



**Universidad de Valladolid**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL:**

**DESARROLLO DE INGREDIENTES NUTRACÉUTICOS  
MEDIANTE ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS A  
PARTIR DE TRIGO Y AVENA PARA REDUCIR EL  
ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN**

**Presentada por:**

Iván Jesús Jiménez Pulido  
para optar al grado de  
Doctor por la Universidad de Valladolid

**Dirigida por:**

Ana Belén Martín-Diana  
Daniel Rico Bargues  
Daniel Antonio de Luis Román



Esta tesis doctoral se ha realizado en el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL) con el apoyo financiero de la beca FPI (PRE2019-087824) de la Agencia Estatal de Investigación (AEI).

Agradecer a EMESA, S.A. (Valladolid) por el suministro de salvado de trigo y grano, y a la fábrica Sdad. Coop. Regional Ltda. Ribera del Duero (Burgos) por facilitar la cáscara y el grano de avena utilizados en este estudio. Así mismo, agradecer a Novozyme por proporcionar las enzimas utilizadas en el proceso de hidrólisis.



*“El conocimiento no tiene fronteras y  
el aprendizaje es un viaje sin fin.”*

*Isaac Asimov*

*“El éxito no es una casualidad,  
es el resultado de la dedicación  
y el esfuerzo constante.”*

*Bodo Schäfer*



*A mi padre,  
por apoyarme siempre.*

*A mi madre,  
allá donde estés.*



## PRESENTACIÓN



# PRESENTACIÓN

## TESIS DOCTORAL EN FORMATO DE COMPENDIO DE PUBLICACIONES.

Los siguientes artículos originales de investigación que se enumeran a continuación integran esta Tesis Doctoral con el título: **“DESARROLLO DE INGREDIENTES NUTRACÉUTICOS MEDIANTE ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS A PARTIR DE TRIGO Y AVENA PARA REDUCIR EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA INFLAMACIÓN”**.

1. **Jiménez-Pulido, I.J.**; Daniel, R.; Pérez, J.; Martínez-Villaluenga, C.; De Luis, D.; Martín Diana, A.B. Impact of protein content on the antioxidants, anti-inflammatory properties and glycemic index of wheat and wheat bran. *Foods* 2022, 11(14), 2049, doi: 10.3390/foods11142049.
2. **Jiménez-Pulido, I.J.**; Rico, D.; Martínez-Villaluenga, C.; Pérez-Jiménez, J.; Luis, D.D.; Martín-Diana, A.B. Sprouting and hydrolysis as biotechnological tools for development of nutraceutical ingredients from oat grain and hull. *Foods* 2022, 11(18), 2769, doi: 10.3390/foods11182769.
3. **Jiménez-Pulido, I.J.**; Rico, D.; De Luis, D.; Martín-Diana, A.B. Combined strategy using High Hydrostatic Pressure, temperature and enzymatic hydrolysis for development of fibre-rich ingredients from oat and wheat by-products. *Foods* 2024, 13, 378, doi:10.3390/foods13030378.
4. **Jiménez-Pulido, I.J.**; Martín-Diana, A.B.; Tomé-Sánchez, I.; de Luis, D.; Martínez-Villaluenga, C.; Rico, D. Boosting Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties Blending Cereal-Based Nutraceuticals Produced Using Sprouting and Hydrolysis Tools. *Foods* 2024, 13, 1868. doi: 10.3390/foods13121868

5. **Jiménez-Pulido, I. J.;** Martín-Diana, A. B.; de Luis, D.; Rico, D. Comparative bioaccessibility study of cereal-based nutraceutical ingredients using INFOGEST static, semi-dynamic and dynamic *in vitro* gastrointestinal digestion. (Artículo enviado para su publicación)

## AGRADECIMIENTOS



## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar este apartado expresando mi más sincera gratitud a todas las personas que, de una u otra manera, han sido parte de este proceso. Sin vuestro apoyo, consejos y compañía, este logro no habría sido posible. Cada uno de vosotros ha dejado una huella en este recorrido, y por ello estoy profundamente agradecido.

En primer lugar, quiero dar mi más sincero agradecimiento a Ana Belén Martín Diana y Daniel Rico Bargues, por vuestra incalculable guía y dedicación a lo largo de todo este proceso. Vuestros conocimientos, paciencia y disposición para orientarme en cada etapa han sido fundamentales para el desarrollo de esta tesis. Gracias por la confianza depositada en mí y por enseñarme no solo a ser un mejor investigador, sino también una mejor persona.

Del mismo modo, quiero agradecer a Daniel de Luis Román por su apoyo y orientación a lo largo de este proceso. Sus contribuciones resultaron valiosas para orientar mi investigación. Gracias por tu tiempo y tu conocimiento.

Muchas gracias a Jara Pérez Jiménez, por darme la oportunidad de realizar una estancia y poder trabajar juntos. Aprecio el apoyo, la confianza y todo lo aprendido que fue importante para el desarrollo de parte de mi trabajo. También quiero agradecer a Gustavo y Esther por hacer de mi estancia una etapa inolvidable.

No puedo olvidarme de Helena Moreno que, junto a Jara, fueron quienes despertaron en mí la curiosidad por la ciencia y la investigación, y, en cierto modo, son las responsables de que ahora me encuentre escribiendo estas líneas. Gracias por introducirme en este mundo de la investigación.

A mis compañeros del ITACyL, Ana, M<sup>a</sup> Jesús, Mary, Elena, Ángel, Lorena, Bea, Adriana. Gracias por todo el tiempo y los momentos compartidos. A Marina, gracias por ser una fuente de sustento y ánimo en esta última etapa.

A mis amigos de la universidad, Paloma, Esther, Adriana, Jaime, Patry, Nasrin, Cova, Belén. Gracias por todos estos años compartidos y por estar ahí en todo momento.

A quienes siempre han estado a mi lado, Andrea, Paty, Isabel, Bene, Ana, Sonia, Minda, María, Manu y Manu Jr., sin importar la distancia o el tiempo. Gracias por vuestra paciencia, por comprender cuando no podía estar presente, y por apoyarme a lo largo de este proceso. Este logro también es vuestro.

A Rubén, por aguantarme y apoyarme en los momentos más difíciles. Gracias por tu paciencia infinita, por acompañarme siempre y celebrar todos mis éxitos.

A mi familia, en especial a mi padre, quién ha sido mi mayor fortaleza en los momentos más difíciles. Gracias por su amor, por su apoyo incondicional, y por hacer de mí la persona que soy. No hay palabras suficientes para expresar lo agradecido y orgulloso que estoy por todo lo que has hecho por mí. Este logro es tan tuyo como mío.

## ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

ABTS: radical ABTS

AF: ácido ferúlico

APH: altas presiones hidrostáticas

CC: circunferencia de cintura

DM-2: diabetes mellitus tipo 2

ECV: enfermedades cardiovasculares

ERC: enfermedad renal crónica

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)

FeE: equivalentes de hierro reducido

FRAP: poder de reducción antioxidante del ión férrico

GAE: equivalentes de ácido gálico

HDL: lipoproteína de alta densidad

IL: interleucina

LDL: lipoproteína de baja densidad

MPa: megapascal

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

ONU: Organización de las Naciones Unidas

ORAC: capacidad de absorción de radicales de oxígeno

PA: presión arterial

PCR: proteína C reactiva

ROS: especies reactivas de oxígeno

SM: síndrome metabólico

TAG: triglicéridos

TE: equivalentes de Trolox

TNF: factor de necrosis tumoral



## LISTA DE FIGURAS



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.3.1.** Estructura del grano de los cereales.

**Figura 1.3.2.** Esquema del proceso de hidrólisis enzimática.

**Figura 1.3.3.** Esquema del proceso de germinación de una semilla.

**Figura 1.3.4.** Esquema de una máquina de APH.

**Figura 1.3.5.** Proceso de secado con aire caliente.

**Figura 1.3.6.** Proceso de atomización.

**Figura 1.3.7.** Esquema del proceso de liofilización.

**Figura 1.3.8.** Formatos de encapsulación. Fuente: Zabot et al., 2022.

**Figura 1.3.9.** Modelos de simuladores gastrointestinales.

**Figura 1.4.1.** Estructura del ácido ferúlico.

**Figura 1.4.2.** Estructura del  $\beta$ -glucano.

**Figura 1.5.1.** Componentes del síndrome metabólico.



## RESUMEN



## RESUMEN

En los últimos años, se ha observado un incremento en la preocupación por alimentación y la salud, existiendo una estrecha relación entre ambas dado que una dieta adecuada ayuda a prevenir enfermedades crónicas como diabetes tipo 2, obesidad y enfermedades cardiovasculares. A lo largo del tiempo, el concepto de "alimentación saludable" ha evolucionado, dando lugar a las dietas funcionales que, además de nutrir, ofrecen beneficios específicos como el fortalecimiento del sistema inmunológico y la mejora de la salud intestinal.

