso superior (día 4 del periodo de ingesta) en las muestras de fermentación de manzana-APH con respecto a la cebolla-APH, a pesar de que el ingrediente de cebolla-APH presentó antes de la digestión un mayor contenido de quercetina y de glicósidos de quercetina. Este resultado podría explicarse por la diferente composición de la matriz de ambos ingredientes (manzana y cebolla), fundamentalmente por el tipo de fibra y su concentración. La presencia de una concentración alta de pectinas en el ingrediente de manzana-APH podría incrementar la viscosidad durante el proceso de DGI de manzana (artículo 4) lo que disminuiría la bioaccesibilidad de quercetina y favorecería la llegada de una mayor cantidad de quercetina al colon. Una vez allí, la mayor viscosidad causada por las pectinas podría ralentizar la acción de las enzimas de la microbiota intestinal y favorecer una liberación tardía de quercetina a partir de sus glicósidos y por tanto favorecer su acumulación en los dos últimos tramos del colon (Mansoorian *et al.*, 2019).

A diferencia de los modelos estáticos tipo batch que describen una rápida biotransformación de los compuestos fenólicos durante las primeras horas de permanencia en las condiciones simuladas del colon (Parkar *et al.*, 2013), el diseño planteado en la presente Tesis Doctoral donde se realizó una alimentación continua del sistema *in vitro* de DGI-FC con los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH durante 14 días utilizando un modelo dinámico, nos mostró la presencia y acumulación de compuestos fenólicos sin fermentar durante todo el periodo de ingesta y en las tres regiones del colon (ascendente, transversal, descendente), si bien la mayor concentración se encontró en colon ascendente. Este planteamiento se asemeja más a la situación real que puede ocurrir a nivel de fermentación colónica debida a la ingesta continua de un ingrediente de origen vegetal. Los

diferentes resultados encontrados entre la fermentación de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH se deben, en primer lugar, a la distinta composición en compuestos fenólicos que presentan ambos productos, y también a otras diferencias en la composición de su matriz relativas a sus características físico-químicas (pH, acidez), químicas (vitamina C, azúcares, ácidos orgánicos, fibra total, fibra soluble, fibra insoluble, pectinas) y bioquímicas (proteínas totales, actividades enzimáticas PPO y POD).

3.3. Impacto del proceso dinámico de DGI-FC en la formación de metabolitos de compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH.

La formación de metabolitos durante el periodo de ingesta con los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH evolucionó conforme avanzó el proceso de DGI-FC, es decir, se observó una menor concentración de metabolitos en el colon ascendente, y una mayor acumulación de los mismos en el colon descendente. En general, la aparición de los metabolitos ocurre de forma paralela a la desaparición de los compuestos fenólicos precursores que llegaron intactos al colon ascendente.

La presencia y evolución de los metabolitos fenólicos en las diferentes regiones del colon [colon ascendente (CA), transversal (CT) y descendente (CD)] durante el periodo de ingesta con el ingrediente de manzana-APH (Tabla 13) y cebolla-APH (Tabla 14) se describen en los resultados de la presente Tesis Doctoral (artículo 5).

La Tabla 13 muestra los principales metabolitos identificados en cada tramo del colon durante el periodo de ingesta de 14 días con el ingrediente de **manzana-APH**. Se observó la presencia de metabolitos pertenecientes a distintos grupos con estructuras químicas similares como derivados del ácido fenilvalérico, derivados del ácido fenilpropiónico, derivados del ácido hidroxicinámico (ácido cafeico), ácido quínico, floroglucinol y algún derivado del ácido fenilacético como el ácido homovanílico (Tabla 13). La presencia tanto de ácido cafeico como del ácido quínico durante todo el periodo de ingesta en CA y durante la primera mitad en CT y CD estaría relacionado con la acción de la microbiota colónica sobre los ácidos cafeoilquínicos (ácidos clorogénico, neoclorogénico y criptoclorogénico) no bioaccesibles y que llegaron al colon sin sufrir ninguna degradación (Rechner *et al.*, 2004).

Los metabolitos de la familia de los **derivados del ácido fenilvalérico**, 3-hidroxi-5-(fenil)-valérico y ácido 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico, identificados únicamente en los productos de fermentación de la manzana-APH (Tabla 13), provienen del metabolismo de los flavan-3-oles (procianidinas B2 y B1, epicatequina y sus dímeros, trímeros y tetrámeros) (Serra *et al.*, 2011). El ácido 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico se formó desde los primeros días de la ingesta y estuvo presente en los productos de fermentación de las tres regiones del colon (CA, CT y CD). El ácido 3-hidroxi-5-(fenil)-valérico se identificó a partir de la mitad de la ingesta en el CT alcanzando un máximo de concentración en el CD que coincidió con la disminución de la concentración de procianidina B2 y epicatequina. En este estudio no fue posible la identificación de diaril-propanoles e hidroxifenil-γ-valerolactonas, descritos como los primeros compuestos formados en la ruta degradación de los flavan-3-oles (Mena *et al.*, 2019), posiblemente debido a una rápida bioconversión de los mismos hacia ácidos hidroxifenilvaléricos (Appeldoorn *et al.*, 2009).

Tabla 13: Metabolitos fenólicos más representativos en cada una de las regiones del colon durante el proceso de fermentación colónica *in vitro* del ingrediente de manzana-APH.

	COLON ASCENDENTE CA	**COLON TRANSVERSAL CT**	**COLON DESCENDENTE CD**
Derivados del Ac. hidroxicinámico	Cafeico	Cafeico	Cafeico
Derivados del ácido fenilvalérico	4-hidroxi-5-(fenil)-valérico	3-hidroxi-5-(fenil)-valérico 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico	3-hidroxi-5-(fenil)-valérico 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico
Derivados del ác. fenilpropiónico	3-(3-hidroxifenil)-propiónico	3-(3-hidroxifenil)-propiónico **3-(4-hidroxifenil)-propiónico**	3-(3-hidroxifenil)-propiónico **3-(4-hidroxifenil)-propiónico**
Derivados del ácido fenilacético	**Homovanílico**	Homovanílico	3-hidroxifenilacético **4-hidroxifenilacético** Fenilacético
Derivados del ácido benzoico	3,4-dihidroxibenzoico 3,5-dihidroxibenzoico	4-hidroxibenzoico Benzoico	4-hidroxibenzoico 3,5-dihidroxibenzoico Benzoico
Fenoles simples	**Floroglucinol**	Floroglucinol	Floroglucinol
Otros	Ác.quínico	Ác.quínico	Ác.quínico

* En negrita los metabolitos más abundantes.

Se identificaron varios metabolitos del grupo de los **derivados del ácido fenilpropiónico** en los productos de fermentación de ambos ingredientes, manzana-APH y cebolla-APH (Tablas 13 y 14). Los metabolitos mayoritarios de este grupo fueron los

ácidos 3-(3-hidroxifenil)-propiónico y 3-(4-hidroxifenil)-propiónico, presentes en los productos de fermentación de ambos ingredientes. Estos compuestos son considerados como metabolitos comunes en las rutas de bioconversión de distintos compuestos fenólicos, como flavonoles (quercetina) (Figura 61) y ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico) (Figura 62). En el presente estudio, la presencia de estos metabolitos fue significativa en los productos de fermentación de ambos ingredientes, si bien destacaron en los productos de fermentación del ingrediente de manzana-APH (Tabla 13). En la manzana, la formación de estos metabolitos derivados del ácido fenilpropiónico está más relacionada con la ruta de biotransformación de los ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico) que con la de los flavonoles (quercetina y derivados glicosilados) (Parkar *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que los compuestos fenólicos de cebolla son principalmente derivados de quercetina, y que la manzana presenta una composición más compleja donde la concentración de los ácidos hidroxicinámicos es superior a la de los flavonoles, parece probable que los metabolitos derivados del ácido fenilpropiónico provengan, principalmente, de la ruta metabólica de los ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico) en la manzana (Figura 62), y de la ruta de los flavonoles (Q-3-glucósido y Q-3,4'-diglucósido) en la cebolla (Figura 61). Dentro de este grupo destaca el ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico que se identificó en las tres regiones del colon (CA, CT y CD) de los dos ingredientes, manzana-APH y cebolla-APH (Tablas 13 y 14), si bien su concentración fue más alta en la primera región del colon (CA) que en la intermedia y última (CT y CD). El otro metabolito mayoritario, 3-(4-hidroxifenil)-propiónico, no se identificó en CA y empezó a detectarse a partir de CT y también en CD, y su concentración fue incrementándose con los días de ingesta, principalmente en manzana, coincidiendo con la degradación de los compuestos fenólicos precursores identificados en los productos de fermentación.

De los **derivados del ácido fenilacético**, fueron identificados como mayoritarios los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, el ácido 4-hidroxifenilacético y el ácido 3-hidroxifenilacético (Tablas 13 y 14). Estos ácidos se han descrito como los principales metabolitos de la fermentación colónica de quercetina y sus derivados glicosilados (Aura, 2008; Serra *et al.*, 2012) y se han identificado en los productos de fermentación de los dos ingredientes, si bien su concentración fue más alta en los productos de cebolla que en los de manzana. También se identificó el ácido homovanílico (3-metoxi-4-hidroxifenilacético), principalmente en manzana, un producto del metabolismo de distintos compuestos como el

ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, quercetina y de algunos flavan-3-oles (Monagas *et al.*, 2010; Marhuenda-Muñoz *et al.*, 2019).

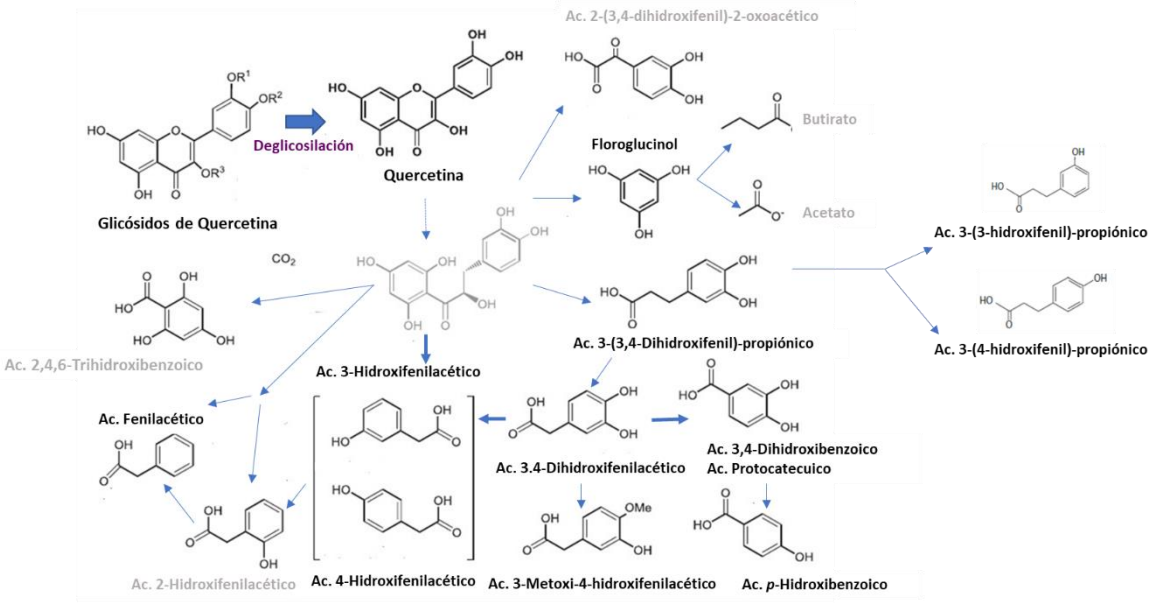


Figura 61: Esquema del metabolismo de los flavonoles (glicósidos de quercetina) por la microbiota intestinal humana. En negrita los metabolitos identificados en este estudio, en gris los que no se han identificado. Adaptado de Almeida *et al.* (2018) y Serra *et al.* (2012).

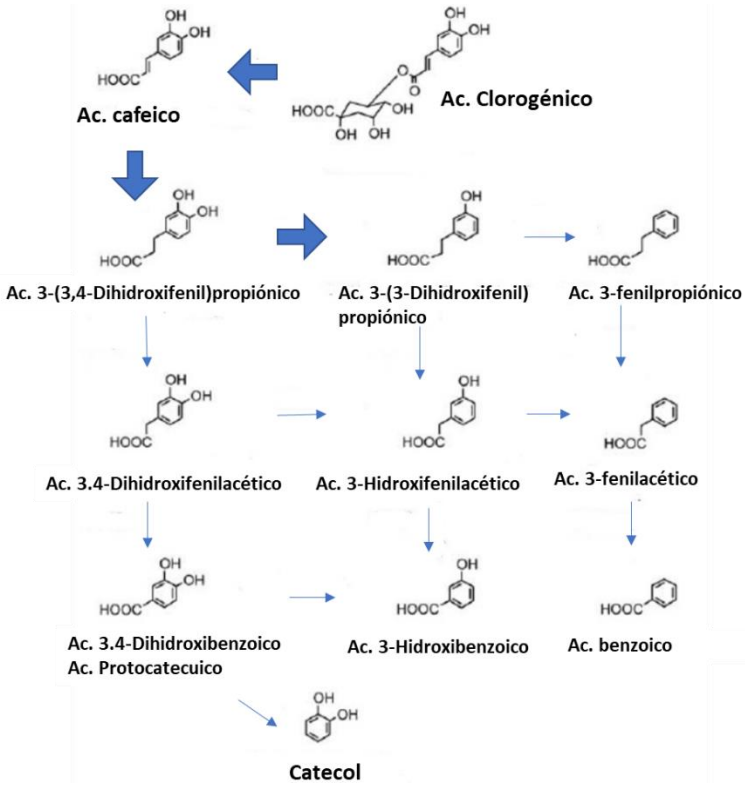


Figura 62: Esquema del metabolismo del ácido clorogénico por la microbiota intestinal humana. Flechas grandes, indican las principales rutas de degradación. Adaptado de Ludwig *et al.* (2013).

Por tanto, en los productos de fermentación de manzana fueron identificados como metabolitos mayoritarios de este grupo, el ácido homovanílico en el CA y el ácido 4-hidroxifenilacético en CD (Tabla 13).