De este modo, los alimentos nutraceuticos han adquirido una gran relevancia por sus potenciales beneficios terapéuticos. Estos ofrecen concentraciones precisas de compuestos bioactivos, como antioxidantes y antiinflamatorios, lo que permite un mejor control de sus efectos sobre la salud. El desarrollo de estos alimentos está respaldado por investigaciones científicas, garantizando su calidad y eficacia.

Para la producción de los ingredientes nutraceuticos, se han desarrollado diferentes estrategias biotecnológicas a partir de materias primas sostenibles, como productos vegetales, algas y microorganismos. Entre estas estrategias destaca el uso de enzimas hidrolíticas, la germinación o las altas presiones hidrostáticas. Además, también resulta interesante el aprovechamiento de los subproductos, asegurando así un alto grado de sostenibilidad. Por ello, los subproductos generados en la industria molinera, como es el salvado de cereales como el trigo y la avena, son ricos en fibra y compuestos bioactivos, siendo fundamentales para la producción de ingredientes nutraceuticos.

Otro aspecto importante durante la producción de nutraceuticos es la estabilización, para asegurar que mantiene sus propiedades bioactivas en el tiempo. Así mismo, durante la formulación de estos ingredientes se han observado sinergias entre distintos

compuestos, indicando que resulta interesante la combinación de varios ingredientes para así potenciar los efectos beneficiosos y la eficacia de los compuestos.

Para evaluar la bioaccesibilidad de estos ingredientes, se emplean simuladores gastrointestinales, estáticos o dinámicos, que reproducen el proceso de digestión humana *in vitro*. Estos simuladores pueden ser estáticos o dinámicos.

Entre los compuestos bioactivos presentes en el salvado de trigo y avena, destacan los ácidos fenólicos, como el ácido ferúlico, y  $\beta$ -glucanos, los cuales poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Por ello, el desarrollo de ingredientes nutraceuticos ricos en estos compuestos resulta útil en la prevención de ciertas patologías como la diabetes o enfermedades cardiovasculares.

Los pacientes que padecen síndrome metabólico muestran un elevado nivel de estrés oxidativo e inflamación crónica, lo que contribuye al deterioro de su estado de salud general y al riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares. La incorporación de nutraceuticos en su dieta, como fuente de antioxidantes y compuestos antiinflamatorios naturales, podría desempeñar un papel fundamental en la reducción de los factores de riesgo, ayudando a mejorar su calidad de vida y a mitigar el impacto negativo del síndrome metabólico en su bienestar a largo plazo.

El objetivo principal de esta tesis doctoral consistió en desarrollar un ingrediente nutraceutico, a través del uso de salvados y granos integrales de trigo y avena, que contribuya a reducir el estrés oxidativo inflamación que cursan ciertas patologías asociadas al síndrome metabólico.

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral se ha realizado una caracterización de diferentes variedades de granos de trigo y avena y sus correspondientes salvados. Además, se han aplicado procesos hidrolíticos mediante el uso de enzimas

alimentarias en los salvados de trigo y avena y procesos germinativos en los granos de avena y trigo con el objetivo de obtener ingredientes nutraceuticos derivados de cereales/salvados con un alto contenido en ácido ferúlico libre y/u otros compuestos fenólicos con actividades antioxidantes, antiinflamatoria e inmunomoduladora. Posteriormente, se ha estudiado el efecto de la combinación de las altas presiones hidrostáticas (APH), la temperatura y la hidrólisis enzimática sobre las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Así mismo, se ha realizado la combinación y evaluación de la actividad biológica de los ingredientes nutraceuticos obtenidos. Finalmente, se han estudiado diferentes modelos de digestión empleando los ingredientes nutraceuticos obtenidos y sus combinaciones, evaluando la biodisponibilidad y la actividad biológica del ácido ferúlico, y otros compuestos mayoritarios.

Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral se presentan en los artículos que conforman esta tesis doctoral. En el primer y segundo artículo se realizó el screening de las diferentes variedades de trigo y avena, aplicando la hidrólisis enzimática a los salvados y la germinación de los granos. Los resultados mostraron que un mayor contenido en proteína de los granos de trigo se relaciona con una mayor capacidad antioxidante ( $ABTS^{\bullet+} = 1705,19 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  y  $ORAC = 3189,62 \mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ ) y un menor índice glucémico, tanto en granos (24,48) como en el salvado (21,64). También se observó una reducción en la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y un aumento en la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10). Del mismo modo, la germinación y la hidrólisis enzimática favorecieron la liberación de compuestos fenólicos totales en los granos y cascarilla de avena, alcanzando los 124,36 y 230,48 mg GAE 100 g<sup>-1</sup>, respectivamente. La capacidad antioxidante también se vio incrementada tras los procesos de germinación e hidrólisis enzimática, alcanzando valores de 2451,87  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  para los germinados y 6607,15  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  para los hidrolizados en el ensayo de  $ABTS^{\bullet+}$ , y los 4258,32

$\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  para los germinados y 6999,61  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  para los hidrolizados en el ensayo de ORAC. En relación a la capacidad antioxidante, la germinación y la hidrólisis enzimática aumentan la producción de citoquinas antiinflamatorias y reducen la producción de citoquinas proinflamatorias.

Por otro lado, en el tercer artículo se evaluó el efecto sinérgico de distintas estrategias biotecnológicas, combinando las APH a distintas temperaturas (40, 50, 60 y 70 °C) e hidrólisis enzimática, previa y posteriormente al tratamiento de APH. Los resultados mostraron que el incremento de la temperatura favorecía la liberación de compuestos fenólicos totales, alcanzando los 1395,27  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  en salvado de trigo y 930,45  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  en cascarilla de avena, destacando el aumento también del ácido ferúlico que alcanzó los 348,41 mg  $100 \text{ g}^{-1}$  en las muestras de salvado de trigo y 5,61 mg  $100 \text{ g}^{-1}$  en las muestras de cascarilla de avena. Del mismo modo, la capacidad antioxidante se vio incrementada con el aumento de temperatura, alcanzando valores para ORAC de 6689,13  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  en las muestras de salvado de trigo y 3135,63  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  en las muestras de cascarilla de avena, mientras que para el poder reductor (FRAP) alcanzaron los 2924,76 mmol FeE  $100 \text{ g}^{-1}$  para las muestras de salvado de trigo y 1640,47 mmol FeE  $100 \text{ g}^{-1}$  para las muestras de cascarilla de avena.

En el cuarto artículo, se llevó a cabo la combinación en distintas proporciones de los ingredientes nutraceuticos obtenidos. Los resultados obtenidos mostraron que la combinación de ingredientes permite obtener un ingrediente nutraceutico con un alto contenido en polifenoles y  $\beta$ -glucanos, responsables de la capacidad antioxidante y antiinflamatoria observada. El ingrediente obtenido a partir de dos partes de hidrolizado enzimático con una parte de germinado mostró una mayor capacidad antioxidante, 11.417,10  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  para ORAC y 4811,77 mmol FeE  $100 \text{ g}^{-1}$  para FRAP, y antiinflamatoria, reduciendo la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y de proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1).

Por último, en el quinto artículo se evaluó la bioaccesibilidad de los ingredientes nutraceuticos y sus combinaciones mediante tres modelos de digestión (estático, semi-dinámico y dinámico) siguiendo el mismo protocolo. Los resultados mostraron que la combinación de ingredientes mejora la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos y, de este modo, mejorando la capacidad antioxidante de los ingredientes obtenidos. El modelo dinámico destacó por presentar los mayores niveles de capacidad antioxidante, alcanzando los 1383,86  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  para compuestos fenólicos totales, 10.569,33  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  para ORAC y 2539,39  $\text{mmol FeE } 100 \text{ g}^{-1}$  para FRAP.

Las conclusiones más relevantes obtenidas a partir de los distintos artículos que componen esta tesis son las siguientes:

1. El salvado de trigo y la cascarilla de avena presentan un contenido significativamente mayor de compuestos fenólicos en comparación con el grano entero, lo que indica que se trata de una materia prima con un gran potencial para el desarrollo ingredientes nutraceuticos.
2. La germinación (6 días, 21 °C, >90% humedad) y la hidrólisis enzimática (20 h, 47 °C, 1% p/v enzima –UltraFloXL para trigo y Viscoferm para avena–) resultan procesos biotecnológicos efectivos para favorecer la bioaccesibilidad de compuestos activos mejorando las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los granos y salvados de trigo y avena.
3. La combinación del proceso de hidrólisis enzimática y el tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) a 60–70 °C aumenta significativamente el contenido en compuestos bioactivos, como son los compuestos fenólicos y los  $\beta$ -glucanos, en el salvado de trigo y la cáscara de avena. Así mismo, mejora la estabilidad y la vida útil de los ingredientes, facilitando su incorporación en productos nutraceuticos.