En cebolla-APH, los metabolitos del grupo de los derivados del ácido fenilacético fueron los más abundantes en comparación con los de otros grupos, principalmente en CT y CD. El metabolito más importante en cebolla fue el ácido 3-hidroxifenilacético, cuyo contenido aumentó de forma significativa (p<0,05) durante el periodo de ingesta. Su concentración alcanzó un valor superior a los 1600 µg/100 g pf de slurry (muestra fresca de fermentación colónica) hacia la mitad del periodo de ingesta tanto en CT como en CD, siendo el metabolito más abundante del proceso de fermentación colónica del ingrediente de cebolla-APH. Otro de los metabolitos más importantes en los productos de fermentación del ingrediente de cebolla fue el ácido 4-hidroxifenilacético, cuya concentración se incrementó fundamentalmente al final del periodo de ingesta en el colon descendente. En el caso del ácido 3,4-dihidroxifenilacético, su presencia destacó fundamentalmente en el CT hacia la mitad del periodo de ingesta con ingrediente de cebolla-APH.

Los **derivados del ácido benzoico** se han descrito como productos finales del metabolismo colónico de distintas familias de compuestos fenólicos (Williamson & Clifford, 2010; Stalmach, *et al.*, 2013). Se han identificado en los productos de fermentación de los dos ingredientes, manzana-APH y cebolla-APH, los siguientes metabolitos: ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 3,5-dihidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico y los ácidos siríngico, gálico y benzoico (Tablas 13 y 14).

El ácido 3,5-dihidroxibenzoico fue el metabolito de este grupo más abundante en los productos de fermentación de cebolla-APH, incrementándose su concentración en la última parte del periodo de ingesta (14 días) principalmente en CT y CD. El segundo metabolito más abundante en cebolla fue el ácido benzoico que incrementó significativamente (p<0,05) su concentración en CT y CD. También en los productos de fermentación de manzana-APH, el ácido benzoico incrementó su concentración en CT y CD, si bien en este ingrediente fue el metabolito mayoritario. En los productos de fermentación de manzana, también se identificó el ácido 3,5-dihidroxibenzoico, pero su concentración disminuyó progresivamente durante el periodo de ingesta en las tres regiones del colon (CA, CT y CD). El ácido 3,4-dihidroxibenzoico se identificó principalmente en el CA de los dos

ingredientes, y su concentración se incrementó progresivamente durante el periodo de ingesta. En las otras dos regiones del colon (CT y CD), la concentración de este metabolito disminuyó progresivamente desde el día 1 al día 14 de ingesta.

Respecto a las rutas metabólicas que dan lugar a los metabolitos derivados del ácido benzoico, existen numerosos trabajos que indican que provienen de la fermentación colónica de los compuestos fenólicos (Mosele *et al.*, 2015). Así, el ácido 3,4-dihidroxibenzoico es el principal metabolito de compuestos fenólicos como antocianinas y la quercetina aglicona (Williamson y Clifford, 2010; Juániz *et al.*, 2016). Además, el ácido 3,4-dihidroxibenzoico, que proviene de la biotransformación de compuestos fenólicos de distinta naturaleza, puede ser degradado por la microbiota intestinal para formar ácidos hidroxibenzoicos que finalmente se degradan a ácido benzoico (Stalmach *et al.*, 2013; Mosele *et al.*, 2015). Por otro lado, el ácido 3,5-dihidroxibenzoico, parece no estar ligado a la ruta de degradación de los flavan-3-oles ya que la incorporación de un suplemento de estos compuestos no incrementó la concentración del metabolito (Sánchez-Patán *et al.*, 2011).

Finalmente, otro de los metabolitos importantes identificados en los productos de fermentación de los dos ingredientes, manzana-APH y cebolla-APH, fue el **floroglucinol** cuyo contenido fue especialmente elevado en el CA de los dos ingredientes. El floroglucinol es el último metabolito de las rutas de degradación por la microbiota intestinal de diversos flavonoides (quercetina, procianidinas, chalconas y dihidrochalconas) y formado a partir del anillo A de estos compuestos (Stalmach *et al.*, 2013).

Tabla 14: Metabolitos fenólicos más representativos en cada una de las regiones del colon durante el proceso de fermentación colónica *in vitro* del ingrediente de cebolla-APH.

	COLON ASCENDENTE CA	**COLON TRANSVERSAL CT**	**COLON DESCENDENTE CD**
Derivados del ác. fenilpropiónico	3-(3-hidroxifenil)-propiónico	3-(3-hidroxifenil)-propiónico 3-(4-hidroxifenil)-propiónico	3-(3-hidroxifenil)-propiónico 3-(4-hidroxifenil)-propiónico
Derivados del ácido fenilacético	Homovanílico	3,4-dihidroxifenilacético Homovanílico **3-hidroxifenilacético** 4-hidroxifenilacético Fenilacético	Homovanílico **3-hidroxifenilacético** 4-hidroxifenilacético Fenilacético
Derivados del ácido benzoico	3,5-dihidroxibenzoico Ác.gálico	3,5-dihidroxibenzoico Ác.gálico Ác.benzoico	3,5-dihidroxibenzoico Ác.gálico Ác.benzoico
Fenoles simples	**Floroglucinol**	Floroglucinol	Floroglucinol

* En negrita los metabolitos más abundantes

La incorporación continuada durante 14 días de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH en el sistema dinámico de digestión gastrointestinal y fermentación colónica, ha dado lugar a la producción de algunos metabolitos específicos del ingrediente de manzana y a un gran número de metabolitos identificados en los productos de fermentación de ambos ingredientes, pero con diferente concentración dependiendo del ingrediente estudiado.

Algunos de los metabolitos mayoritarios producidos por la fermentación colónica del ingrediente de cebolla-APH fueron: los ácidos **3-hidroxifenilacético** y 4-hidroxifenilacético (derivados del ácido fenilacético); los ácidos 3,5-dihidroxibenzoico y benzoico (derivados del ácido benzoico) y los ácidos 3-(3-hidroxifenil)-propionico y 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (derivados del ácido fenilpropiónico). Estos metabolitos mayoritarios identificados en los productos de fermentación del ingrediente de cebolla-APH forman parte de la ruta de biotransformación de quercetina y sus derivados (Figura 61) por acción de las enzimas bacterianas (microbiota).

Teniendo en cuenta que la manzana tiene una composición fenólica más compleja que la de la cebolla, los principales metabolitos identificados en los productos de fermentación del ingrediente de manzana-APH fueron: ácidos 3-hidroxi-5-(fenil)-valérico y 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico (derivados del ácido fenilvalérico) sólo identificados en el ingrediente de manzana y pertenecientes a la ruta de bioconversión de los flavan-3-oles; el ácido 4-hidroxifenilacético (derivado del ácido fenilacético), los ácidos **3-(3-hidroxifenil)-propiónico** y **3-(4-hidroxifenil)-propiónico** (derivados del ácido fenilpropiónico). Los metabolitos derivados de los ácidos fenilacético y fenilpropiónico se encontraron en los productos de fermentación colónica de los dos ingredientes, manzana y cebolla. Los metabolitos derivados del ácido fenilpropiónico se han relacionado con las rutas de distintos flavonoides, como flavan-3-oles (procianidinas y epicatequina) (Figura 63) y flavonoles (quercetina) (Figura 61), mientras que los metabolitos derivados del ácido fenilacético están más relacionados con la ruta de biotransformación de flavonoles como la quercetina y sus derivados glicosilados (Figura 61).

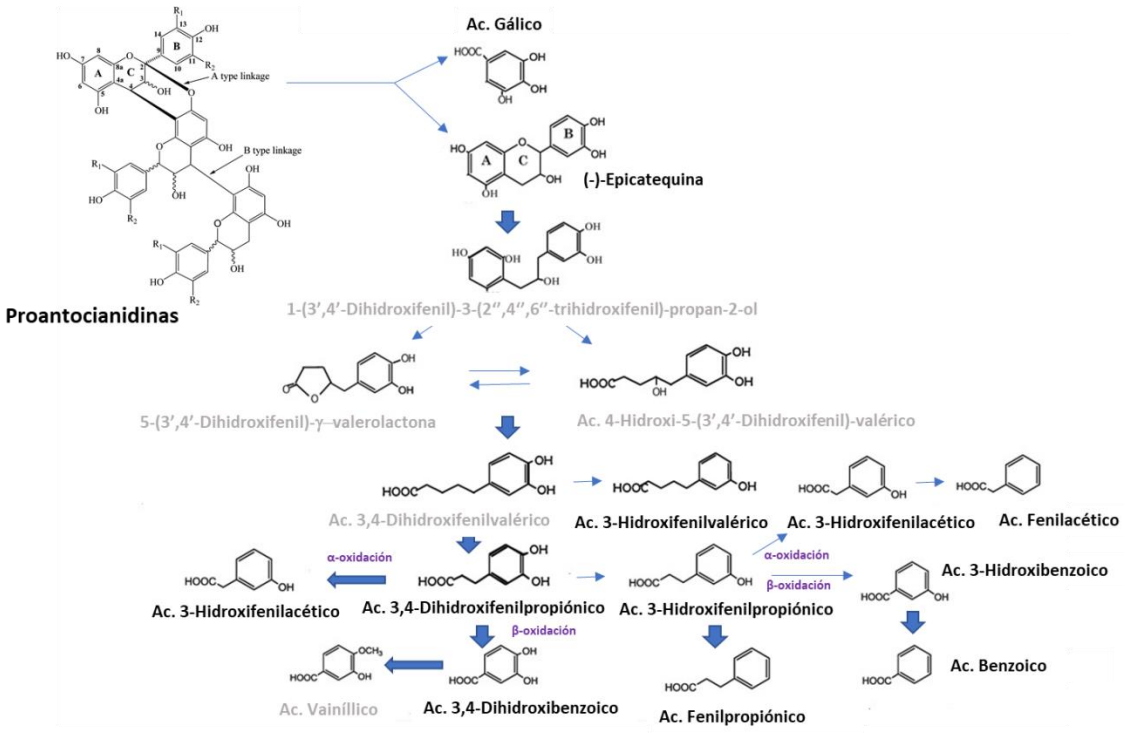


Figura 63: Esquema del metabolismo de los flavan-3-oles (proantocianidinas) por la microbiota intestinal humana. En negrita los metabolitos identificados en este estudio, en gris los que no se han identificado. Adaptado de Jiménez-Girón *et al.* (2014).

Si consideramos los metabolitos mayoritarios presentes en los productos de fermentación de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH, se han identificado algunas diferencias entre ambos ingredientes Se ha observado que ciertos metabolitos se encuentran en mayor concentración en cebolla que en manzana y a la inversa. Por ejemplo, los ácidos **3,4-dihidroxifenilacético, 3-hidroxifenilacético y 4-hidroxifenilacético** presentaron una concentración más alta en **cebolla** que en manzana, mientras que, los **ácidos 3-(3-hidroxifenil)-propiónico y 3-(4-hidroxifenil)-propiónico** presentan mayor concentración en **manzana** que en cebolla. La distinta concentración del mismo metabolito en los productos de fermentación de los ingredientes de manzana y cebolla pueden marcar diferencias respecto a los posibles efectos beneficiosos para la salud relacionados con la ingesta de estos dos ingredientes.

Por ejemplo, el ácido 3-(4-hidroxifenil)-propiónico, presente en mayor concentración en el ingrediente de manzana y que se ha identificado como el principal metabolito de algunos flavan-3-oles, ha mostrado su eficacia *in vitro* en la reducción de la acumulación de lípidos y en la inhibición de la formación de células espumosas (implicadas en la formación de la placa de ateromas) (Zhang *et al.*, 2018). Diversos metabolitos derivados de

la degradación de la quercetina, entre ellos el ácido 3,4-dihidroxifenilacético mayoritario en la cebolla, ha mostrado su influencia sobre la modulación de la producción de las principales citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-iβ y IL-6) (Monagas *et al.*, 2009) y la protección del daño oxidativo ocasionado en las células β-pancreáticas a consecuencia de la acumulación del colesterol (Carrasco-Pozo *et al.*, 2015). También, el ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico mayoritario en manzana, ha mostrado ser un potente vasodilatador, mucho más efectivo que la quercetina. Por tanto, el efecto cardiosaludable de la ingesta de quercetina podría ser debido a uno de sus metabolitos, el ácido 3-(3-hidroxifenil)-propiónico (Najmanova *et al.*, 2016).

Por tanto, diferencias en cuanto a la concentración de un determinado metabolito en uno de los ingredientes estudiados (manzana-APH y cebolla-APH) implicaría que se podrían hacer recomendaciones sobre la ingesta de uno u otro en función del efecto biológico que se quiera alcanzar en el organismo.

3.4. Evaluación del proceso dinámico de DGI-FC de ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH sobre la microbiota colónica humana.

Los resultados mostrados confirman que los compuestos fenólicos que alcanzan el colon son transformados en diversos tipos de metabolitos por la acción de la microbiota, sin embargo y como apuntan diversos autores, la relación entre los compuestos fenólicos y la microbiota es bidireccional ya que los compuestos fenólicos pueden a su vez influir en la composición y funcionalidad de la microbiota colónica (Hervert-Hernández y Goñi, 2011). Con el fin de evaluar la modulación *in vitro* de la microbiota colónica durante el periodo de ingesta de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH, se realizó el análisis de los siguientes grupos microbianos: *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., enterobacterias, *Clostridium* spp., así como de coliformes totales y anaerobios totales.

El balance de anaerobios totales y enterobacterias mostraron que la incorporación de ambos ingredientes creó condiciones favorables para el desarrollo de la microbiota colónica total. En general, el nivel tanto de anaerobios totales como enterobacterias se mantuvo constante en colon transversal y descendente durante la ingesta de ambos ingredientes. El nivel de microorganismos coliformes y del género *Clostridium* spp., asociados a potenciales efectos perjudiciales (Rinninella *et al.*, 2019), se mantuvo e incluso disminuyó en algunos casos, fundamentalmente en colon ascendente, durante el periodo de

ingesta con manzana-APH (0,5 y 1 log UFC/mL, respectivamente) y cebolla-APH (1,5 y 1 log UFC/mL).

Las bacterias lácticas de los géneros *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., a diferencia de los anteriores, están asociadas con la microbiota beneficiosa del colon e involucradas en los procesos de fermentación de los compuestos no digeribles de la dieta y con la producción de ácidos grasos de cadena corta (Rinninella *et al.*, 2019). Durante el periodo de ingesta con ambos ingredientes observamos un incremento del nivel de bifidobacterias y lactobacilos en los tres tramos del colon, destacando sobre todo el incremento en colon ascendente tanto con el ingrediente de manzana-APH (2,5 log UFC/mL en ambos géneros) como con el ingrediente de cebolla-APH (3 y 3,5 log UFC/mL, respectivamente).

Por tanto, podemos concluir que la incorporación diaria tanto del ingrediente de manzana-APH como del de cebolla-APH durante los 14 días produjo un efecto beneficioso sobre la microbiota del colon al aumentar de forma significativa los niveles de las bacterias lácticas beneficiosas de los géneros *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. respecto al nivel basal, y reducir los niveles de microorganismos coliformes totales y del género *Clostridium* spp.

El efecto reductor del crecimiento de microorganismos perjudiciales como coliformes y del género *Clostridium* spp., así como el incremento del nivel *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., fue mayor en el ingrediente de cebolla-APH que en el de manzana-APH. Esta diferencia encontrada entre los dos ingredientes podría deberse a muchos y distintos factores, pero uno de ellos puede ser una mayor acumulación de determinados compuestos fenólicos como quercetina y metabolitos derivados del ácido fenilacético en los productos de fermentación del ingrediente de cebolla-APH, en línea con trabajos previamente publicados (Parkar *et al.*, 2013).

3.5. Evaluación del proceso dinámico de DGI-FC de ingredientes de manzana y cebolla procesadas por APH sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta.

Uno de los principales productos de la fermentación de los componentes no digeribles de la dieta por la acción de la microbiota del colon son los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), particularmente, ácido acético, propiónico y butírico. Los AGCC contribuyen al

mantenimiento de la salud e integridad del intestino grueso a través de diversas funciones: aporte de energía a los colonocitos, regulación del metabolismo lipídico y de la glucosa, disminución del pH luminal dando lugar a la inhibición de microorganismos patógenos y al incremento en la absorción de algunos nutrientes, influencia en la proliferación celular y ciclo celular, en la motilidad intestinal y en el mantenimiento de la integridad de la mucosa y del epitelio intestinal (Morrison y Preston, 2016; Ríos-Covián *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta que cambios en la composición de la microbiota pueden dar lugar a cambios en la formación de estos AGCC (Rowland *et al.*, 2018), la influencia de los compuestos fenólicos sobre la composición y/o actividad biológica de la microbiota podría reflejarse en cambios en la producción de los AGCC (Mosele *et al.*, 2015). Por esta razón, se decidió evaluar la influencia de la incorporación de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH durante los 14 días de ingesta sobre el nivel del ácido acético (C2:0), ácido propiónico (C3:0) y ácido butírico (C4:0).

En general el contenido de los AGCC fue mayor en colon transversal y descendente tanto en los productos de fermentación de manzana-APH como de cebolla-APH, y en ambos casos, el contenido del ácido acético destacó sobre los otros dos AGCC. La incorporación de ambos ingredientes favoreció la acumulación de estos AGCC sobre todo hacia la mitad-final del periodo de 14 días de ingesta. En el caso del ingrediente de manzana-APH se observó un incremento en el contenido de ácido ácetico y ácido propiónico de hasta 2 veces y en el caso del ácido butírico de hasta 7 veces, respecto al día 1 del periodo de ingesta. En el caso del ingrediente de cebolla-APH, los incrementos respecto al día 1 fueron de hasta 5 veces en el caso del ácido acético y butírico, y de 4 veces en el caso del ácido propiónico. Por tanto, parece claro que la incorporación del ingrediente de manzana-APH dio lugar a una mayor acumulación de ácido butírico, y en el caso del ingrediente de cebolla-APH, mayor acumulación de ácido acético y ácido propiónico.

La explicación a las diferencias observadas en cuanto a una mayor producción y acumulación de un determinado AGCC frente a otro entre ambos ingredientes puede hallarse en la diferente composición fenólica y a diferencias en cuanto a la composición de la matriz entre el ingrediente de manzana-APH y cebolla-APH. En este sentido, diversos autores han puesto de manifiesto que la producción de AGCC se afecta por la llegada al colon de determinados compuestos fenólicos. En concreto, hay estudios que señalan que la quercetina aglicona, presente en mayor cantidad en el ingrediente inicial de cebolla y en

los productos de fermentación colónica de cebolla fundamentalmente en colon ascendente, induce mayores incrementos en la producción de ácido propiónico (Parkar *et al.*, 2013). En cambio, otros compuestos como el ácido cafeico (presente en mayor cantidad en los productos de fermentación de manzana-APH) así como determinados alimentos ricos en flavan-3-oles (identificados solo en el ingrediente inicial de manzana-APH y en sus productos de degradación) explicarían mayores incrementos en ácido butírico (Cueva *et al.*, 2015). En lo relativo a la composición de la matriz alimentaria, la presencia de pectinas en el ingrediente de manzana-APH puede suponer un beneficio adicional en la producción de ácido butírico (Aprikian *et al.*, 2003).

DISCUSIÓN INTEGRADORA.

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el estudio del efecto combinado de la matriz vegetal y el procesado por altas presiones hidrostáticas sobre la bioaccesibilidad y metabolismo colónico de compuestos fenólicos de manzana y cebolla con el fin de plantear una estrategia para desarrollar un ingrediente alimentario con potencial carácter funcional. Para evaluar el efecto de la matriz se seleccionaron dos productos vegetales diferentes, manzana (*Malus Domestica*) y cebolla (*Allium cepa*) por tratarse de dos de las fuentes dietéticas más importantes de compuestos fenólicos, principalmente flavonoles (Slimestad *et al*., 2007, Bondonno *et al*., 2017), debido al elevado consumo a nivel mundial de estos dos alimentos vegetales. Este elevado consumo de manzanas y cebollas, tanto frescas como procesadas, implica a su vez la generación de una cantidad elevada de desperdicios y subproductos (cáscaras, piel, capas externas, raíces, tallos, piezas de tamaño no comerciable o con daños mecánicos, etc.) que podrían ser utilizados para la obtención de ingredientes con un alto contenido en compuestos fenólicos y con potencial carácter funcional.

Como tecnología de procesado se ha estudiado el procesado por altas presiones hidrostáticas (APH) que además de obtener alimentos microbiológicamente estables y con las características nutricionales y compuestos bioactivos mínimamente modificados (Balasubramaniam *et al*., 2016), es muy interesante desde el punto de vista medioambiental debido a que no genera residuos y presenta un bajo consumo de agua y electricidad (Soquetta *et al*., 2018). Además, en la presente Tesis se estudió la capacidad de

esta tecnología para incrementar la extracción y la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos utilizando un mismo tipo de compuestos fenólicos, los flavonoles, y dos matrices vegetales distintas, manzana y cebolla.

Según los primeros resultados de esta Tesis Doctoral, el factor matriz puede ser más significativo que el procesado por APH sobre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante como indicaron los resultados de procesar manzanas de la misma variedad 'Golden Delicious' pero cultivadas en dos zonas geográficas distintas (Aragón-España y norte de Italia) a las mismas condiciones de procesado por APH. Así, mientras que el procesado a 400 MPa/35 ºC/5 min incrementó un 30% la extracción de flavonoles totales en ambos tipos de manzana, un tratamiento más intenso de 600 MPa/35 ºC/5 min aumentó un 75% la extracción de flavonoles totales en la manzana de Italia, mientras que disminuyó un 33% en la manzana de España.

Finalmente, para la obtención de los ingredientes objeto de estudio en la presente Tesis, se seleccionaron manzanas 'Golden Delicious' y cebollas 'Recas' producidas en España. La manzana fue procesada a 400 MPa/35 ºC/5 min y la cebolla a 400 MPa/25 ºC/5 min, ya que estos tratamientos mostraron los mejores resultados en términos de extracción de compuestos fenólicos y mantenimiento o menor destrucción de las propiedades antioxidantes. Tras el procesado por APH, los productos de manzana y cebolla fueron liofilizados y pulverizados para obtener ingredientes en polvo de fácil uso y elevada vida útil que fueron utilizados para estudiar el efecto combinado de la matriz vegetal y el procesado por APH sobre los compuestos fenólicos de manzana y cebolla sometidos a un proceso de digestión gastrointestinal (DGI) empleando un modelo dinámico *in vitro*.

Los ingredientes de manzana y cebolla tratadas por APH presentaron una concentración de flavonoles (338,66 y 9751,23 µg/g ps, respectivamente) un 30% y 13% mayor que en los ingredientes de manzana (260,83 µg/g ps) y cebolla (8651,34 µg/g ps) sin tratar. Este efecto positivo del procesado por APH incrementado la extracción de flavonoles se mantuvo durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal, aunque no se vio reflejado en un incremento de la bioaccesibilidad. En el caso de la manzana, la bioaccesibilidad de los flavonoles fue superior en el ingrediente de manzana no tratada (11,58%) que en la tratada por APH (8,58%), si bien la concentración de flavonoles en la fracción bioaccesible fue similar en ambos productos (~30 µg/g ps). En el caso de los ingredientes de cebolla, el tratamiento por APH no modificó la bioaccesibilidad de los

flavonoles totales (~18%) si bien la concentración de los flavonoles en la fracción bioaccesible de la cebolla-APH (1703,6 µg/g ps) fue un 11% mayor que en la cebolla sin tratar (1539,57 µg/g ps), es decir, el efecto del tratamiento por APH que incrementó la extracción de flavonoles en el ingrediente de cebolla antes de la digestión, se mantuvo también después de la DGI en la fracción bioaccesible. Es importante destacar que la estabilidad y bioaccesibilidad de los flavonoles fue mayor cuando éstos estaban contenidos en una matriz vegetal (manzana y cebolla) que, en forma libre, carente de matriz (suplemento dietético), lo que refleja un efecto protector de la matriz vegetal.

En el ingrediente inicial de manzana (no tratada y APH) también se identificaron y cuantificaron otras familias de compuestos fenólicos como los flavan-3-oles (principalmente procianidina B2 y epicatequina) (2457,75 y 2530,45 µg/g ps, respectivamente), ácidos hidroxicinámicos (principalmente ácido clorogénico) (757,94 y 664,29 µg/g ps) y dihidrochalconas (fundamentalmente florizina) (151,85 y 149,39 µg/g ps, respectivamente). En este caso, el ingrediente de manzana-APH mostró bioaccesibilidades más altas que la manzana no procesada, tanto para los ácidos hidroxicinámicos (39,78% *vs*. 31,10%) como para las dihidrochalconas (29,66% *vs*. 19,49%).

Por tanto, en la fracción bioaccesible de cebolla-APH se identificaron y cuantificaron principalmente flavonoles (1704 ± 62,3 µg/g ps) (mayoritarios Q-3,4'-diglucósico y Q-4'-glucósido), mientras que en la manzana además de flavonoles (29,05 ± 2,21 µg/g ps) (principalmente Q-3-galactósido y Q-3-ramnósido) también se encontraron dihidrochalconas (44,31 ± 1,90 µg/g ps) (principalmente florizina) y como compuestos mayoritarios los ácidos hidroxicinámicos (264,07 ± 25,04 µg/g ps) (principalmente ácido clorogénico).

De forma similar a nuestros resultados, tras un proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* de manzana utilizando un modelo estático, se identificaron como compuestos mayoritarios en la fracción bioaccesible a los flavonoles Q-3-galactósido y Q-3-ramnósido, seguidos de varios ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico y dos de sus isómeros) y la dihidrochalcona florizina. Sin embargo, en este caso y a diferencia de nuestro modelo dinámico, la bioaccesibilidad obtenida sobre todo en el caso de los flavonoles y las dihidrochalconas fue mayor (≥ 46%) (Bouayed *et al*., 2012). Respecto a la capacidad de las APH de incrementar la extracción y por tanto la bioaccesibilidad de los compuestos

fenólicos, cabe mencionar que este efecto dependió de la matriz vegetal estudiada (manzana o cebolla) y del tipo de compuesto fenólico, en línea con los resultados descritos por Rodríguez-Roque *et al*., 2015 para los compuestos fenólicos (ácido clorogénico, quercetina y rutina, entre otros) presentes en zumos de frutas elaborados con agua, leche o bebida de soja y tratados por APH.

Respecto al grupo de los flavan-3-oles, no se cuantificaron estos compuestos en la fracción bioaccesible, lo que significa que la mayor parte de estos compuestos que llegaron a la fase de digestión intestinal pudieron alcanzar el colon inalterados. La inestabilidad de los flavan-3-oles durante el proceso de digestión gastrointestinal ha sido previamente descrita en manzana y en otros productos como extractos de uva (Serra *et al*., 2010, Bouayed *et al*., 2012).

En general la actividad antioxidante de los ingredientes de manzana y cebolla (no procesados y procesados por APH) disminuyó progresivamente desde la fase oral a la fase de digestión intestinal de manera similar a la disminución de los compuestos fenólicos, lo que se reflejó en una disminución significativa (p<0,05) de la actividad antioxidante en la fracción bioaccesible de ambos ingredientes. Sin embargo, los compuestos liberados en la fracción bioaccesible del ingrediente de manzana conservaron gran parte de la capacidad de inhibir la actividad de la xantina oxidasa y lipoxigenasa, incluso incrementaron la capacidad de preservar la actividad de la catalasa (fundamentalmente en el ingrediente de manzana-APH). Resultados similares sobre la retención de una gran parte de la capacidad de modular la actividad de estas enzimas por los compuestos fenólicos bioaccesibles procedentes de diversas fuentes vegetales ha sido descrita por otros autores (Gawlik-Dziki, 2012, 2014).

La baja bioaccesibilidad de la mayoría de los compuestos fenólicos estudiados en la presente Tesis, principalmente los flavonoles, permitió que un alto porcentaje de los mismos llegara al colon inalterados, una vez superada la fase de digestión gastrointestinal, y así pudieran ser metabolizados por la microbiota humana (procedente de individuos sanos) dando lugar a distintos metabolitos. Existen numerosos trabajos de investigación que estudian el efecto de la microbiota sobre los compuestos fenólicos utilizando modelos *in vitro*, pero son pocos los que utilizan modelos dinámicos de digestión gastrointestinal y fermentación colónica y suministran de forma continua durante 14 días el alimento real, en este caso los ingredientes de manzana (37,5 g/d) y cebolla (27 g/d). Estas cantidades fueron

seleccionadas teniendo en cuenta la relación de 1,3 encontrada entre el consumo de manzana (9,84 kg/persona/año) y cebolla (7,35 kg/persona/año) en el año 2017 en España (MAPA, 2017). Así, tras la ingesta diaria del ingrediente de manzana-APH (37,5 g), podrían llegar al colon ascendente prácticamente inalterados 9,5 mg de flavan-3-oles (procianidina B2 y epicatequina), 6,36 mg de ácido clorogénico, 6,38 mg de flavonoles (Q-3-galactósido y Q-3-ramnósido) y 3,4 mg de florizina. Por otro lado, tras la ingesta diaria del ingrediente de cebolla (27 g), aproximadamente 112 mg de flavonoles (Q-3,4'-diglucósido y Q-4'-glucósido) podrían alcanzar el colon ascendente inalterados.