4. La combinación de ingredientes obtenidos a partir de trigo y avena potencia la capacidad antioxidante y modulan la respuesta inflamatoria, sugiriendo una posible sinergia entre estos compuestos en la formulación de ingredientes nutraceuticos.
5. El proceso de digestión *in vitro* siguiendo el modelo dinámico resulta una herramienta interesante para evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos procedentes de los ingredientes nutraceuticos, proporcionando una aproximación mucho más exacta que los sistemas estáticos tradicionalmente empleados en los estudios *in vivo*.
6. Ingredientes nutraceuticos combinados como el CI2, formado por dos partes de hidrolizado y una parte de germinado, tanto de trigo como de avena, presentan un potencial efecto para la prevención de procesos oxidativos e inflamación con especial interés en población con síndrome metabólico.

## ÍNDICE



# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. ALIMENTOS Y SALUD.....	1
1.2. NUTRACÉUTICOS: ALIMENTO O FÁRMACO .....	3
1.3. ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS .....	5
1.3.1. MATERIAS PRIMAS.....	5
1.3.2. CEREALES.....	6
1.3.3. ESTRATEGIAS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	9
1.3.3.1. Estrategias enzimáticas para la producción de nutraceuticos .....	9
1.3.3.2. Estrategias germinativas .....	11
1.3.3.3. Altas presiones hidrostáticas (APH).....	12
1.3.4. PROCESOS DE ESTABILIZACIÓN .....	13
1.3.4.1. Secado .....	14
1.3.4.2. Atomización o spray drying .....	14
1.3.4.3. Liofilización.....	15
1.3.4.4. Encapsulación .....	15
1.3.5. FORMULACIÓN DE INGREDIENTES MIXTOS.....	16
1.3.6. SIMULADORES GASTROINTESTINALES PARA EVALUAR LA BIOACCESIBILIDAD .....	17
<b>1.4. COMPUESTOS BIOACTIVOS.....</b>	<b>19</b>
1.4.1. ÁCIDO FERÚLICO .....	19
1.4.2. PROPIEDADES DEL ÁCIDO FERÚLICO .....	21
1.4.2.1. Antioxidante.....	21
1.4.2.2. Antiinflamatorio .....	22
1.4.3. $\beta$ -GLUCANO .....	22

1.4.4.	<i>PROPIEDADES DE LOS <math>\beta</math>-GLUCANOS</i> .....	23
1.4.4.1.	Immunomodulador .....	23
1.4.4.2.	Reduce el colesterol .....	24
1.4.4.3.	Efectos sobre la glucemia .....	24
1.4.4.4.	Propiedades prebióticas .....	24
1.5.	<b>ALEGACIONES</b> .....	24
1.5.1.	<i>ALEGACIONES NUTRICIONALES</i> .....	25
1.5.2.	<i>ALEGACIONES SALUDABLES</i> .....	25
1.6.	<b>SÍNDROME METABÓLICO</b> .....	27
1.6.1.	<i>DEFINICIÓN</i> .....	27
1.6.2.	<i>EPIDEMIOLOGÍA</i> .....	27
1.6.3.	<i>FACTORES DE RIESGO</i> .....	28
1.6.4.	<i>CRITERIOS DIAGNÓSTICOS</i> .....	29
1.6.5.	<i>COMPONENTES DEL SM</i> .....	30
2.	<b>HIPÓTESIS</b> .....	35
3.	<b>OBJETIVOS</b> .....	39
4.	<b>RESULTADOS</b> .....	43
4.1.	IMPACT OF PROTEIN CONTENT ON THE ANTIOXIDANTS, ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES AND GLYCEMIC INDEX OF WHEAT AND WHEAT BRAN .....	45
4.2.	SPROUTING AND HYDROLYSIS AS BIOTECHNOLOGICAL TOOLS FOR DEVELOPMENT OF NUTRACEUTICAL INGREDIENTS FROM OAT GRAIN AND HULL .....	47
4.3.	COMBINED STRATEGY USING HIGH HYDROSTATIC PRESSURE, TEMPERATURE AND ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR DEVELOPMENT OF FIBRE-RICH INGREDIENTS FROM OAT AND WHEAT BY-PRODUCTS .....	49

4.4.	BOOSTING SYNERGISTIC ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES BLENDING CEREAL-BASED NUTRACEUTICALS PRODUCED USING SPROUTING AND HYDROLYSIS TOOLS.....	51
4.5.	COMPARATIVE BIOACCESIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC <i>IN VITRO</i> GASTROINTESTINAL DIGESTION .....	53
5.	CONCLUSIONES .....	93
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	97
7.	ANEXOS.....	123
7.1.	PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS .....	123
7.2.	OTRAS PUBLICACIONES.....	123



## INTRODUCCIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. ALIMENTOS Y SALUD

La relación entre la alimentación y la salud es un aspecto importante para el bienestar humano. Los alimentos que consumimos tienen un impacto directo en el funcionamiento del organismo, influyendo en la prevención de enfermedades, la promoción de una vida saludable y la mejora de la calidad de vida. A medida que la comprensión científica sobre los efectos de los nutrientes ha avanzado, también lo ha hecho la demanda por productos alimenticios más saludables, sostenibles y funcionales.

Numerosos estudios han demostrado que los hábitos alimentarios desempeñan un papel crucial en la prevención de enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, la obesidad, las enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Neta et al., 2023; Nishi, 2022; Willett et al., 2019). Los nutrientes esenciales, como las vitaminas, minerales, proteínas y ácidos grasos, son vitales para el buen funcionamiento del sistema inmunológico, el metabolismo y otros procesos fisiológicos clave. En contraste, el consumo excesivo de grasas saturadas, azúcares refinados y alimentos ultraprocesados se ha asociado con un aumento de los riesgos para la salud (Monteiro et al., 2019).

El concepto de "alimentación saludable" ha evolucionado en las últimas décadas, pasando de un enfoque en la cantidad de calorías consumidas a la calidad de los alimentos ingeridos. Esto ha fomentado el desarrollo de las llamadas "dietas funcionales", que buscan no solo satisfacer las necesidades nutricionales básicas, sino también promover beneficios específicos para la salud, como el fortalecimiento del sistema inmunológico, la mejora de la salud intestinal y la prevención del envejecimiento celular (D. Martirosyan et al., 2021; D. M. Martirosyan & Singh, 2015).

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la tendencia del mercado alimentario ha experimentado un cambio profundo hacia la adopción de dietas más responsables y sostenibles. Los consumidores actuales están cada vez más informados sobre los efectos que los alimentos tienen en su salud, lo que ha generado una mayor demanda de productos naturales, orgánicos y ricos en nutrientes. Además, se observa un aumento en el interés por alimentos funcionales, que no solo nutran, sino que aporten beneficios adicionales para la salud (Bigliardi & Galati, 2013; Rico & Martín-Diana, 2023).

La búsqueda de ingredientes y alimentos novedosos ha tomado protagonismo en este contexto. Uno de los cambios más significativos es la creciente demanda de alimentos vegetales, asociado al interés por llevar una alimentación más saludable y sostenible, con un menor impacto ambiental y ético, en comparación con los productos de origen animal. Otro de los cambios reside en la incorporación de ingredientes que promueven la salud intestinal, como los probióticos y los prebióticos, que se ha convertido en una tendencia clave para la industria alimentaria (Bock et al., 2021; Rahman et al., 2024; Roberfroid, 2000).

Por otro lado, el enfoque en la sostenibilidad también ha impulsado la innovación en el desarrollo de alimentos. Los consumidores valoran cada vez más productos que sean respetuosos con el medio ambiente, como los alimentos de origen vegetal, las alternativas a la carne y los productos elaborados a partir de agricultura regenerativa (M. A. Clark et al., 2019; Walker et al., 2019). Estas tendencias reflejan un cambio en la mentalidad del consumidor hacia una alimentación que no solo sea saludable para el cuerpo, sino también para el planeta.

Este aumento de la demanda por alimentos más saludables ha estimulado la innovación en la industria alimentaria. Las empresas están invirtiendo en investigación y desarrollo para crear productos que no solo sean nutritivos, sino que

también se alineen con las preferencias de los consumidores en cuanto a sabor, conveniencia y sostenibilidad. Un área de innovación en auge es el desarrollo de alimentos funcionales que contengan compuestos bioactivos como los antioxidantes, los ácidos grasos omega-3 y los polifenoles, que pueden ofrecer efectos protectores frente a enfermedades crónicas. Estos productos están diseñados para responder a la demanda de los consumidores por alimentos que no solo proporcionen energía y nutrientes, sino que también mejoren el bienestar general y prevengan enfermedades (Granato et al., 2010; Sharma & Sarwat, 2022; Tsiaka et al., 2022).