El diseño utilizado en la presente Tesis, que simula de forma más próxima las condiciones de la digestión gastrointestinal y de fermentación colónica, permitió constatar la presencia de compuestos fenólicos durante los 14 días de ingesta, principalmente en colon ascendente, aunque en el caso del ingrediente de manzana-APH, algunos compuestos fenólicos (ácido clorogénico, criptoclorogénico, *p*-cumaroil quínico y procianidina B2) también se detectaron en colon transversal. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, los modelos estáticos de fermentación colónica tipo batch muestran una rápida biotransformación de los compuestos fenólicos en el colon (Parkar, *et al*., 2013).

Los compuestos fenólicos presentes inalterados principalmente en el colon ascendente se transformaron en diferentes tipos de metabolitos (destacándose el ácido 3,5-dihidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido 4-hidroxifenilacético y el ácido 3-hidroxifenilacético, los ácidos 3-(3-hidroxifenil)-propiónico y 3-(4-hidroxifenil)-propiónico, los ácidos 3-hidroxi-5-(fenil)-valérico y 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico, y otros como el ácido cafeico, ácido quínico y floroglucinol, entre otros), algunos de los cuáles han sido investigados por sus propiedades beneficiosas en la salud. Algunos de estos metabolitos también han sido descritos durante el metabolismo colónico de manzana (Koutsos *et al*., 2017) así como a partir de compuestos fenólicos puros como quercetina, rutina y ácido clorogénico (Parkar *et al*., 2013, Ekbatan *et al*., 2016) y de otras fuentes de compuestos fenólicos como la uva o el vino tinto (Jiménez Girón *et al*., 2014, Gil Sánchez *et al*., 2018). Los compuestos fenólicos que llegaron al colon tras la ingesta de ambos ingredientes (manzana-APH y cebolla-APH), así como los diferentes metabolitos favorecieron el incremento de bacterias beneficiosas del género *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. y la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). En línea con nuestros resultados, diversos autores han descrito que determinadas fuentes de compuestos fenólicos como la manzana, naranja, uva, cacao, entre otros, pueden generar un efecto

beneficioso sobre la composición de la microbiota presente en el colon (*Lactobacillus* spp., *Bacteroides*, *Biffidobacterium* spp. (Williamson and Clifford, 2010, Tzounis *et al.*, 2011, Duque *et al*., 2016, Koutsos *et al*., 2017, Gil-Sanchez *et al*., 2018). Una mayor producción de AGCC tras la ingesta de compuestos fenólicos podría estar relacionado a su vez con el incremento de algunas poblaciones bacterianas como *Lactobacillus* spp. y *Biffidobacterium* spp (Parkar *et al*., 2013).

Si bien la mayor parte de los metabolitos identificados en las distintas regiones del colon (ascendente, transversal y descendente) mediante metodologías metabolómicas (HPLC-ESI-QTOF-MS, MassHunter, MetaboAnlyst, etc.) eran comunes tras la ingesta de ambos ingredientes, determinados metabolitos como los derivados del ácido fenilacético (ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, 3-hidroxifenilacético y 4-hidroxifenilacético) se acumularon en mayor medida tras la ingesta del ingrediente de cebolla-APH y algunos derivados del ácido fenilpropiónico (ácidos 3-(3-hidroxifenil)-propiónico y 3-(4-hidroxifenil)-propiónico) tras la ingesta del ingrediente de manzana-APH. Por tanto, en base a los estudios que describen distintas propiedades beneficiosas como el efecto vasodilatador del 3-(3-hidroxifenil)-propiónico (Najmanova *et al*., 2016) o el efecto protector del ácido 3,4-dihidroxifenilacético sobre la inflamación y el daño oxidativo (Carrasco-Pozo *et al*., 2015) y los resultados obtenidos se podría esperar que la ingesta de un ingrediente u otro de lugar a diferentes efectos biológicos.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral permiten concluir que es imprescindible determinar la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos en función de la matriz vegetal que se esté estudiando en cada momento (variedad, grado de madurez, origen geográfico, condiciones pre- y postcosecha, etc.) y las variables determinadas del procesado para poder identificar la cantidad del ingrediente o alimento vegetal que ha de ser consumido para que dé lugar a la cantidad necesaria de compuestos fenólicos bioaccesibles y no bioaccesibles que deben producir los efectos biológicos esperados.

CAPÍTULO VI:

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral han sido estructurados en tres secciones, de las cuales se pueden extraer las siguientes conclusiones:

SECCIÓN 1: Obtención de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por altas presiones hidrostáticas.

- El efecto del procesado por altas presiones hidrostáticas sobre los compuestos fenólicos de manzana 'Golden Delicious' y su actividad antioxidante dependió del origen geográfico de la manzana (España o Italia), de la intensidad de la presión aplicada (400, 500 o 600 MPa a 35 ºC durante 5 minutos) y de la estructura química del compuesto (flavonoles, flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y dihidrochalconas).
- La manzana 'Golden Delicious' cultivada en España, procesada a 400 MPa/35 ºC/5 min y liofilizada, dio lugar a un ingrediente en polvo que presentó un mayor contenido en flavonoles (30%), principalmente glicósidos de quercetina, una mayor concentración de compuestos fenólicos totales (30%) y una menor actividad antioxidante (17%) que el producto sin procesar por altas presiones.
- La manzana 'Golden Delicious' cultivada en Italia, procesada a 600 MPa/35 ºC/5 min y liofilizada, dio lugar a un ingrediente en polvo que presentó un mayor contenido en flavonoles (75,4%), principalmente glicósidos de quercetina, una mayor concentración de compuestos fenólicos totales (33%) y una mayor actividad antioxidante (26%) que el producto sin procesar por altas presiones.
- La cebolla 'Recas' cultivada en España, procesada a 400 MPa/25 ºC/5 min y liofilizada, dio lugar a un ingrediente en polvo que presentó un mayor contenido en flavonoles (13%), principalmente glicósidos de quercetina, y una actividad antioxidante similar a la del producto sin procesar por altas presiones.
- Los ingredientes obtenidos de manzana 'Golden Delicious' y cebolla 'Recas' cultivadas en España y procesadas por altas presiones hidrostáticas presentaron una composición en azúcares y ácidos orgánicos similar a la del producto sin procesar. Estos ingredientes también presentaron menor contenido de vitamina C y proteínas totales, sin embargo mostraron mayor concentración en pectinas (sólo en manzana) y parte de la fibra insoluble se transformó en fibra soluble, respecto al ingrediente de manzana y cebolla sin procesar. Los dos ingredientes, manzana-APH y cebolla-APH,

presentaron una excelente calidad microbiológica (< 3 Log UFC/g ps) después de 24 meses de conservación a 4 ºC.

SECCIÓN 2: Efecto de la digestión gastrointestinal dinámica *in vitro* sobre la estabilidad y bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos de los ingredientes de manzana y cebolla procesadas por altas presiones hidrostáticas.

- El proceso *in vitro* de digestión gastrointestinal dinámico de los ingredientes de manzana y cebolla dio lugar a la disminución progresiva de todos los compuestos fenólicos y de la actividad antioxidante determinada por cuatro métodos distintos ($ABTS^{\bullet+}$, $DPPH^{\bullet}$, FRAP, TP-FC) desde la fase de digestión oral hasta la fase de digestión intestinal, independientemente de su naturaleza química (flavonoles, flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y dihidrochalconas), de la matriz vegetal (manzana o cebolla) y de si estaban o no tratadas por altas presiones hidrostáticas.
- El procesado por altas presiones hidrostáticas a 400 MPa/35 ºC/5 min incrementó la concentración de flavonoles totales un 30% antes de la digestión y un 23% en la fase de la digestión intestinal en el ingrediente de manzana, sin embargo, disminuyó la bioaccesibilidad, que fue más baja en el ingrediente de manzana-APH (9%) respecto al ingrediente de manzana no tratada (12%).
- El procesado por altas presiones hidrostáticas a 400 MPa/25 ºC/5 min incrementó la concentración de flavonoles totales un 13% antes de la digestión y un 11% en la fase de la digestión intestinal en el ingrediente de cebolla, sin embargo, la bioaccesibilidad fue similar en el ingrediente de cebolla-APH respecto al ingrediente de cebolla no tratada (~18%).
- Los flavonoles, principalmente derivados glicosilados de quercetina, estuvieron menos expuestos a la degradación progresiva causada por las distintas fases de la digestión gastrointestinal dinámica cuando se encontraron inmersos en una matriz alimentaria (manzana y cebolla) que cuando fueron digeridos libres de matriz como en el caso del suplemento dietético de quercetina que dio lugar a una bioaccesibilidad muy baja (0,028%) comparada con la de manzana (12%) y cebolla (18%).
- La bioaccesibilidad de la quercetina fue mayor en los ingredientes de manzana y cebolla tratadas por altas presiones. Así, la bioaccesibilidad de la quercetina en manzana-APH fue más alta (50%) que la de sus glicósidos mayoritarios, quercetin-3-

ramnósido (6%) y quercetin-3-galactósido (9%). Sin embargo, en cebolla-APH se observó el efecto contrario, es decir, la bioaccesibilidad de la quercetina fue más baja o similar (10%) que la de sus glicósidos mayoritarios, quercetin-3,4'-diglucósido (24%) y quercetin-4'-glucósido (6%).

- Los cambios microestructurales y reológicos de los ingredientes de manzana y cebolla (no tratadas y tratadas por altas presiones), durante la digestión gastrointestinal dinámica, mostraron que el efecto de la matriz alimentaria fue más significativo que el efecto del procesado por altas presiones sobre la liberación de los compuestos fenólicos durante la digestión gastrointestinal y su bioaccesibilidad.
- La estabilidad de los compuestos fenólicos del ingrediente de manzana y su bioaccesibilidad durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal dinámica *in vitro* fue distinta dependiendo de su naturaleza química y del tratamiento por altas presiones. En general, el tratamiento por altas presiones redujo la estabilidad de los flavonoles (derivados de quercetina) durante las distintas fases de la digestión gastrointestinal y también su bioaccesibilidad, sin embargo, incrementó la estabilidad y bioaccesibilidad de los ácidos hidroxicinámicos (ácido clorogénico) y de las dihidrochalconas (florizina). Así, los ácidos hidroxicinámicos presentaron la bioaccesibilidad más alta (40%), seguidos de las dihidrochalconas (30%) y los flavonoles (9%) en el ingrediente de manzana-APH, mientras que los flavan-3-oles (procianidina B2 y epicatequina) no fueron bioaccesibles.

SECCIÓN 3: Fermentación colónica *in vitro* de ingredientes de manzana 'Golden Delicious' y cebolla 'Recas' procesadas por altas presiones hidrostáticas y su efecto sobre la microbiota humana y su metabolismo: producción de metabolitos de compuestos fenólicos y ácidos grasos de cadena corta.

- El modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal y fermentación colónica mostró la acumulación de compuestos fenólicos no bioaccesibles en las tres regiones del colon durante la simulación de una ingesta continua de 14 días de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH, siendo en colon ascendente donde se encontró la mayor concentración de estos compuestos fenólicos. En el caso de la manzana-APH, algunos compuestos fenólicos como ácido clorogénico,

criptoclorogénico, *p*-cumaroil quínico, procianidina B2 y catequina, se identificaron también en colon transversal y descendente.

- El flavonol quercetina se identificó e incrementó su concentración durante los 14 días de ingesta de los dos ingredientes, manzana-APH y cebolla-APH, y en las tres regiones del colon debido a la ruptura de los enlaces glicosídicos de los derivados de quercetina. En el colon transversal y descendente, el nivel de quercetina alcanzó niveles altos y muy similares en los dos ingredientes si bien la concentración de glicósidos de quercetina en el ingrediente de manzana-APH antes de la digestión/fermentación fue menor que en el ingrediente de cebolla-APH.
- La fermentación colónica de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH dio lugar a ácidos fenólicos de distinta naturaleza química (derivados de los ácidos benzoico, fenilacético, fenilpropiónico y fenilvalérico) como resultado del metabolismo de los compuestos fenólicos por la microbiota intestinal. Las tres regiones del colon mostraron una composición específica de metabolitos para cada ingrediente según indicó el análisis metabolómico.
- Como resultado de la fermentación colónica del ingrediente de manzana-APH se formaron los derivados del ácido fenilvalérico, ácidos 3-hidroxi-5-(fenil)-valérico y 4-hidroxi-5-(fenil)-valérico, metabolitos de la ruta de biodegradación de los flavan-3-oles, que no se identificaron en los productos de fermentación del ingrediente de cebolla-APH. También fue una característica diferenciadora del ingrediente de manzana-APH la presencia mayoritaria de los ácidos 3-(3-hidroxifenil)-propiónico y 3-(4-hidroxifenil)-propiónico (derivados del ácido fenilpropiónico), considerado el primero como un potente vasodilatador responsable del efecto cardiosaludable de la quercetina, y el segundo descrito como un inhibidor de la placa de ateroma. Entre los metabolitos resultantes de la fermentación colónica del ingrediente de cebolla-APH, destacaron de forma mayoritaria los ácidos 3,4-dihidroxifenilacético, 3-hidroxifenilacético y 4-hidroxifenilacético (derivados del ácido fenilacético), principales productos de las rutas de degradación de quercetina y derivados glicosilados, descritos como moléculas con propiedades antiinflamatorias.
- La ingesta durante 14 días de los ingredientes de manzana-APH y cebolla-APH produjo un efecto beneficioso sobre la microbiota del colon al aumentar de forma significativa los niveles de las bacterias lácticas beneficiosas de los géneros *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp. respecto al nivel basal, así como al

disminuir el nivel de microorganismos coliformes totales y del género *Clostridium* spp., siendo este efecto más significativo con el ingrediente de cebolla-APH que con el de manzana-APH.

- El proceso de fermentación colónica *in vitro* de ambos ingredientes dio lugar a la producción y acumulación de ácidos grasos de cadena corta (ácido acético, propiónico y butírico) fundamentalmente hacia la mitad-final del periodo de ingesta, observándose mayores incrementos para ácido butírico durante la ingesta del ingrediente de manzana-APH y para ácido acético y propiónico en el caso del ingrediente de cebolla-APH.