### 1.2. NUTRACÉUTICOS: ALIMENTO O FÁRMACO

El término “nutracéutico” procede de la combinación de otros dos términos: “nutrición” y “farmacéutico” (Das et al., 2012; Santini et al., 2018), y se define como “un alimento o una parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o para la salud, incluida la prevención y el tratamiento de una enfermedad” (DeFelice, 1995). Con lo anterior, se puede decir que un nutracéutico es un producto derivado de un alimento que se presenta en una forma concentrada y se consume con el propósito de proporcionar beneficios terapéuticos o de salud. A diferencia de los alimentos funcionales, los cuales están enriquecidos con vitaminas, minerales o proteínas (Hasler, 2002), los nutraceúticos hace referencia a una sustancia obtenida mediante cultivo, producción o extracción, que al ser administrada a personas tiene la capacidad de mejorar su salud y bienestar (Borchers et al., 2016; Dillard & German, 2000).

Una de las principales ventajas que ofrecen los nutracéuticos en comparación con los alimentos funcionales es la concentración de sus ingredientes activos. Mientras que los alimentos funcionales pueden requerir el consumo de grandes cantidades para obtener un beneficio terapéutico, los nutracéuticos permiten la ingesta de dosis precisas y efectivas de compuestos bioactivos en un formato más manejable y eficiente (Varzakas et al., 2016). Esta capacidad de proporcionar dosis terapéuticas facilita su

## INTRODUCCIÓN

uso en la intervención de problemas de salud específicos, algo que no siempre es posible con los alimentos funcionales, que pueden no contener los ingredientes en las cantidades necesarias para ser efectivos.

Otra ventaja significativa de los nutraceuticos es su alto grado de estandarización y control de calidad (AlAli et al., 2021; Che Zain, 2024). A diferencia de los alimentos funcionales, los nutraceuticos están formulados para garantizar la consistencia en la potencia y eficacia de sus compuestos bioactivos. Esto es crucial cuando se buscan efectos terapéuticos específicos, ya que asegura que cada dosis administrada proporcione el resultado esperado. Además, el desarrollo de nutraceuticos está generalmente respaldado por investigaciones científicas y ensayos clínicos, lo que proporciona un mayor nivel de evidencia y confianza (Cesar et al., 2022; Galanakis, 2021; Tomé-Carneiro et al., 2012).

Finalmente, uno de los aspectos más innovadores y prometedores en el desarrollo de nutraceuticos es la combinación estratégica de diferentes ingredientes. Al combinar compuestos vegetales específicos, se pueden crear fórmulas con efectos sinérgicos, donde un ingrediente potencia la biodisponibilidad y eficacia de otro. Este enfoque no solo optimiza la efectividad del nutraceutico, sino que también permite personalizar las intervenciones de salud de manera más precisa, adaptándolas a las necesidades individuales de cada persona (Puri et al., 2022). La combinación de compuestos bioactivos abre la puerta a la creación de ingredientes nutraceuticos más eficaces y potentes, maximizando su potencial terapéutico y su capacidad para promover la salud y el bienestar.

### 1.3. ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

#### 1.3.1. MATERIAS PRIMAS

Como se ha visto anteriormente, la creciente demanda de productos nutraceuticos requiere la producción de alimentos más saludables y con ingredientes naturales, por tanto, es necesario una adecuada selección de materias primas. Estas materias pueden derivarse de fuentes vegetales, animales, minerales y microbianas, cada una con características únicas y desafíos en su producción sostenible.

Algunas de las materias primas que más se emplean encontramos:

- Productos vegetales, como son las hojas, raíces, semillas, flores y frutos. De ellos se pueden polifenoles, flavonoides, terpenos y alcaloides, los cuales poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Sharma & Sarwat, 2022).
- Algas y microalgas, destacan por su contenido en ácidos grasos omega-3, proteínas, vitaminas y minerales. Entre las algas más utilizadas destacan la espirulina y la chlorella, que son ricas en antioxidantes y nutrientes esenciales (Mishra et al., 2021; Niccolai et al., 2019).
- Derivados de animales marinos, como los ácidos grasos omega-3 y colágeno, procedente de pescados como el salmón o la caballa, son empleados por sus propiedades beneficiosas para la salud cardiovascular y la piel (Calder, 2017; Lin et al., 2024).
- Microorganismos vivos, empleados como probióticos. Algunas bacterias, como Lactobacillus y Bifidobacterium, cuando se ingieren en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud, especialmente en el sistema digestivo (Markowiak & Śliżewska, 2017).

## INTRODUCCIÓN

La sostenibilidad en la producción de materias primas se centra en minimizar el impacto ambiental, y en garantizar que las comunidades locales puedan beneficiarse de forma equitativa del uso de estos recursos (ODS 8: Trabajo decente y crecimiento económico). Esto incluye la implementación de prácticas agrícolas sostenibles, la protección de ecosistemas y el uso eficiente de los recursos.

En la producción de nutraceuticos de origen vegetal, es fundamental fomentar la biodiversidad, evitar la deforestación y promover el comercio justo, lo cual está alineado con el ODS 15 (Vida de ecosistemas terrestres) y el ODS 12 (Producción y consumo responsables). Además, la recolección de plantas silvestres debe realizarse de manera controlada para evitar la sobreexplotación y garantizar su regeneración natural.

Por otra parte, el desarrollo de alternativas biotecnológicas y el uso de fuentes renovables como algas y microorganismos son pasos importantes hacia la sostenibilidad, ya que estos recursos tienen una menor huella de carbono y pueden producirse con menos impacto ambiental, lo que contribuye al ODS 13 (Acción por el clima) (Organización de las Naciones Unidas (ONU), 2015).

### 1.3.2. CEREALES

Los cereales son uno de los grupos de alimentos más importantes en la dieta humana, siendo fuente primordial de energía, proteínas, vitaminas y minerales. Pertenecen a la familia de las gramíneas y se cultivan en casi todo el mundo debido a su adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas. Entre los cereales más consumidos se encuentran el trigo, el maíz, el arroz, la cebada y la avena (FAO, s. f.). Su relevancia radica tanto en su consumo directo como en su procesamiento industrial para la obtención de harinas y otros subproductos que son utilizados en la elaboración de diversos alimentos.

## ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

La producción de cereales ha aumentado significativamente en las últimas décadas debido a la creciente demanda de alimentos a nivel mundial. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), en 2022 se produjeron más de 3.000 millones de toneladas de cereales, siendo el trigo, el maíz, el arroz y la avena los más cultivados (FAO, s. f.). Estos cultivos no solo son esenciales para la alimentación humana, sino también para la alimentación animal y para la producción de biocombustibles.

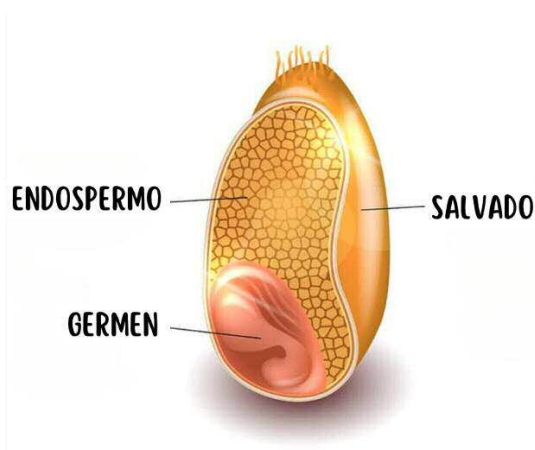
El trigo (*Triticum aestivum* L.) se considera un alimento básico en muchas culturas, siendo el segundo cereal más consumido en la cuenca mediterránea (Pandey et al., 2020). Su producción en 2022 alcanzó los 800 millones de toneladas a nivel global (FAO, s. f.). El trigo se cultiva en climas templados, y los principales productores incluyen países como China, India, Rusia y Estados Unidos.

La avena (*Avena sativa*) es otro cereal de gran relevancia, especialmente en regiones de clima frío. A diferencia del trigo, la avena se utiliza principalmente como alimento integral, ya sea en forma de copos, harina o como parte de productos alimenticios procesados. La producción mundial de avena ha sido más modesta que la del trigo, alcanzando alrededor de 26 millones de toneladas en 2022 (FAO, s. f.), siendo Rusia, Canadá y Finlandia los principales productores.

Habitualmente, estos cereales son procesados por la industria molinera, ya que su principal producto es la harina, utilizada en la producción de pan, pastas, copos, cereales de desayuno y otros productos horneados. Durante el proceso de molienda el endospermo es separado del salvado y del germen (Figura 1.3.1.), obteniéndose diferentes tipos de harinas según el grado de extracción, quedando el salvado como un residuo de esta industria. Este salvado o cascarilla supone aproximadamente el 15% del peso del grano de trigo (Rosa et al., 2013) y un 25-35% del grano de avena (Redaelli

## INTRODUCCIÓN

& Berardo, 2007), generándose grandes cantidades de estos residuos y cuyo destino principal es la alimentación animal.



**Figura 1.3.1.** Estructura del grano de los cereales.

Sin embargo, el salvado o cascarilla son una fuente rica en fibra dietética, principalmente hemicelulosa, celulosa y lignina. Además, contiene vitaminas del complejo B, vitamina E, minerales y compuestos bioactivos como los fenoles y flavonoides (Lebert et al., 2022). Además, el salvado de avena destaca por su contenido en  $\beta$ -glucanos, los cuales poseen efectos beneficiosos sobre la salud cardiovascular y la regulación de los niveles de colesterol (P. & Joye, 2020; Yu et al., 2022).

Estudios recientes han destacado el potencial del salvado de trigo como fuente de compuestos antioxidantes y antiinflamatorios. Los compuestos bioactivos presentes en el salvado, como los ácidos fenólicos, destacando el ácido ferúlico, han mostrado propiedades protectoras frente al estrés oxidativo y las enfermedades crónicas, como la diabetes y las enfermedades cardiovasculares (A. Reynolds et al., 2019; A. N. Reynolds et al., 2020).

Del mismo modo, el  $\beta$ -glucano procedente de la avena ha demostrado tener un efecto positivo en la reducción del colesterol LDL y en la modulación de la respuesta glucémica postprandial, lo que lo convierte en un ingrediente clave en dietas para la prevención de enfermedades cardiovasculares y el control de la diabetes tipo 2

## ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

(Mathews & Chu, 2024). Además de su contenido en  $\beta$ -glucanos, también es rico en compuestos fenólicos, como las avenantramidas, que poseen propiedades antioxidantes.

Esto hace que el salvado y la cascarilla de los cereales no solo sean un subproducto generado durante el proceso de molienda, sino que presenta un potencial uso como ingrediente funcional en la industria alimentaria y nutracéutica.

### 1.3.3. ESTRATEGIAS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS

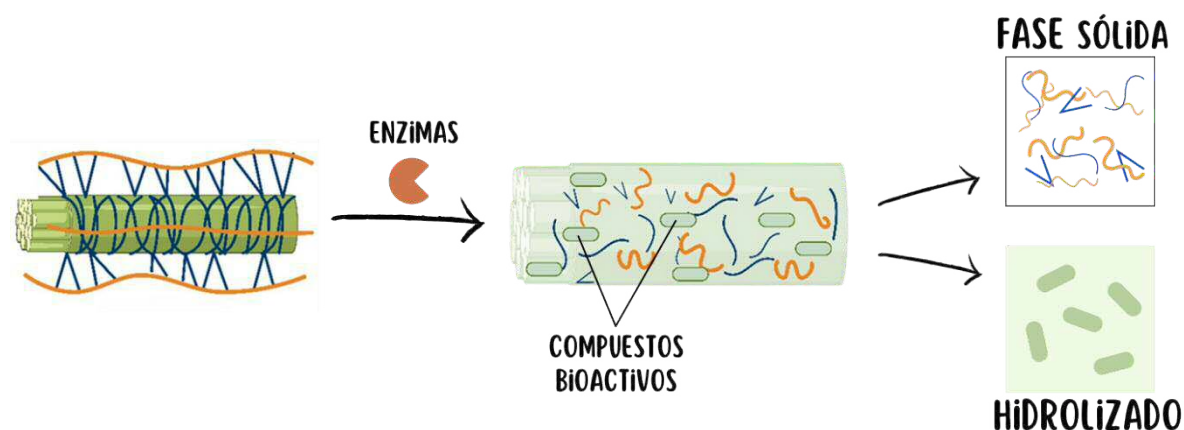
El salvado de los cereales, como se ha visto anteriormente, es rico en compuestos bioactivos con carácter antioxidante y antiinflamatorio. Sin embargo, estos compuestos se encuentran asociados a otras estructuras, como es la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, lo que dificulta su biodisponibilidad.

Por ello, resulta interesante la aplicación de métodos de extracción de los compuestos bioactivos que sean adecuados para el consumo humano. De este modo, el desarrollo de diferentes herramientas biotecnológicas ha permitido la liberación de los compuestos bioactivos y aumentar de ese modo la biodisponibilidad de dichos compuestos. Entre estas herramientas, nos encontramos estrategias enzimáticas, la germinación y las altas presiones hidrostáticas.

#### 1.3.3.1. *Estrategias enzimáticas para la producción de nutracéuticos*

El proceso de hidrólisis enzimática consiste en la aplicación de enzimas celulolíticas y xilanolíticas (Figura 1.3.2.), el cual ha cobrado relevancia debido a su capacidad para mejorar significativamente la biodisponibilidad y extractabilidad de compuestos bioactivos, especialmente los compuestos fenólicos, que suelen estar estrechamente asociados a las fibras alimentarias (Ribas-Agustí et al., 2018). Como se ha visto anteriormente, los compuestos fenólicos presentan propiedades

antioxidantes, antiinflamatorias y cardioprotectoras, entre otros beneficios para la salud humana. Sin embargo, su potencial terapéutico y nutricional está limitado por la dificultad para liberarlos de las fibras a las que se encuentran ligados (Radenkovs et al., 2021).



**Figura 1.3.2.** Esquema del proceso de hidrólisis enzimática.

En este contexto, las enzimas celulolíticas y xilanolíticas juegan un papel crucial. Estas enzimas son capaces de despolimerizar los enlaces  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucosídicos y  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-xilósidos presentes en la estructura de los polisacáridos que conforman la pared celular vegetal. Al romper estos enlaces, las enzimas facilitan la liberación de los compuestos fenólicos, aumentando su solubilidad y, por ende, su biodisponibilidad. Esto significa que una mayor cantidad de estos compuestos estarán disponibles para ser absorbidos por el organismo, potenciando así sus efectos beneficiosos (Bautista-Expósito et al., 2020; Martín-Diana et al., 2021).

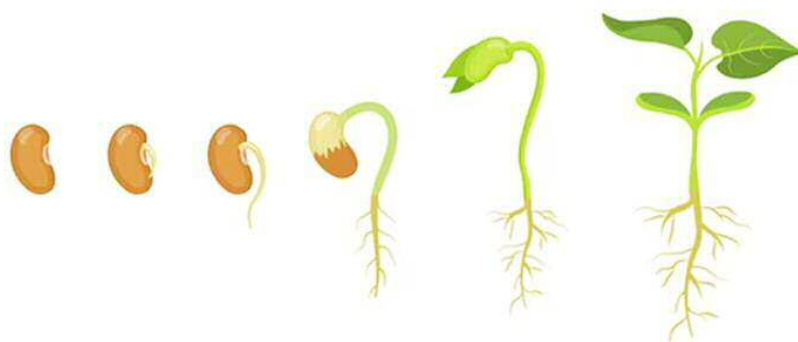
Además, la hidrólisis enzimática se ha destacado por ser un método selectivo y eficiente. A diferencia de otros métodos de extracción que pueden requerir condiciones extremas, como altas temperaturas o el uso de solventes químicos agresivos, la hidrólisis enzimática puede realizarse bajo condiciones moderadas de temperatura y pH, lo que minimiza la degradación de los compuestos sensibles y reduce el impacto ambiental. Esta característica convierte a la hidrólisis enzimática en

una opción más sostenible y respetuosa con el medio ambiente, en línea con la creciente demanda de procesos industriales más ecológicos (Radenkovs et al., 2018).

La aplicación práctica de esta tecnología se ha explorado en diversos estudios que han enfocado sus esfuerzos en el tratamiento del salvado de cereales, como el salvado de trigo, un subproducto rico en fibra y compuestos fenólicos (Bautista-Expósito et al., 2020; Ferri et al., 2020). Los resultados de estos estudios han demostrado que la hidrólisis enzimática no solo mejora la extracción de los compuestos fenólicos, sino que también aumenta la disponibilidad de otros componentes bioactivos, como el  $\beta$ -glucano, un polisacárido que presenta efectos beneficiosos para la salud cardiovascular y el sistema inmunológico (Tomé-Sánchez et al., 2023).