CONCLUSIÓN GENERAL: De los resultados obtenidos se puede concluir que tanto la matriz alimentaria como el procesado por altas presiones hidrostáticas tienen una clara influencia en el contenido y extracción de compuestos fenólicos y en la actividad antioxidante, así como en la estabilidad de los mismos durante el proceso de digestión gastrointestinal, en la bioaccesibilidad y finalmente en el metabolismo microbiano. Por tanto, estos dos factores deben ser considerados a la hora de elaborar ingredientes con potencial carácter funcional ya que una combinación adecuada matriz-procesado podría permitir una mayor extracción de compuestos fenólicos durante el proceso de digestión gastrointestinal y fermentación colónica. El modelo dinámico *in vitro* de digestión gastrointestinal y fermentación colónica es una herramienta útil para analizar la influencia de la matriz alimentaria y el procesado sobre la bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos y el metabolismo de la microbiota intestinal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaby, K., Grimsbo, I. H., Hovda, M. B. y Rode, T. M. (2018): Effect of high pressure and thermal processing on shelf life and quality of strawberry puree and juice. *Food Chemistry*, 260, 115-123.

Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Wu, Z. W., Khan, M. A. y Zeng, X. X. (2014): Synergistic impact of sonication and high hydrostatic pressure on microbial and enzymatic inactivation of apple juice. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 70-76.

Acosta-Montoya, O., Vaillant, F., Cozzano, S., Mertz, C., Pérez, A. M. y Castro, M. V. (2010): Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (Rubus adenotrichus Schltdl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119(4), 1497-1501.

AFNOR (1999) NF V08-051: Microbiology of food and animal feeding stuffs. Enumeration of microorganisms by colony-count technique at 30 degrees Celsius, Routine method NF V 08-051.

AFNOR (2002) NF V08-059: Microbiology of food animal feeding stuffs - Enumeration of yeasts and moulds by colony-count technique at 25 °C, Routine method NF V08-059.

Alam, M. A., Subhan, N., Hossain, H., Hossain, M., Reza, H. M., Rahman, M. M. y Ullah, M. O. (2016): Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity. *Nutrition & Metabolism*, 13, 13.

Alarcón-Flores, M. I., Romero-González, R., Vidal, J. L. M. y Frenich, A. G. (2015): Evaluation of the presence of phenolic compounds in different varieties of apple by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 8(3), 696-709.

Alarcón-Flores, M. I., Romero-González, R., Vidal, J. L. M. y Frenich, A. G. (2016): Multiclass determination of phenolic compounds in different varieties of tomato and lettuce by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 19(3), 494-507.

Almeida, A. F., Borge, G. I. A., Piskula, M., Tudose, A., Tudoreanu, L., Valentova, K., Williamson, G. y Santos, C. N. (2018): Bioavailability of quercetin in humans with a focus on interindividual variation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 714-731.

Alminger, M., Aura, A. M., Bohn, T., Dufour, C., El, S. N., Gomes, A., Karakaya, S., Martínez-Cuesta, M. C., McDougall, G. J., Requena, T. y Santos, C. N. (2014): *In vitro* models for studying secondary plant metabolite digestion and bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 413-436.

Andrés, V., Mateo-Vivaracho, L., Guillamón, E., Villanueva, M. J. y Tenorio, M. D. (2016): High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. *Lwt-Food Science and Technology*, 69, 123-130.

AOAC (2012): AOAC official methods of analysis (18th ed.), Gaithersburg, USA: AOAC international.

Appeldoorn, M. M., Vincken, J. P., Aura, A. M., Hollman, P. C. H. y Gruppen, H. (2009): Procyanidin dimers are metabolized by human microbiota with 2-(3,4-dihydroxyphenyl)acetic acid and 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-gamma-valerolactone as the major metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(3), 1084-1092.

Aprikian, O., Duclos, V., Guyot, S., Besson, C., Manach, C., Bernalier, A., Morand, C., Remesy, C. y Demigne, C. (2003): Apple pectin and a polyphenol-rich apple concentrate are more effective together than separately on cecal fermentations and plasma lipids in rats. *Journal of Nutrition*, 133(6), 1860-1865.

Araya, X. I. T., Hendrickx, M., Verlinden, B. E., Van Buggenhout, S., Smale, N. J., Stewart, C. y Mawson, A. J. (2007): Understanding texture changes of high pressure processed fresh carrots: A microstructural and biochemical approach. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 873-884.

Aune, D., Giovannucci, E., Boffetta, P., Fadnes, L. T., Keum, N., Norat, T., Greenwood, D. C., Riboli, E., Vatten, L. J. y Tonstad, S. (2017): Fruit and vegetable intake and the risk of cardiovascular disease, total cancer and all-cause mortality-a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Epidemiology*, 46(3), 1029-1056.

Aura, A. M. (2008): Microbial metabolism of dietary phenolic compounds in the colon. *Phytochemistry Reviews*, 7(3), 407-429.

Bahadoran, Z., Mirmiran, P. y Azizi, F. (2013): Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of diabetes and metabolic disorders*, 12(1), 43.

Balasubramaniam, V. M., Barbosa-Cánovas, G. V. y Lelieveld, H. L. (2016): *High Pressure Processing of Food. Principles, Technology and Applications*, *Food Engineering Series*, Springer New York.

Balasubramaniam, V. M., Martínez-Monteagudo, S. I. y Gupta, R. (2015): Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry en Doyle, M. P. y Klaenhammer, T. R., eds., Annual Review of Food Science and Technology, Vol 6, Palo Alto: Annual Reviews, 435-462.

Barba, F. J., Esteve, M. J. y Frigola, A. (2013): Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*, 50(2), 545-549.

Barrett, D. M. y Lloyd, B. (2012): Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(1), 7-22.

Beesk, N., Perner, H., Schwarz, D., George, E., Kroh, L. W. y Rohn, S. (2010): Distribution of quercetin-3,4'-*O*-diglucoside, quercetin-4 '-*O*-monoglucoside, and quercetin in different parts of the onion bulb (Allium cepa L.) influenced by genotype. *Food Chemistry*, 122(3), 566-571.

Benzie, I. F. F. y Strain, J. J. (1996): The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76.

Bermúdez-Soto, M. J., Tomás-Barberán, F. A. y García-Conesa, M. T. (2007): Stability of polyphenols in chokeberry (Aronia melanocarpa) subjected to *in vitro* gastric and pancreatic digestion. *Food Chemistry*, 102(3), 865-874.

Biesalski, H. K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Muller, M., Schrenk, D., Walter, P. y Weber, P. (2009): Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11-12), 1202-1205.

Black, E. P., Setlow, P., Hocking, A. D., Stewart, C. M., Kelly, A. L. y Hoover, D. G. (2007): Response of spores to high-pressure processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(4), 103-119.

Blanquet-Diot, S., Denis, S., Chalancon, S., Chaira, F., Cardot, J. y Alric, M. (2012): Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharmaceutical Research*, 29(6), 1444-1453.

Blanquet-Diot, S., Soufi, M., Rambeau, M., Rock, E. y Alric, M. (2009): Digestive stability of xanthophylls exceeds that of carotenes as studied in a dynamic *in vitro* gastrointestinal system. *Journal of Nutrition*, 139(5), 876-883.

Blanquet-Diot, S., Zeijdner, E., Beyssac, E., Meunier, J. P., Denis, S., Havenaar, R. y Alric, M. (2004): A dynamic artificial gastrointestinal system for studying the behavior of orally administered drug dosage forms under various physiological conditions. *Pharmaceutical Research*, 21(4), 585-591.

Bo, C. D., Bernardi, S., Marino, M., Porrini, M., Tucci, M., Guglielmetti, S., Cherubini, A., Carrieri, B., Kirkup, B., Kroon, P., Zamora-Ros, R., Liberona, N. H., Andrés-Lacueva, C. y Riso, P. (2019): Systematic review on polyphenol intake and health outcomes: is there sufficient evidence to define a health-promoting polyphenol-rich dietary pattern?. *Nutrients*, 11(6).

Bohn, T. (2014): Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutrition Reviews*, 72(7), 429-452.

Bondonno, C. P., Yang, X. B., Croft, K. D., Considine, M. J., Ward, N. C., Rich, L., Puddey, I. B., Swinny, E., Mubarak, A. y Hodgson, J. M. (2012): Flavonoid-rich apples and nitrate-rich spinach augment nitric oxide status and improve endothelial function in healthy men and women: a randomized controlled trial, *Free Radical Biology and Medicine*, 52(1), 95-102.

Bondonno, N. P., Bondonno, C. P., Ward, N. C., Hodgson, J. M. y Croft, K. D. (2017): The cardiovascular health benefits of apples: Whole fruit vs. isolated compounds. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 243-256.

Bouayed, J., Deusser, H., Hoffmann, L., y Bohn, T. (2012): Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following *in vitro* digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, 131(4), 1466-1472.

Boyer, J. y Liu, R. H. (2004): Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutrition Journal*, 3, 15.

Bradford, M. M. (1976): Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995): Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28(1), 25-30.

Briones-Labarca, V., Venegas-Cubillos, G., Ortiz-Portilla, S., Chacana-Ojeda, M. y Maureira, H. (2011): Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny Smith apple. *Food Chemistry*, 128(2), 520-529.

Canteri, M. H. G., Fertonani, H. C. R., Waszczynskyj, N. y Wosiacki, G. (2005): Extraction of pectin from apple pomace. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(2), 259-266.

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J. y Frigola, A. (2014): Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155-171.

Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Esteve, M. J. y Frigola, A. (2015): Effect of Stevia rebaudiana addition on bioaccessibility of bioactive compounds and antioxidant activity of beverages based on exotic fruits mixed with oat following simulated human digestion. *Food Chemistry*, 184, 122-130.

Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J. y Queipo-Ortuno, M. I. (2013): Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415-1422.

Carlson, B. M. (2019): Chapter 12 - The Digestive System en Carlson, B. M., ed. *The Human Body*, Academic Press, 321-355.

Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Castillo, R. L. y Chen, C. (2015): 3,4-dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic beta-cells dysfunction induced by high cholesterol. *Experimental Cell Research*, 334(2), 270-282.

Castro-Gómez, F., Fontecha, J. y Rodríguez-Alcalá, L. M. (2014): A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological and foodstuff samples. *Talanta*, 128, 518-523.

Cederholm, T., Barazzoni, R., Austin, P., Ballmer, P., Biolo, G., Bischoff, S. C., Compher, C., Correia, I., Higashiguchi, T., Hoist, M., Jensen, G. L., Malone, A., Muscaritoli, M., Nyulasi, I., Pirlich, M., Rothenberg, E., Schindler, K., Schneider, S. M., de van der Schueren, M. A. E., Sieber, C., Valentini, L., Yu, J. C., Van Gossum, A. y Singer, P. (2017): ESPEN guidelines on definitions and terminology of clinical nutrition. *Clinical Nutrition*, 36(1), 49-64.

Cilla, A., Alegria, A., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Plaza, L., Clemente, G., Lagarda, M. J. y Barbera, R. (2012): Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7282-7290.

Colina-Coca, C., González-Peña, D., de Ancos, B. y Sánchez-Moreno, C. (2017): Dietary onion ameliorates antioxidant defence, inflammatory response, and cardiovascular risk biomarkers in hypercholesterolemic Wistar rats. *Journal of Functional Foods*, 36, 300-309.

Colina-Coca, C., Rodríguez-Alcalá, L. M., Fontecha, J., González-Peña, D., de Ancos, B. y Sánchez-Moreno, C. (2014): Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. *Food Research International*, 64, 546-552.

Corrales, M., Butz, P. y Tauscher, B. (2008a): Anthocyanin condensation reactions under high hydrostatic pressure. *Food Chemistry*, 110(3), 627-635.

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D. y Tauscher, B. (2008b): Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 85-91.

Crozier, A., Del Rio, D. y Clifford, M. N. (2010): Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467.

Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Munoz-González, I., Esteban-Fernández, A., Gil-Sánchez, I., Dueñas, M., Martín-Álvarez, P. J., Pozo-Bayon, M. A., Bartolomé, B. y Moreno-Arribas, M. V. (2015): Application of a new Dynamic Gastrointestinal Simulator (SIMGI) to study the impact of red wine in colonic metabolism. *Food Research International*, 72, 149-159.

Cueva, C., Silva, M., Pinillos, I., Bartolomé, B. y Moreno-Arribas, M. V. (2020): Interplay between dietary polyphenols and oral and gut microbiota in the development of colorectal cancer. *Nutrients*, 12(3).

Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. y Drasarb, B. S. (1989): The gut microflora and its significance, en R. Whithead ed., *Gastrointestinal Pathology and Oesophageal Pathology*, Churchill Livingstone, Edinburgh, 201-219.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. y Masella, R. (2007): Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell´Istituto superiore di sanita*, 43(4), 348-61.

Dall'Asta, M., Calani, L., Tedeschi, M., Jechiu, L., Brighenti, F. y Del Rio, D. (2012): Identification of microbial metabolites derived from *in vitro* fecal fermentation of different polyphenolic food sources. *Nutrition*, 28(2), 197-203.

De Boever, P., Deplancke, B. y Verstraete, W. (2000): Fermentation by gut microbiota cultured in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem is improved by supplementing a soygerm powder. *Journal of Nutrition*, 130(10), 2599-2606.

Dembinska-Kiec, A., Mykkanen, O., Kiec-Wilk, B.y Mykkanen, H. (2008): Antioxidant phytochemicals against type 2 diabetes. *British Journal of Nutrition*, 99, ES109-ES117.

Dinnella, C., Minichino, P., D´Andrea, A. M. y Monteleone, E. (2007): Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8423-8429.

Duba, K. S. y Fiori, L. (2015): Extraction of bioactives from food processing residues using techniques performed at high pressures. *Current Opinion in Food Science*, 5, 14-22.

Duque, A., Monteiro, M., Adorno, M. A. T., Sakamoto, I. K. y Sivieri, K. (2016): An exploratory study on the influence of orange juice on gut microbiota using a dynamic colonic model. *Food Research International*, 84, 160-169.

Egert, S., Bosy-Westphal, A., Seiberl, J., Kurbitz, C., Settler, U., Plachta-Danielzik, S., Wagner, A. E., Frank, J., Schrezenmeir, J., Rimbach, G., Wolffram, S. y Muller, M. J. (2009): Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition*, 102(7), 1065-1074.

Ekbatan, S. S., Sleno, L., Sabally, K., Khairallah, J., Azadi, B., Rodes, L., Prakash, S., Donnelly, D. J. y Kubow, S. (2016): Biotransformation of polyphenols in a dynamic multistage gastrointestinal model. *Food Chemistry*, 204, 453-462.

El Gharras, H. (2009): Polyphenols: food sources, properties and applications - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2512-2518.

Elamin, W. M., Endan, J. B., Yosuf, Y. A. y Ahmedov, A. (2015): High pressure processing technology and equipment evolution: A review. *Journal of Engineering Science and Technology Review*, 8(5), 75-83.

Elashoff, J. D., Reedy, T. J. y Meyer, J. H. (1982): Analysis of gastric-emptying data. Gastroenterology, 83(6), 1306-1312.

El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. A. M., Goransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A. K. y Verpoorte, R. (2012): Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(44), 10877-10895.