### 1.3.3.2. Estrategias germinativas

La germinación es un proceso biotecnológico que ha ganado importancia en los últimos años debido a su capacidad para mejorar de manera natural el perfil nutricional y bioactivo de los granos de cereales. Este proceso, que consiste en la activación controlada de la semilla bajo condiciones específicas de humedad y temperatura (Figura 1.3.3.), desencadena una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos en el grano que resultan en beneficios significativos para la salud (Tomé-Sánchez et al., 2020).



**Figura 1.3.3.** Esquema del proceso de germinación de una semilla.

## INTRODUCCIÓN

Durante la germinación, las enzimas endógenas de los granos se activan, iniciando la descomposición de macromoléculas complejas como almidones, proteínas y lípidos en compuestos más simples y fácilmente digestibles (Olaerts & Courtin, 2018). Este proceso aumenta la digestibilidad de los nutrientes, lo que favorece la absorción más eficiente por el organismo. Por ejemplo, las proteínas se hidrolizan en aminoácidos libres, que son más fácilmente asimilables, mientras que los carbohidratos complejos se transforman en azúcares simples, mejorando la disponibilidad energética del grano.

Además de mejorar la digestibilidad y la biodisponibilidad de nutrientes, la germinación también aumenta la concentración de compuestos bioactivos, como los antioxidantes, que son esenciales para combatir el estrés oxidativo en el cuerpo (Aparicio-García et al., 2021; Baranzelli et al., 2023; Nguyen et al., 2023). Este incremento en la bioactividad de los granos es particularmente beneficioso, ya que estos compuestos tienen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y cardioprotectoras, entre otros efectos positivos para la salud.

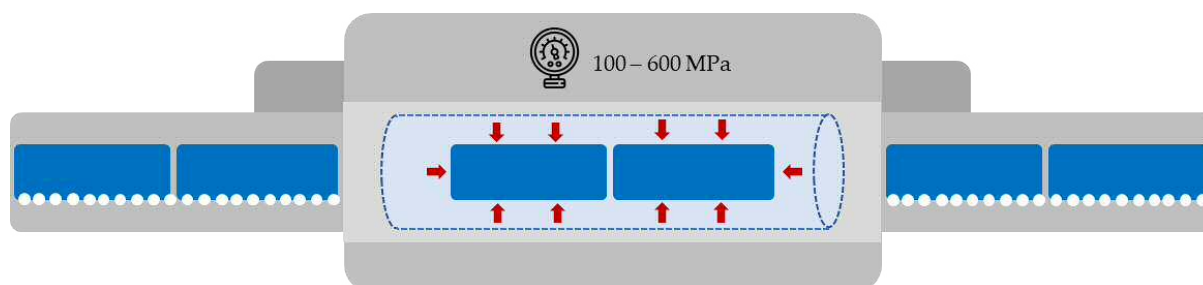
Otro aspecto importante de la germinación es la reducción de compuestos antinutricionales, como los fitatos, que pueden inhibir la absorción de minerales esenciales como el hierro y el zinc (Dias-Martins et al., 2024; Elliott et al., 2022). Al reducir estos compuestos, la germinación mejora la biodisponibilidad de estos micronutrientes, contribuyendo a una mejor nutrición general.

### **1.3.3.      *Altas presiones hidrostáticas (APH)***

Las altas presiones hidrostáticas (APH) se tratan de una tecnología innovadora en la industria alimentaria que se basa en la aplicación de una presión extremadamente alta, que oscila entre 100 y 600 MPa, sobre los productos alimentarios. Esta presión se transmite a través de un líquido, generalmente agua, dentro de una cámara cerrada.

## ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

Durante este proceso, el producto experimenta una reducción de volumen que modula las reacciones químicas internas (Balasubramaniam et al., 2015).



**Figura 1.3.4.** Esquema de una máquina de AHP.

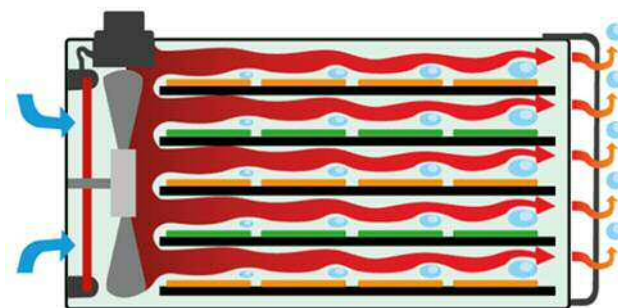
Uno de los efectos clave de las AHP es su capacidad para dañar las membranas celulares y alterar la conformación de las proteínas, lo que lleva a la inactivación parcial o total de ciertas enzimas (L. Liu et al., 2022). Tradicionalmente, las AHP se ha utilizado para la conservación de alimentos, pero en los últimos años ha ganado atención como una técnica eficaz para mejorar la extracción de compuestos bioactivos, como los compuestos fenólicos y micronutrientes, de diversas matrices alimentarias (Albertos et al., 2016; Gutiérrez et al., 2022; Nawawi et al., 2023). En cuanto a la estabilidad de los compuestos fenólicos bajo la influencia de las AHP, estudios han demostrado que estos compuestos son bastante resistentes a la degradación, debido a que la alta presión es capaz de inactivar las enzimas responsables de la oxidación enzimática, como la polifenoloxidasas y la peroxidasa, encargadas de la oxidación y la degradación de los compuestos fenólicos (Koo et al., 2023; Silva & Sulaiman, 2022), mejorando de este modo su extracción y su biodisponibilidad.

### 1.3.4. PROCESOS DE ESTABILIZACIÓN

Una vez se han obtenido los ingredientes nutraceuticos, es fundamental su estabilización para evitar su degradación durante el posterior procesado y almacenado. Para ello, se emplean diversas técnicas de estabilización, como el secado, la atomización o spray drying, la liofilización y la encapsulación.

### 1.3.4.1. *Secado*

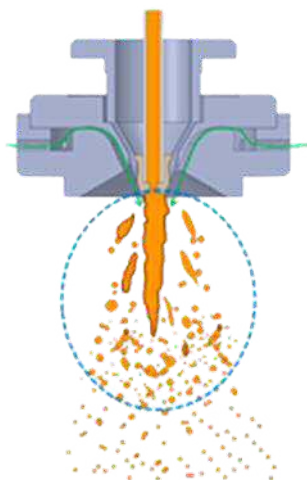
El secado consiste en la eliminación de la mayor parte del contenido de agua mediante la aplicación de calor, ya sea directo o utilizando aire caliente (Figura 1.3.5.), lo que inhibe la proliferación microbiana y las reacciones químicas responsables de la degradación. Sin embargo, el secado puede causar una pérdida significativa de compuestos volátiles y nutrientes sensibles al calor, como las vitaminas o los polifenoles.



**Figura 1.3.5.** Proceso de secado con aire caliente.

### 1.3.4.2. *Atomización o spray drying*

La atomización o el spray drying permite transformar un líquido en un polvo fino mediante la atomización del líquido en gotas y el posterior secado de estas mediante el contacto con una corriente de aire caliente (Figura 1.3.6.). Es un proceso rápido y eficiente que permite la obtención de productos en polvo con una larga vida útil y buena estabilidad. Es especialmente adecuado para la encapsulación de aceites, extractos de plantas y otros líquidos ricos en compuestos bioactivos (Lu et al., 2021; Tontul & Topuz, 2017).



**Figura 1.3.6.** Proceso de atomización.

#### **1.3.4.3. Liofilización**

La liofilización consiste en la congelación de un producto seguida de la eliminación del agua mediante sublimación, aplicando vacío durante el proceso (Figura 1.3.7.). De esta forma, al no aplicar calor directo al producto, se conserva la estructura y actividad de compuestos bioactivos sensibles al calor y a la humedad, como son los probióticos, compuestos antioxidantes y vitaminas (Ma et al., 2023).



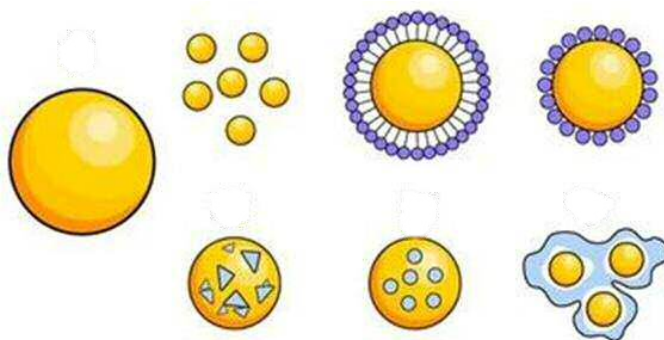
**Figura 1.3.7.** Esquema del proceso de liofilización.