Espín, J. C., González-Sarrias, A. y Tomás-Barberán, F. A. (2017): The gut microbiota: A key factor in the therapeutic effects of (poly) phenols. *Biochemical Pharmacology*, 139, 82-93.

Espinal-Ruíz, M., Restrepo-Sánchez, L. P., Narváez-Cuenca, C. E. y McClements, D. J. (2016): Impact of pectin properties on lipid digestion under simulated gastrointestinal conditions: Comparison of citrus and banana passion fruit (Passiflora tripartita var. mollissima) pectins. *Food Hydrocolloids*, 52, 329-342.

Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Privat, M., Denis, S., Cardot, J. M., Alric, M. y Blanquet-Diot, S. (2011): Effect of a new probiotic saccharomyces cerevisiae strain on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in a dynamic gastrointestinal model. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(3), 1127-1131.

Eurostat (European Statistical Office). (2019): Agricultural production - orchards. Apple trees. Disponible en: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agricultural_production_-_orchards#Apple_trees [Consulta 29 de julio de 2019].

FAOSTAT (2018a): Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops. Onions, dry. Disponible en: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC [Consulta: 5 de mayo de 2020].

FAOSTAT (2018b): Food and Agriculture Organization of the United Nations. Crops. Apple. Disponible en: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC [Consulta: 23 de julio de 2020].

FEPEX (Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores de Frutas y Hortalizas). (2018): Consumo total de hortalizas y frutas por meses en el hogar. Datos procedentes de MAGRAMA procesados por FEPEX. Disponible en: https://www.fepex.es/Info/Documentos/pdf/Consumo/ConsumoMensual18.pdf [Consulta 26 de junio de 2019].

Fernández-García, E., Carvajal-Lerida, I. y Pérez-Gálvez, A. (2009): *In vitro* bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751-760.

Ferruzzi, M. G. (2010): The influence of beverage composition on delivery of phenolic compounds from coffee and tea. *Physiology & Behavior*, 100(1), 33-41.

Francini, A. y Sebastiani, L. (2013): Phenolic compounds in apple (Malus x Domestica Borkh.): compounds characterization and stability during postharvest and after processing. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 2(3), 181-93.

Gawlik-Dziki, U. (2012): Changes in the antioxidant activities of vegetables as a consequence of interactions between active compounds. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 872-882.

Gawlik-Dziki, U. (2014): Modification of enzymatic and non-enzymatic *in vitro* oxidative defence system by bioaccessible phytonutrients of selected spices. *LWT-Food Science and Technology*, 57(1), 434-441.

Gawlik-Dziki, U., Dziki, D., Swieca, M. y Nowak, R. (2017): Mechanism of action and interactions between xanthine oxidase inhibitors derived from natural sources of chlorogenic and ferulic acids. *Food Chemistry*, 225, 138-145.

George, J. M., Selvan, T. S. y Rastogi, N. K. (2016): High-pressure-assisted infusion of bioactive compounds in apple slices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 100-107.

Giada, M. L. R. (2013): Food phenolic compounds: Main classes, sources and their antioxidant power en Morales-González, J. A., ed. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases: A Role for Antioxidants*, INTECH: 87-106.

Gil-Izquierdo, A., Zafrilla, P. y Tomás-Barberán, F. A. (2002): An *in vitro* method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *European Food Research and Technology*, 214(2), 155-159.

Gil-Sánchez, I., Cueva, C., Sanz-Buenhombre, M., Guadarrama, A., Moreno-Arribas, M. V. y Bartolomé, B. (2018): Dynamic gastrointestinal digestion of grape pomace extracts: Bioaccessible phenolic metabolites and impact on human gut microbiota. *Journal of Food Composition and Analysis*, 68, 41-52.

Gomes, A. C., Hoffmann, C. y Mota, J. F. (2018): The human gut microbiota: Metabolism and perspective in obesity. *Gut Microbes*, 9(4), 308-325.

González-Peña, D., Colina-Coca, C., Char, C. D., Cano, M. P., de Ancos, B. y Sánchez-Moreno, C. (2013): Hyaluronidase inhibiting activity and radical scavenging potential of flavonols in processed onion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4862-4872.

González-Talice, J., Yuri, J. A. y del Pozo, A. (2013): Relations among pigments, color and phenolic concentrations in the peel of two Gala apple strains according to canopy position and light environment. *Scientia Horticulturae*, 151, 83-89.

Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B. y Smith, B. (2002): Onions - A global benefit to health. *Phytotherapy Research*, 16(7), 603-615.

Guerra, A., Etienne-Mesmin, L., Livrelli, V., Denis, S., Blanquet-Diot, S. y Alric, M. (2012): Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion. *Trends in Biotechnology*, 30(11), 591-600.

Gullón, B., Pintado, M. E., Fernández-Lopez, J., Perez-Álvarez, J. A. y Viuda-Martos, M. (2015): *In vitro* gastrointestinal digestion of pomegranate peel (Punica granatum) flour obtained from co-products: Changes in the antioxidant potential and bioactive compounds stability. *Journal of Functional Foods*, 19, 617-628.

Hartemink, R. y Rombouts, F. M. (1999): Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*, 36(3), 181-192.

Hernández Hernández, A., Coronel Rodríguez, C., Monge Zamorano, M. y Quintana Herrera, C. (2015): Microbiota, probióticos, prebióticos y simbióticos. *Pediatr Integral*, XIX (5), 337-354.

Hernández, A. y Cano, M. P. (1998): High-pressure and temperature effects on enzyme inactivation in tomato puree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 266-270.

Hervert-Hernández, D. y Goñi, I. (2011): Dietary polyphenols and human gut microbiota: a review. *Food Reviews International*, 27(2), 154-169.

Hite, B. H. (1899): The effect of pressure in the preservation of milk. *West Virginia Agricultural and Forestry Experiment Station Bul*letins, 58, 15-35.

Hite, B. H., Giddings, N. J. y Weakly, C. E. (1914): The effects of pressure on certain microorganisms encountered in the preservation of fruits and vegetables., *Washington, Va. University, Agriculture Experiment Station, Bulletin*, 146, 1-67.

Hogan, E., Kelly, A. L. y Sun, D. W. (2005): *High pressure processing of foods: an overview. Emerging Technologies for Food Processing*, Amsterdam: Elsevier Science Bv.

Hooper, L., Kay, C., Abdelhamid, A., Kroon, P. A., Cohn, J. S., Rimm, E. B. y Cassidy, A. (2012): Effects of chocolate, cocoa, and flavan-3-ols on cardiovascular health: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 95(3), 740-751.

Hooper, L., Kroon, P. A., Rimm, E. B., Cohn, J. S., Harvey, I., Le Cornu, K. A., Ryder, J. J., Hall, W. L. y Cassidy, A. (2008): Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88(1), 38-50.

Hostetler, G. L., Ralston, R. A. y Schwartz, S. J. (2017): Flavones: food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity. *Advances in Nutrition*, 8(3), 423-435.

Howlett, J. (2008): Functional foods from science to health and claims. ILSI Europe, 36 Disponible en: http://ilsi.eu/Europe/Publications/C2008Func_FoodEng.pdf. [Consulta 18 de julio de 2019].

Hu, M. L. (2011): Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung medical journal*, 34(5), 449-60.

Huang, H. W., Wu, S. J., Lu, J. K., Shyu, Y. T. y Wang, C. Y. (2017): Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. *Food Control*, 72, 1-8.

Hussain, T., Tan, B., Yin, Y. L., Blachier, F., Tossou, M. C. B. y Rahu, N. (2016): Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us?. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 9.

ISO (2001) 16649-2:2001: Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

ISO (2006) 4832:2006: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique.

ISO (2017a) 21528-2:2017: Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count technique.

ISO (2017b) 11290-1:2017: Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method.

ISO (2017c) 6579-1:2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp..

Jakobek, L. (2015): Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins. *Food Chemistry*, 175, 556-567.

Jakobek, L., García-Villalba, R. y Tomás-Barberán, F. A. (2013): Polyphenolic characterisation of old local apple varieties from Southeastern European region. *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), 199-211.

Janowicz, M. y Lenart, A. (2018): The impact of high pressure and drying processing on internal structure and quality of fruit. *European Food Research and Technology*, 244(8), 1329-1340.

Jez, M., Wiczkowski, W., Zielinska, D., Bialobrzewski, I. y Blaszczak, W. (2018): The impact of high pressure processing on the phenolic profile, hydrophilic antioxidant and reducing capacity of puree obtained from commercial tomato varieties. *Food Chemistry*, 261, 201-209.

Jiang, X., Huang, J., Song, D. Q., Deng, R., Wei, J. C. y Zhang, Z. (2017): Increased consumption of fruit and vegetables is related to a reduced risk of cognitive impairment and dementia: meta-analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 11.

Jiménez-Girón, A., Muñoz-González, I., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. y Bartolomé, B. (2014): Towards the fecal metabolome derived from moderate red wine intake. *Metabolites*, 4(4), 1101-18.

Juániz, I., Ludwig, I. A., Bresciani, L., Dall'Asta, M., Mena, P., Del Rio, D., Cid, C. y de Peña, M. P. (2016): Catabolism of raw and cooked green pepper (Capsicum annuum) (poly)phenolic compounds after simulated gastrointestinal digestion and faecal fermentation. *Journal of Functional Foods*, 27, 201-213.

Juárez-Iglesias, M. y Perote Alejandre, A. (2010): *Alimentos saludables y de diseño específico. Alimentos funcionales*., Instituto Tomás Pascual para la Nutrición y la Salud.

Kaushik, D., O'Fallon, K., Clarkson, P. M., Dunne, C. P., Conca, K. R. y Michniak-Kohn, B. (2012): Comparison of quercetin pharmacokinetics following oral supplementation in humans. *Journal of Food Science*, 77(11), H231-H238.

Kawabata, K., Yoshioka, Y. y Terao, J. (2019): Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols. *Molecules*, 24(2), 25.

Keenan, D. F., Brunton, N., Gormley, R. y Butler, F. (2011): Effects of thermal and high hydrostatic pressure processing and storage on the content of polyphenols and some quality attributes of fruit smoothies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(2), 601-607.

Kemperman, R. A., Bolca, S., Roger, L. C. y Vaughan, E. E. (2010): Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology-Sgm*, 156, 3224-3231.

Kevers, C., Pincemail, J., Tabart, J., Defraigne, J. O. y Dommes, J. (2011): Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6165-6171.

Khan, M. K., Zill, E. H. y Dangles, O. (2014): A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 33(1), 85-104.

Kim, Y., Keogh, J. B. y Clifton, P. M. (2016): Polyphenols and glycemic control. *Nutrients*, 8(1), 27.

Kontula, P., Jaskari, J., Nollet, L., De Smet, I., von Wright, A., Poutanen, K. y Mattila-Sandholm, T. (1998): The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on a fermented oat bran product: effects on the gastrointestinal microbiota. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 246-252.

Koutchma, T., Popovic, V., Ros-Polski, V. y Popielarz, A. (2016): Effects of ultraviolet light and high-pressure processing on quality and health-related constituents of fresh juice products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(5), 844-867.

Koutsos, A., Lima, M., Conterno, L., Gasperotti, M., Bianchi, M., Fava, F., Vrhovsek, U., Lovegrove, J. A., y Tuohy, K. M. (2017): Effects of commercial apple varieties on human gut microbiota composition and metabolic output using an *in vitro* colonic model. *Nutrients*, 9(6), 23.

Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E. y Etherton, T. D. (2002): Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113, 71-88.

Kumar, S. y Pandey, A. K. (2013): Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal*, 16.

Lafay, S. y Gil-Izquierdo, A. (2007): Bioavailability of phenolic acids. *Phytochemistry Reviews*, 7(2), 301.

Lamperi, L., Chiuminatto, U., Cincinelli, A., Galvan, P., Giordani, E., Lepri, L. y Del Bubba, M. (2008): Polyphenol levels and free radical scavenging activities of four

apple cultivars from integrated and organic farming in different Italian areas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(15), 6536-6546.

Landl, A., Abadias, M., Sarraga, C., Vinas, I. y Picouet, P. A. (2010): Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple puree product. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 557-564.

Larsson, M., Minekus, M. y Havenaar, R. (1997): Estimation of the bioavailability of iron and phosphorus in cereals using a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(1), 99-106.

Lata, B., Trampczynska, A. y Paczesna, J. (2009): Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. Scientia Horticulturae, 121(2), 176-181.

Lee, K. W., Kim, Y. J., Kim, D. O., Lee, H. J. y Lee, C. Y. (2003): Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6516-6520.

Lefebvre, D. E., Venema, K., Gombau, L., Valerio, L. G., Raju, J., Bondy, G. S., Bouwmeester, H., Singh, R. P., Clippinger, A. J., Collnot, E. M., Mehta, R. y Stone, V. (2015): Utility of models of the gastrointestinal tract for assessment of the digestion and absorption of engineered nanomaterials released from food matrices. *Nanotoxicology*, 9(4), 523-542.

Lewandowska, U., Szewczyk, K., Hrabec, E., Janecka, A. y Gorlach, S. (2013): Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12183-12199.

Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M. y Li, H. B. (2014): Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.

Liew, S. Q., Chin, N. L., Yusof, Y. A. y Sowndhararajan, K. (2016): Comparison of acidic and enzymatic pectin extraction from passion fruit peels and its gel properties. *Journal of Food Process Engineering*, 39(5), 501-511.

Lin, X. C., Zhang, I., Li, A., Manson, J. E., Sesso, H. D., Wang, L. y Liu, S. M. (2016): Cocoa flavanol intake and biomarkers for cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Nutrition*, 146(11), 2325-2333.

Liu, R. H. (2013a): Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition*, 4(3), 384S-392S.

Liu, R. H. (2013b): Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of Food Science*, 78, A18-A25.

Liu, S., Manson, J. E., Lee, I. M., Cole, S. R., Hennekens, C. H., Willett, W. C. y Buring, J. E. (2000): Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease: The Women's Health Study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(4), 922-928.

Lu, C. W., Zhu, W. B., Shen, C. L. y Gao, W. M. (2012): Green tea polyphenols reduce body weight in rats by modulating obesity-related genes. *Plos One*, 7(6), 11.

Lucas-González, R., Viuda-Martos, M., Pérez-Alvarez, J. A. y Fernández-López, J. (2018): *In vitro* digestion models suitable for foods: Opportunities for new fields of application and challenges. *Food Research International*, 107, 423-436.

Ludwig, I. A., de Peña, M. P., Cid, C. y Crozier, A. (2013): Catabolism of coffee chlorogenic acids by human colonic microbiota. *Biofactors*, 39(6), 623-632.

Macfarlane, G. T. y Macfarlane, S. (2007): Models for intestinal fermentation: association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(2), 156-162.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. y Jiménez, L. (2004): Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5), 727-747.

Mansoorian, B., Combet, E., Alkhaldy, A., García, A. L. y Edwards, C. A. (2019): Impact of fermentable fibres on the colonic microbiota metabolism of dietary polyphenols rutin and quercetin. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(2), 12.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2017): Informe del Consumo de Alimentos en España 2017. Disponible en: http://apromar.es/sites/default/files/2018/Informe%20Consumo%20Alimentario%20Espa%C3%B1a%202017.pdf.

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2018a): Informe del consumo alimentario en España. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2018/default.aspx?parte=3&capitulo=07&grupo=9&seccion=3. [Consulta: 26 de junio de 2019].

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación). (2018b): Serie histórica de superficie y producción según variedades. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2018/default.aspx?parte=3&capitulo=07&grupo=6&seccion=34 [Consulta: 26 de junio de 2019].

Marhuenda-Muñoz, M., Laveriano-Santos, E. P., Tresserra-Rimbau, A., Lamuela-Raventos, R. M., Martínez-Huelamo, M. y Vallverdu-Queralt, A. (2019): Microbial phenolic metabolites: which molecules actually have an effect on human health?. *Nutrients*, 11(11), 15.

Martínez-Florez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tunon, M. J. (2002): Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutricion hospitalaria*, 17(6), 271-8.

Marzorati, M., Verhelst, A., Luta, G., Sinnott, R., Verstraete, W., Van de Wiele, T. y Possemiers, S. (2010): *In vitro* modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 168-176.

Mateos-Aparicio, I., Mateos-Peinado, C. y Rupérez, P. (2010): High hydrostatic pressure improves the functionality of dietary fibre in okara by-product from soybean. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(3), 445-450.

Matser, A. A., Krebbers, B., van den Berg, R. W. y Bartels, P. V. (2004): Advantages of high pressure sterilisation on quality of food products. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 79-85.

Mena, P., Bresciani, L., Brindani, N., Ludwig, I. A., Pereira-Caro, G., Angelino, D., Llorach, R., Calani, L., Brighenti, F., Clifford, M. N., Gill, C. I. R., Crozier, A., Curti, C. y Del Rio, D. (2019): Phenyl-gamma-valerolactones and phenylvaleric acids, the

main colonic metabolites of flavan-3-ols: synthesis, analysis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports*, 36(5), 714-752.

Mendonca, R. D., Carvalho, N. C., Martin-Moreno, J. M., Pimenta, A. M., Lopes, A. C. S., Gea, A., Martínez-González, M. A. y Bes-Rastrollo, M. (2019): Total polyphenol intake, polyphenol subtypes and incidence of cardiovascular disease: The SUN cohort study. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 29(1), 69-78.

Michels, K. B., Giovannucci, E., Joshipura, K. J., Rosner, B. A., Stampfer, M. J., Fuchs, C. S., Colditz, G. A., Speizer, F. E. y Willett, W. C. (2000): Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(21), 1740-1752.

Minekus, M., Marteau, P., Havenaar, R. y Huisintveld, J. H. J. (1995): A multicompartmental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small-intestine. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals*, 23(2), 197-209.

Mitic-Culafic, D., Nikolic, B., Simin, N., Jasnic, N., Cetojevic-Simin, D., Krstic, M. y Knezevic-Vukcevic, J. (2016): Effect of Allium flavum L. and Allium melanantherum Pan. extracts on oxidative DNA damage and antioxidative enzymes superoxide dismutase and catalase. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(1), 28-34.

Molly, K., Vandewoestyne, M., Desmet, I. y Verstraete, W. (1994): Validation of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) reactor using microorganism-associated activities. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 7(4), 191-200.

Monagas, M., Khan, N., Andrés-Lacueva, C., Urpi-Sarda, M., Vázquez-Agell, M., Lamuela-Raventos, R. M. y Estruch, R. (2009): Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *British Journal of Nutrition*, 102(2), 201-206.

Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., Andrés-Lacueva, C. y Bartolomé, B. (2010): Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, 1(3), 233-253.

Moriarty, R. M., Naithani, R. y Surve, B. (2007): Organosulfur compounds in cancer chemoprevention. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 7(8), 827-838.

Morrison, D. J. y Preston, T. (2016): Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7(3), 189-200.

Mosele, J. I., Macia, A. y Motilva, M. J. (2015): Metabolic and microbial modulation of the large intestine ecosystem by non-absorbed diet phenolic compounds: a review. *Molecules*, 20(9), 17429-17468.

Mujica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C. T., Welti-Chanes, J. y Torres, J. A. (2011): High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 969-985.

Musacchi, S. y Serra, S. (2018): Apple fruit quality: Overview on pre-harvest factors. *Scientia Horticulturae*, 234, 409-430.

Mytton, O. T., Nnoaham, K., Eyles, H., Scarborough, P. y Mhurchu, C. N. (2014): Systematic review and meta-analysis of the effect of increased vegetable and fruit consumption on body weight and energy intake. *Bmc Public Health*, 14, 11.

Najmanova, I., Pourova, J., Voprsalova, M., Pilarova, V., Semecky, V., Novakova, L. y Mladenka, P. (2016): Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(5), 981-991.

Nebra, Y. y Blanch, A. R. (1999): A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(11), 5173-5176.

Norton, T. y Sun, D. W. (2008): Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2-34.

Oboh, G., Agunloye, O. M., Akinyemi, A. J., Ademiluyi, A. O. y Adefegha, S. A. (2013): Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats'brain-*in vitro*. *Neurochemical Research*, 38(2), 413-419.

Oey, I., Lille, M., Van Loey, A. y Hendrickx, M. (2008a): Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 320-328.

Oey, I., Van der Plancken, I., Van Loey, A. y Hendrickx, M. (2008b): Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems?. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 300-308.

Ofori, J. A. y Hsieh, Y. H. P. (2013): *Novel technologies for the production of functional foods, Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*, Chichester: Wiley-Blackwell.

OMS (Organización Mundial de la Salud). (2019): Biblioteca electrónica de documentación científica sobre medidas nutricionales (eLENA). Disponible en: https://www.who.int/elena/titles/fruit_vegetables_ncds/es/.

ONU (Organización de las Naciones Unidas). (2015): Objetivos de desarrollo sostenible (ODS). Disponible en: https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/2015/09/la-asamblea-general-adopta-la-agenda-2030-para-el-desarrollo-sostenible/.

Ozdal, T., Sela, D. A., Xiao, J. B., Boyacioglu, D., Chen, F. y Capanoglu, E. (2016): The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 36.

Pal, R. (2011): Rheology of simple and multiple emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16(1), 41-60.

Pandey, K. B. y Rizvi, S. I. (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.

Parkar, S. G., Trower, T. M. y Stevenson, D. E. (2013): Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*, 23, 12-19.

Patras, A., Brunton, N. P., Da Pieve, S. y Butler, F. (2009b): Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purees. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3), 308-313.

Patras, A., Brunton, N., Da Pieve, S., Butler, F. y Downey, G. (2009a): Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental colour of tomato and carrot purees. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(1), 16-22.

Payne, A. N., Zihler, A., Chassard, C. y Lacroix, C. (2012): Advances and perspectives in *in vitro* human gut fermentation modelling. *Trends in Biotechnology*, 30(1), 17-25.

Pérez-Jiménez, J., Neveu, V., Vos, F. y Scalbert, A. (2010): Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 4959-4969.

Plaza, L., Colina, C., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C. y Cano, M. P. (2012): Influence of ripening and astringency on carotenoid content of high-pressure treated persimmon fruit (Diospyros kaki L.). *Food Chemistry*, 130(3), 591-597.

Possemiers, S., Bolca, S., Verstraete, W. y Heyerick, A. (2011): The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia*, 82(1), 53-66.

Primec, M., Micetic-Turk, D. y Langerholc, T. (2017): Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. *Analytical Biochemistry*, 526, 9-21.

Prior, R. L. y Cao, G. H. (2000): Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables: Diet and health implications. *Hortscience*, 35(4), 588-592.

Prochazkova, D., Bousova, I. y Wilhelmova, N. (2011): Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.

Putnik, P., Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Roohinejad, S., Jambrak, A. R., Granato, D., Montesano, D. y Kovacevic, D. B. (2018): Novel food processing and extraction technologies of high-added value compounds from plant materials. *Foods*, 7(7), 16.

Quilés, A., Hernando, I., Perez-Munuera, I., Larrea, V., Llorca, E. y Lluch, M. A. (2005): Polyphenoloxidase (PPO) activity and osmotic dehydration in Granny Smith apple. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(6), 1017-1020.

Quiñones, M., Miguel, M. y Aleixandre, A. (2012): The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease. *Nutricion hospitalaria*, 27(1), 76-89.

Quirós-Sauceda, A. E., Palafox-Carlos, H., Sayago-Ayerdi, S. G., Ayala-Zavala, J. F., Bello-Pérez, L. A., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., González-Cordova, A. F. y González-Aguilar, G. A. (2014): Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & Function*, 5(6), 1063-1072.

Raso, J. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2003): Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 265-285.

Rasouli, H., Farzaei, M. H. y Khodarahmi, R. (2017): Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20, 1700-1741.

Rastogi, N. K., Nguyen, L. T. y Balasubramaniam, V. M. (2008): Effect of pretreatments on carrot texture after thermal and pressure-assisted thermal processing. *Journal of Food Engineering*, 88(4), 541-547.

Rastogi, N. K., Raghavarao, K., Balasubramaniam, V. M., Niranjan, K. y Knorr, D. (2007): Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69-112.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. y Rice-Evans, C. (1999): Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.

Rechner, A. R., Smith, M. A., Kuhnle, G., Gibson, G. R., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., Moore, K. P. y Rice-Evans, C. A. (2004): Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(2), 212-225.

Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernández, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K. y Pinto, M. D. (2013): Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 75(3), 588-602.

Ribas-Agusti, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. y Elez-Martínez, P. (2018): Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531-2548.

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A. y Mele, M. C. (2019): What is the healthy gut microbiota composition? a changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1), 22.

Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., de los Reyes-Gavilán, C. G. y Salazar, N. (2016): Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Frontiers in Microbiology*, 7(185).

Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P. y Martín-Belloso, O. (2015): Impact of food matrix and processing on the *in vitro* bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33-43.

Roldán-Marín, E., Sánchez-Moreno, C., Lloria, R., de Ancos, B. y Cano, M. P. (2009): Onion high-pressure processing: Flavonol content and antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 42(4), 835-841.

Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I. y Tuohy, K. (2018) Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 1-24.

Ruiz-Cruz, S., Chaparro-Hernández, S., Hernández-Ruiz, K. L., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Gassos Ortega, L. E., Ornelas-Paz, J. J. y López Mata, M. A. (2017): Flavonoids: important biocompounds in food en Justino, J., ed. *Flavonoids: From Biosynthesis to Human Health*, London: IntechOpen, 353–369.

San Martin, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. (2002): Food processing by high hydrostatic pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(6), 627-645.

Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Plaza, L., Elez-Martínez, P. y Cano, M. P. (2009): Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(6), 552-576.

Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., De Ancos, B., Martin-Belloso, O. y Cano, M. P. (2005): Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4403-4409.

Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M. V. y Bartolomé, B. (2011): Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2241-2247.

Santana-Gálvez, J., Cisneros-Zevallos, L. y Jacobo-Velázquez, D. A. (2017): Chlorogenic acid: recent advances on its dual role as a food additive and a nutraceutical against metabolic syndrome. *Molecules*, 22(3), 21.

Santana-Gálvez, J. and Jacobo-Velázquez, D. A. (2018): Classification of phenolic compounds en Nollet, L. M. L. y Gutierrez Uribe, J. A., eds. *Phenolic Compounds in Food: Characterization and Analysis*, Boca Raton: Crc Press-Taylor & Francis Group, 3-20.

Sari, A. C., Elya, B. y Katrin (2017): Activity and lipoxygenase enzyme inhibition assay with total flavonoid assay of Garcinia porrecta Laness. stem bark extracts. *Pharmacognosy Journal*, 8(2), 257-266.

Saveta Popa, D. y Emil Rusu, M. (2017): Isoflavones: vegetable sources, biological activity, and analytical methods for their assessment en Shiomi, N. y Waisundara, V., eds. *Superfood and Functional Food - The Development of Superfoods and Their Roles as Medicine*, London: IntechOpen.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. y Jiménez, L. (2005): Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(4), 287-306.

Schewe, T., Steffen, Y. y Sies, H. (2008): How do dietary flavanols improve vascular function? A position paper. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 102-106.

Schmitz-Eiberger, M. y Matthes, A. (2011): Effect of harvest maturity, duration of storage and shelf life of apples on the allergen Mal d 1, polyphenoloxidase activity and polyphenol content. *Food Chemistry*, 127(4), 1459-1464.

Segneanu, A. E., Velciov, S. M., Olariu, S., Cziple, F., Damian, D. y GrozescuI, I. (2017): Bioactive molecules profile from natural compounds en Asao, T. y Asaduzzaman, M., eds. *Aminoacid—new insights and roles in plant and animal*, IntechOpen, 209-228.

Selma, M. V., Espín, J. C. y Tomás-Barberán, F. A. (2009): Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 6485-6501.

Serra, A., Macia, A., Romero, M. P., Angles, N., Morello, J. R. y Motilva, M. J. (2011): Metabolic pathways of the colonic metabolism of procyanidins (monomers and dimers) and alkaloids. *Food Chemistry*, 126(3), 1127-1137.

Serra, A., Macia, A., Romero, M. P., Reguant, J., Ortega, N. y Motilva, M. J. (2012): Metabolic pathways of the colonic metabolism of flavonoids (flavonols, flavones and flavanones) and phenolic acids. *Food Chemistry*, 130(2), 383-393.

Serra, A., Macia, A., Romero, M. P., Valls, J., Blade, C., Arola, L. y Motilva, M. J. (2010): Bioavailability of procyanidin dimers and trimers and matrix food effects in *in vitro* and *in vivo* models. *British Journal of Nutrition*, 103**,** 944-952.

Sharma, A., Kashyap, D., Sak, K., Tuli, H. S. y Sharma, A. K. (2018): Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 7(1), 15-32.

Shay, J., Elbaz, H. A., Lee, I., Zielske, S. P., Malek, M. H. y Huttemann, M. (2015): Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 13.

Shi, G. J., Li, Y., Cao, Q. H., Wu, H. X., Tang, X. Y., Gao, X. H., Yu, J. Q., Chen, Z. y Yang, Y. (2019): *In vitro* and *in vivo* evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, 1085-1099.