#### **1.3.4.4. Encapsulación**

La encapsulación es un proceso en el que se incorpora el producto en una matriz o cápsula de polímeros, como las ciclodextrinas, o materiales naturales, como proteínas, polisacáridos y lípidos, que los aísla del ambiente (Figura 1.3.8.). Además,

## INTRODUCCIÓN

se puede mejorar la solubilidad y la estabilidad de los compuestos bioactivos. Las técnicas de encapsulación pueden combinarse con otros procesos, como la atomización o la liofilización (Reque & Brandelli, 2021; Saha et al., 2023). Una ventaja de la encapsulación es la posibilidad de dirigir la liberación controlada de los ingredientes nutraceuticos en determinadas partes del tracto digestivo, optimizando su absorción y eficacia en el organismo.



**Figura 1.3.8.** Formatos de encapsulación. Fuente: Zabot et al., 2022.

### 1.3.5. FORMULACIÓN DE INGREDIENTES MIXTOS

De forma tradicional, la mayoría de los nutraceuticos que se desarrollan se elaboran a partir de un único ingrediente. Existen numerosos estudios en los que se demuestra el efecto de un determinado ingrediente sobre ciertas patologías, como por ejemplo el uso de fitoesteroles para la reducción del colesterol (Abuajah et al., 2015). Sin embargo, la combinación de varios ingredientes puede dar lugar a fórmulas con efectos sinérgicos, lo cual puede tener un impacto mayor que si se usan por separado. Este enfoque no solo puede incrementar la funcionalidad de los alimentos, sino también mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de los ingredientes.

Un desafío en el desarrollo de alimentos nutraceuticos es la baja biodisponibilidad de algunos compuestos bioactivos, siendo la combinación de ingredientes una opción útil para mejorar la absorción y la estabilidad de estos compuestos. Algunos compuestos de origen vegetal pueden potenciar la biodisponibilidad de otros, facilitando su absorción y aprovechamiento en el

## ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS NUTRACÉUTICOS

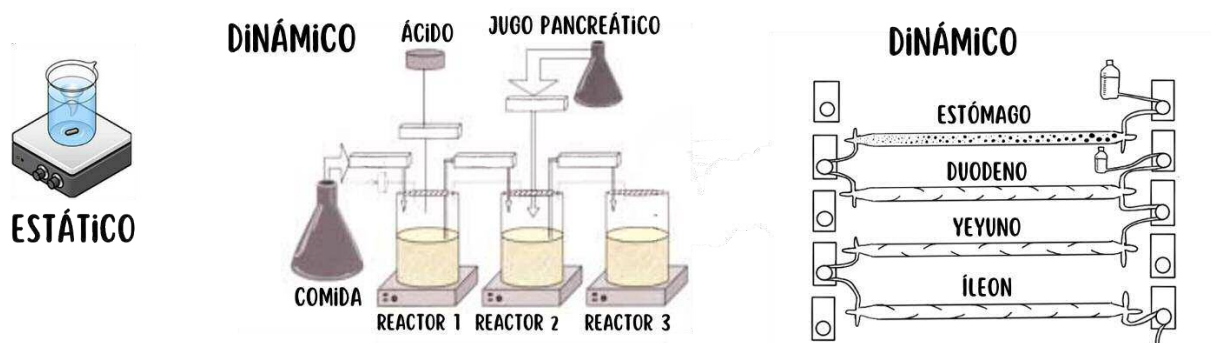
organismo. Por lo tanto, una combinación adecuada de nutraceuticos de origen vegetal puede maximizar tanto su absorción como su efectividad (Di Lorenzo et al., 2021).

### 1.3.6. SIMULADORES GASTROINTESTINALES PARA EVALUAR LA BIOACCESIBILIDAD

Uno de los aspectos que se ha de tener en cuenta a la hora de desarrollar nuevos alimentos nutraceuticos es la determinación de su bioaccesibilidad. Y es que el éxito de un nutraceutico no solo depende de su contenido nutricional y potencial bioactivo, sino también de su bioaccesibilidad, es decir, la fracción de un compuesto que está disponible para ser absorbida en el tracto gastrointestinal tras la digestión. En este contexto, los simuladores gastrointestinales resultan ser una herramienta fundamental para evaluar la bioaccesibilidad de los alimentos nutraceuticos en condiciones controladas y reproducibles (Martín-Diana & Rico, 2023).

Los simuladores gastrointestinales son modelos experimentales que permiten reproducir *in vitro* el proceso de digestión humana, desde la saliva en la boca hasta el paso por el estómago y el intestino delgado. Estos simuladores están diseñados para imitar los cambios de pH, la acción enzimática y las condiciones fisiológicas a lo largo del tracto gastrointestinal. Los sistemas más avanzados incluyen el simulador gastrointestinal dinámico (TIM) (Minekus, 2015) y otros modelos estáticos, como el INFOGEST (Brodkorb et al., 2019), que simulan de forma simplificada el proceso digestivo (Figura 1.3.9.).

Los modelos estáticos son sistemas que intentan imitar las condiciones del tracto gastrointestinal mediante el uso de soluciones químicas y enzimáticas en diferentes fases, simulando las etapas gástrica, intestinal y, en algunos casos, oral. Las variables como el pH, las concentraciones de enzimas y los tiempos de digestión son ajustadas manualmente en función de los parámetros fisiológicos conocidos.



**Figura 1.3.9.** Modelos de simuladores gastrointestinales.

Los modelos estáticos son relativamente simples y económicos de implementar. Son ampliamente utilizados para evaluar la bioaccesibilidad de micronutrientes y otros componentes bioactivos en los alimentos, siendo útiles en estudios preliminares o comparativos. Sin embargo, una de las principales limitaciones es que no reflejan completamente la complejidad dinámica del tracto gastrointestinal, dado que no reproducen fenómenos como el vaciado gástrico variable, el peristaltismo o la variación en la secreción de enzimas y bilis durante la digestión.

Los modelos dinámicos son simuladores más avanzados que intentan replicar las condiciones gastrointestinales de una manera más realista y precisa. Estos modelos incluyen sistemas mecánicos y computarizados que imitan el movimiento peristáltico, el vaciado gástrico y la liberación continua de enzimas y jugos gástricos e intestinales, lo que permite una digestión *in vitro* más cercana a la fisiología humana.

Los modelos dinámicos son particularmente útiles para evaluar la liberación controlada de nutrientes, el comportamiento de los alimentos funcionales y nutraceuticos, y la absorción de fármacos. A pesar de ello, estos modelos son costosos de construir y operar. Además, el tiempo requerido para realizar los experimentos es considerablemente mayor que en los modelos estáticos, y tienen en cuenta la variación interindividual en la respuesta digestiva o la interacción con sistemas fisiológicos como el sistema inmunológico.

Cabe destacar que los simuladores gastrointestinales *in vitro* ofrecen ciertas ventajas, como pueden ser:

- **Control de variables**, permitiendo controlar parámetros clave como el pH, la temperatura, la concentración enzimática y el tiempo de residencia en cada fase del tracto digestivo, lo que mejora la reproducibilidad de los experimentos.
- **Reducción de la variabilidad biológica**, que a diferencia de los estudios *in vivo*, los simuladores *in vitro* eliminan la variabilidad individual derivada de diferencias fisiológicas entre sujetos humanos o animales.
- **Facilidad de uso y bajo coste**, dado que son más accesibles y económicos que los estudios *in vivo*, lo que facilita su uso en las primeras etapas de investigación y desarrollo de productos nutracéuticos.

### 1.4. COMPUESTOS BIOACTIVOS

Durante los últimos años, se han desarrollado numerosas investigaciones en las que se ha demostrado como diferentes compuestos bioactivos, como son los ácidos fenólicos y los  $\beta$ -glucanos, poseen capacidades antioxidantes y juegan un papel crucial en la prevención y el tratamiento de una variedad de enfermedades crónicas, incluyendo algunos tipos de cáncer (Abotaleb et al., 2020), diabetes (Aryal et al., 2024), enfermedades cardiovasculares (ECV) (Lutz et al., 2019) e inflamatorias (Roche et al., 2017). Estos compuestos, que se encuentran de manera abundante en recursos naturales como verduras, frutas y cereales, los cuales han demostrado tener un impacto significativo en la mejora de este tipo de enfermedades (Ajiboye et al., 2019).

#### 1.4.1. ÁCIDO FERÚLICO

Estudios recientes han mostrado que ciertos ácidos fenólicos, como el ácido ferúlico, el ácido cafeico y el ácido gálico, tienen efectos protectores notables sobre el síndrome metabólico inducido por dietas altas en fructosa (Ibitoye & Ajiboye, 2018),

## INTRODUCCIÓN

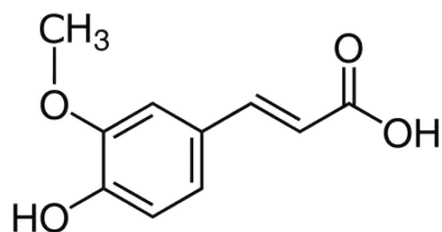
un componente común en muchas dietas modernas que se ha relacionado con el desarrollo de este síndrome.