Shim, S. M. (2012): Changes in profiling of phenolic compounds, antioxidative effect and total phenolic content in Smilax china under *in vitro* physiological condition. *Journal of Food Biochemistry*, 36(6), 748-755.

Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V. y Ramassamy, C. (2008): Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(13), 4855-4873.

Singleton, V. L. y Rossi, J. A. (1985): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.

Slimestad, R., Fossen, T. y Vagen, I. M. (2007): Onions: A source of unique dietary flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(25), 10067-10080.

Soquetta, M. B., Terra, L. D. y Bastos, C. P. (2018): Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *Cyta-Journal of Food*, 16(1), 400-412.

Soria, A. C. y Villamiel, M. (2010): Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331.

Srinivas, M. S., Madhu, B., Srinivas, G. y Jain, S. K. (2018): High Pressure Processing of foods: A review. *The Andhra Agricultural Journal*, 65(spl), 467-476.

Srivastava, S., Somasagara, R. R., Hegde, M., Nishana, M., Tadi, S. K., Srivastava, M., Choudhary, B. y Raghavan, S. C. (2016): Quercetin, a natural flavonoid interacts with DNA, arrests cell cycle and causes tumor regression by activating mitochondrial pathway of apoptosis. *Scientific Reports*, 6, 13.

Stalmach, A., Edwards, C. A., Wightman, J. D. y Crozier, A. (2013): Colonic catabolism of dietary phenolic and polyphenolic compounds from Concord grape juice. *Food & Function*, 4(1), 52-62.

Steinmetz, K. A. y Potter, J. D. (1996): Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 96(10), 1027-1039.

Stoupi, S., Williamson, G., Drynan, J. W., Barron, D. y Clifford, M. N. (2010): A comparison of the *in vitro* biotransformation of (-)-epicatechin and procyanidin B2 by human faecal microbiota. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(6), 747-759.

Sugiyama, H., Akazome, Y., Shoji, T., Yamaguchi, A., Yasue, M., Kanda, T. y Ohtake, Y. (2007): Oligomeric procyanidins in apple polyphenol are main active components for inhibition of pancreatic lipase and triglyceride absorption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4604-4609.

Sun, D. W. (2005): *Emerging technologies for food processing*, London, UK: Elsevier Academic Press.

Szabo, K., Catoi, A. F. y Vodnar, D. C. (2018): Bioactive compounds extracted from tomato processing by-products as a source of valuable nutrients. *Plant Foods for Human Nutrition*, 73(4), 268-277.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Betolini, D. y Conte, A. (2010): *In vitro* bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606.

Tamargo, A., Gil-Sánchez, I., Miralles, B., Martin, D., García-Risco, M. R., Fornari, T., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V. y Cueva, C. (2017): The dynamic gastrointestinal simulator (simgi ®): a useful tool for clinical nutrition. *Nutricion hospitalaria*, 34(6), 1489-1496.

Tannock, G. W., Munro, K., Harmsen, H. J. M., Welling, G. W., Smart, J. y Gopal, P. K. (2000): Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing Lactobacillus rhamnosus DR20. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2578-2588.

Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lamela, C., Vázquez, M. y Simal-Gándara, J. (2001): Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3(2), 66-81.

Terefe, N. S., Buckow, R. y Versteeg, C. (2014): Quality-related enzymes in fruit and vegetable products: Effects of novel food processing technologies, Part 1: High-pressure processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(1), 24-63.

Terefe, N. S., Yang, Y. H., Knoerzer, K., Buckow, R. y Versteeg, C. (2010): High pressure and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in strawberry puree. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 52-60.

Tinahones, F. J. (2017): La importancia de la microbiota en la obesidad. *Revista Española De Endocrinología Pediátrica*, 8 (Suppl), 16-20.

Tonello, C. (2013): Procesado de alimentos por altas presiones. Disponible en: http://www.eoi.es/fdi/sites/default/files/Presentaci%C3%B3n%20_HPP%20Hiperbaric%20Abril%2013.pdf].

Toranzo, J. O. (2016): *Producción mundial de manzanas y peras*, 1a ed., INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria).

Torres, B., Tiwari, B. K., Patras, A., Cullen, P. J., Brunton, N. y O'Donnell, C. P. (2011): Stability of anthocyanins and ascorbic acid of high pressure processed blood orange juice during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(2), 93-97.

Torres, J. A. y Velázquez, G. (2005): Commercial opportunities and research challenges in the high pressure processing of foods. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 95-112.

Tresserra-Rimbau, A., Lamuela-Raventos, R. M. y Moreno, J. J. (2018): Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. *Biochemical Pharmacology*, 156, 186-195.

Tresserra-Rimbau, A., Medina-Remon, A., Pérez-Jiménez, J., Martínez-González, M. A., Covas, M. I., Corella, D., Salas-Salvado, J., Gomez-Gracia, E., Lapetra, J., Aros, F., Fiol, M., Ros, E., Serra-Majem, L., Pinto, X., Munoz, M. A., Saez, G. T., Ruiz-Gutierrez, V., Warnberg, J., Estruch, R., Lamuela-Raventos, R. M. y Investigators, P. S. (2013): Dietary intake and major food sources of polyphenols in a Spanish population at high cardiovascular risk: The PREDIMED study. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 23(10), 953-959.

Tsao, R. (2010): Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2(12), 1231-1246.

Tsao, R., Yang, R., Christopher, J., Zhu, Y. y Zhu, H. H. (2003): Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6347-6353.

Tzounis, X., Rodríguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G. R., Kwik-Uribe, C. y Spencer, J. P. E. (2011): Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 62-72.

US Apple Association (2018): Production & Utilization Analysis. Disponible en: https://wstfa.org/wstfa-assets/uploads/USApple2018ProductionAnalysis.pdf [Consulta: 17 de julio de 2019].

USDA (U.S. Department of Agriculture) (2015): USDA Database for the flavonoid content of selected foods. Release 3.2. Disponible en: https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-database-flavonoid-content-selected-foods-release-32-november-2015/resource/b6ae8bff [Consulta 6 de junio de 2020].

USDA (U.S. Department of Agriculture) (2018a): National nutrient database for standard reference legacy release. Basic Report: 09003, Apples, raw, with skin. Disponible en: https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/09003?fgcd=&manu=&format=&count=&max=25&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=APPLE+RAW&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing= [Consulta 17 de julio de 2019].

USDA (U.S. Department of Agriculture) (2018b): National nutrient database for standard reference legacy release. Basic Report: 11282, Onions, raw. Disponible en: https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/11282? [Consulta 17 de julio de 2019].

Valdes, A. M., Walter, J., Segal, E. y Spector, T. D. (2018): Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Clinical research ed.)*, 361, k2179.

Valdes, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M. y González, S. (2015): The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food & Function*, 6(8), 2424-2439.

Van de Wiele, T. R., Oomen, A. G., Wragg, J., Cave, M., Minekus, M., Hack, A., Cornelis, C., Rompelberg, C. J. M., De Zwart, L. L., Klinck, B., Van Wijnen, J., Verstraete, W. y Sips, A. (2007): Comparison of five *in vitro* digestion models to *in vivo* experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *Journal of Environmental Science and Health* Part A-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 42(9), 1203-1211.

Van den Abbeele, P., Grootaert, C., Possemiers, S., Verstraete, W., Verbeken, K. y Van de Wiele, T. (2009): *In vitro* model to study the modulation of the mucin-adhered bacterial community. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(2), 349-359.

Vatankhah, N. y Ramaswamy, H. S. (2019): High pressure impregnation (HPI) of apple cubes: Effect of pressure variables and carrier medium. *Food Research International*, 116, 320-328.

Vauzour, D. (2012): Dietary polyphenols as modulators of brain functions: biological actions and molecular mechanisms underpinning their beneficial effects. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 16.

Vauzour, D., Rodríguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J. y Spencer, J. P. E. (2010): Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, 2(11), 1106-1131.

Vázquez-Gutiérrez, J. L., Hernández-Carrion, M., Quiles, A. y Hernando, I. (2014): Influence of storage at 4 degrees C on the stability of high hydrostatic pressure treated onion. *Czech Journal of Food Sciences*, 32(1), 96-101.

Vázquez-Gutiérrez, J. L., Plaza, L., Hernando, I., Sánchez-Moreno, C., Quiles, A., de Ancos, B. y Cano, M. P. (2013): Changes in the structure and antioxidant properties of onions by high pressure treatment. *Food & Function*, 4(4), 586-591.

Velázquez, G., Vazquez, P., Vazquez, M. y Torres, J. A. (2005): Advances in the food processing by high pressure. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(5), 353-367.

Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleivelan, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D. y Wichers, H. (2015): *The Impact of food bioactives on health. In vitro and Ex Vivo models*, Springer International Publishing.

Verlinde, P., Oey, I., Hendrickx, M. y Van Loey, A. (2008): High-pressure treatments induce folate polyglutamate profile changes in intact broccoli (Brassica oleraceae L. cv. Italica) tissue. *Food Chemistry*, 111(1), 220-229.

Viadel Crespo, B., Rivera Patiño, J. D., Navarro Fayos, M. T., Tenllado Llavador, I., Carreres Malonda, J. E., García Reverter, J., Blasco Piquer, M. y Subirats Huerta, S. (2012): Equipo modular de digestión *in vitro*. Patente nº ES 2 361 983 B1.

Vijayalaxmi, S., Jayalakshmi, S. K. y Sreeramulu, K. (2015): Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology-Mysore*, 52(5), 2761-2769.

Villemejane, C., Denis, S., Marsset-Baglieri, A., Alric, M., Aymard, P. y Michon, C. (2016): *In vitro* digestion of short-dough biscuits enriched in proteins and/or fibres using a multi-compartmental and dynamic system (2): Protein and starch hydrolyses. *Food Chemistry*, 190, 164-172.

Visioli, F., De La Lastra, C. A., Andrés-Lacueva, C., Aviram, M., Calhau, C., Cassano, A., D'Archivio, M., Faria, A., Fave, G., Fogliano, V., Llorach, R., Vitaglione, P., Zoratti, M. y Edeas, M. (2011): Polyphenols and human health: A prospectus. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(6), 524-546.

Wang, P. Y., Fang, J. C., Gao, Z. H., Zhang, C. y Xie, S. Y. (2016): Higher intake of fruits, vegetables or their fiber reduces the risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *Journal of Diabetes Investigation*, 7(1), 56-69.

Wang, W. Y., Sun, C. X., Mao, L. K., Ma, P. H., Liu, F. G., Yang, J. y Gao, Y. X. (2016): The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 21-38.

WAPA (The World Apple and Pear Association). (2019): European Apple and Pear Crop Forecast. Disponible en: http://www.wapa-association.org/docs/2019/European_summary_reduced.pdf

Wgiorgis, G. A. (2019): Review on high-pressure processing of foods. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1-23.

WHO (World Health Organisation). (2003): Fruit and Vegetable promotion initiative. A meeting report/25-27/08/03,. Disponible en: https://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/f&v_promotion_initiative_report.pdf?ua=1 [Consulta 16 de julio de 2019].

Wiczkowski, W. (2018): Chapter 28-garlic and onion-production, biochemistry, and processing en Siddiq, M. y Uebersax, M. A., eds., *Handbook of Vegetables and Vegetable Processing*, Second Edition.

Willfor, S. M., Smeds, A. I. y Holmbom, B. R. (2006): Chromatographic analysis of lignans. *Journal of Chromatography A*, 1112(1-2), 64-77.

Williamson, G. (2017): The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin*, 42(3), 226-235.

Williamson, G. y Clifford, M. N. (2010): Colonic metabolites of berry polyphenols: the missing link to biological activity?. *British Journal of Nutrition*, 104, S48-S66.

Woo, H. D. y Kim, J. (2013): Dietary flavonoid intake and risk of stomach and colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 19(7), 1011-1019.

Xie, F., Li, M., Lan, X. H., Zhang, W., Gong, S. X., Wu, J. H. y Wang, Z. W. (2017): Modification of dietary fibers from purple-fleshed potatoes (Heimeiren) with high hydrostatic pressure and high pressure homogenization processing: A comparative study. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 42, 157-164.

Yaldagard, M., Mortazavi, S. A. y Tabatabaie, F. (2008): The principles of ultra high pressure technology and its application in food processing/preservation: A review of microbiological and quality aspects. *African Journal of Biotechnology*, 7(16), 2739-2767.

Yamagata, K., Tagami, M. y Yamori, Y. (2015): Dietary polyphenols regulate endothelial function and prevent cardiovascular disease. *Nutrition*, 31(1), 28-37.

Zamora-Ros, R., Knaze, V., Rothwell, J. A., Hemon, B., Moskal, A., Overvad, K., Tjonneland, A., Kyro, C., Fagherazzi, G., Boutron-Ruault, M. C., Touillaud, M., Katzke, V., Kuhn, T., Boeing, H., Forster, J., Trichopoulou, A., Valanou, E., Peppa, E., Palli, D., Agnoli, C., Ricceri, F., Tumino, R., de Magistris, M. S., Peeters, P. H. M., Bueno-de-Mesquita, H. B., Engeset, D., Skeie, G., Hjartaker, A., Menéndez, V., Agudo, A., Molina-Montes, E., Huerta, J. M., Barricarte, A., Amiano, P., Sonestedt, E., Nilsson, L. M., Landberg, R., Key, T. J., Khaw, K. T., Wareham, N. J., Lu, Y. X., Slimani, N., Romieu, I., Riboli, E. y Scalbert, A. (2016): Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European Journal of Nutrition*, 55(4), 1359-1375.

Zhang, H. y Mittal, G. S. (2008): Effects of high-pressure processing (HPP) on bacterial spores: An overview. *Food Reviews International*, 24(3), 330-351.

Zhang, H. y Tsao, R. (2016): Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.

Zhang, L., Wang, Y. J., Li, D. X., Ho, C. T., Li, J. S. y Wan, X. C. (2016): The absorption, distribution, metabolism and excretion of procyanidins. *Food & Function*, 7(3), 1273-1281.

Zhang, Y. Y., Li, X. L., Li, T. Y., Li, M. Y., Huang, R. M., Li, W. y Yang, R. L. (2018): 3-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid, a major microbial metabolite of procyanidin A2, shows similar suppression of macrophage foam cell formation as its parent molecule. *RSC Advances*, 8(12), 6242-6250.

Zhang, Y., Liu, X. C., Wang, Y. T., Zhao, F., Sun, Z. J. y Liao, X. J. (2016): Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 135-144.

Zhao, C. N., Meng, X., Li, Y., Li, S., Liu, Q., Tang, G. Y. y Li, H. B. (2017): Fruits for prevention and treatment of cardiovascular diseases. *Nutrients*, 9(6), 29.