En el tratamiento de la diabetes, los ácidos fenólicos desempeñan un papel esencial al actuar a través de múltiples mecanismos. Por ejemplo, se ha demostrado que mejoran la funcionalidad de las células  $\beta$ -pancreáticas, que son responsables de la producción de insulina, hormona esencial para la regulación de los niveles de glucosa en sangre. Además, estos compuestos estimulan la secreción de insulina, lo que ayuda a mantener un control glucémico adecuado y mejora la captación de glucosa en los tejidos periféricos, como el músculo esquelético, donde la glucosa es utilizada como fuente de energía (Malik et al., 2023).

Además de estos efectos, los ácidos fenólicos también poseen propiedades antiinflamatorias (Calabriso et al., 2020), que son de gran importancia en la prevención de la inflamación crónica asociada con enfermedades crónicas. Esta inflamación crónica es un factor clave en la progresión de la resistencia a la insulina y la aterosclerosis, por lo que la capacidad de los ácidos fenólicos para mitigar estos procesos inflamatorios agrega un valor terapéutico significativo.

Uno de los ácidos fenólicos ampliamente estudiados es el ácido ferúlico (AF), el cual está formado por un núcleo de ácido cinámico con un grupo metoxilo y un grupo hidroxilo (Figura 1.4.1.). El AF se encuentra de forma natural en los tejidos vegetales de dos formas, libre y conjugado, siendo el total de AF la suma de ambas formas. El AF está presente en una amplia variedad de frutas, como las ciruelas, los frutos rojos o el pomelo; verduras, como las espinacas, el brócoli o las berenjenas; y cereales, como el trigo, la avena o el maíz (Zhao & Moghadasian, 2008). Sin embargo, el AF muestra una mayor concentración en el salvado de los cereales y la piel de las frutas y verduras (Zhao & Moghadasian, 2010; Zhu & Sang, 2017), donde se encuentra

unido a otros ácidos fenólicos o a las estructuras de la celulosa, la hemicelulosa y la lignina, reduciendo así su biodisponibilidad (Radenkovs et al., 2021).



**Figura 1.4.1.** Estructura del ácido ferúlico.

### 1.4.2. PROPIEDADES DEL ÁCIDO FERÚLICO

#### 1.4.2.1. *Antioxidante*

El cuerpo humano es vulnerable al ataque de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden desencadenar diversas enfermedades, como la aterosclerosis, las ECV, el cáncer o la diabetes, entre otras (Halliwell, 2024).

Hay múltiples factores internos y externos que provocan la formación de radicales libres. Los radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxilo ( $\bullet OH$ ) se generan a partir de procesos internos de las células y están relacionados con varias enfermedades. Los factores externos, como la radiación ultravioleta y los contaminantes del aire, también pueden desencadenar la producción de radicales libres. Dado que estas especies se generan continuamente en el organismo, es crucial contar con un sistema de defensa que pueda prevenir los daños provocados por el exceso de radicales libres. Por esta razón, aunque el cuerpo posee sistemas antioxidantes internos, la ingesta de antioxidantes puede fortalecer estos mecanismos. En los últimos años, se han realizado diversos estudios para investigar y comprender las propiedades bioactivas y los posibles beneficios de los hidroxiácidos libres y conjugados, especialmente del AF (Ou & Kwok, 2004).

## INTRODUCCIÓN

El AF ha demostrado ser muy efectivo en la inhibición de los radicales peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), superóxido e hidroxilo. Se ha observado que, con una concentración de 250 mg/L es capaz de reducir en un 92,5% la cantidad de radicales hidroxilo. Además de tener la capacidad de neutralizar los radicales libres, el AF también potencia la actividad de las enzimas responsables de inhibirlos, debido a que es capaz de inhibir a las enzimas que catalizan su producción, como la superóxido dismutasa (Ou & Kwok, 2004).

### 1.4.2.2. *Antiinflamatorio*

La inflamación es la respuesta defensiva del cuerpo humano cuando se expone a estímulos externos, como daños en los tejidos, infecciones o agentes tóxicos. Sin embargo, una inflamación crónica está relacionada con ciertas patologías como las ECV, la diabetes o el cáncer (Yeung et al., 2018).

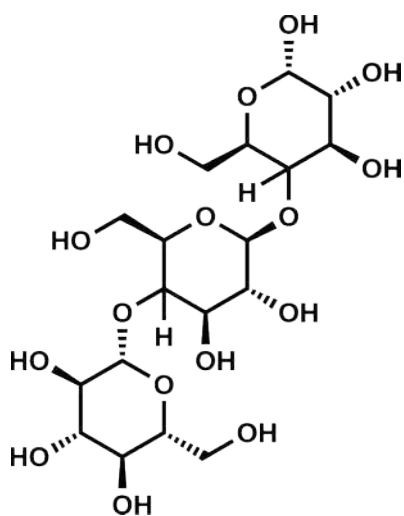
Durante el proceso de inflamación, se generan un gran número de citoquinas como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (Y. Liu et al., 2022), que actúan como mediadores en la activación de las cascadas de enzimas encargadas del proceso inflamatorio y de la regulación de la respuesta inmune (Zhai et al., 2023). El AF ha demostrado presentar actividad antiinflamatoria mediante la inhibición de ciertas enzimas, como el inflammasoma NLRP3, y la reducción de la expresión de citoquinas, como como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , lo que pone de relieve su potencial como compuesto antiinflamatorio (Y. Liu et al., 2022).

### 1.4.3. $\beta$ -GLUCANO

El  $\beta$ -glucano es un polímero de glucosa compuesto por unidades de D-glucosa, unidas mediante enlaces glucosídicos  $\beta$  (Figura 1.4.2.). La estructura del  $\beta$ -glucano varía en función de su origen, y esta diferencia estructural influye en sus propiedades biológicas. Los  $\beta$ -glucanos extraídos de levaduras y hongos tienen enlaces  $\beta$ -(1,3) y  $\beta$ -

(1,6), mientras que los obtenidos de cereales como la avena y la cebada presentan enlaces  $\beta$ -(1,3) y  $\beta$ -(1,4) (Schmidt, 2022). La organización de los enlaces  $\beta$  determina las propiedades físicas y biológicas del  $\beta$ -glucano.

El  $\beta$ -glucano se encuentra en diversas fuentes naturales destacando los cereales, como la avena y la cebada; hongos y levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*; o algas y bacterias (Lante et al., 2023).



**Figura 1.4.2.** Estructura del  $\beta$ -glucano.

## 1.4.4. PROPIEDADES DE LOS $\beta$ -GLUCANOS

### 1.4.4.1. *Inmunomodulador*

Los  $\beta$ -glucanos han demostrado ser potentes inmunomoduladores. Aquellos obtenidos de hongos y levaduras son capaces de estimular los receptores de las células inmunitarias, como los macrófagos y los neutrófilos, mediante su unión a receptores como Dectin-1 y CR3. Esto promueve la fagocitosis y la producción de citoquinas, activando así la respuesta inmune innata y mejorando la capacidad del cuerpo para combatir infecciones (Nakashima et al., 2018).

### **1.4.4.2. *Reduce el colesterol***

Numerosos estudios han demostrado que los  $\beta$ -glucanos de cereales, como los presentes en la avena y la cebada, tienen efectos hipocolesterolemiantes. Los  $\beta$ -glucanos forman una matriz viscosa en el intestino, lo que reduce la absorción de colesterol y ácidos biliares, promoviendo su excreción. Esto resulta en una disminución significativa de los niveles de colesterol total y LDL en el plasma (Sima et al., 2018). Esto da lugar a la posibilidad de incluir alegaciones saludables en los alimentos que contengan  $\beta$ -glucanos procedentes de la avena.

### **1.4.4.3. *Efectos sobre la glucemia***

El consumo de  $\beta$ -glucanos ha sido asociado con una mejora en el control glucémico. Al retrasar la absorción de carbohidratos en el intestino, el  $\beta$ -glucano ayuda a reducir los picos postprandiales de glucosa en sangre, lo que lo convierte en un complemento útil para las personas con diabetes tipo 2 o aquellos que buscan mejorar la respuesta glucémica (Shen et al., 2016; Tiwari & Cummins, 2011). Este hecho, también da lugar a la posibilidad de incluir alegaciones saludables en los alimentos que contengan  $\beta$ -glucanos procedentes de la avena.

### **1.4.4.4. *Propiedades prebióticas***

Como fibra soluble, el  $\beta$ -glucano también tiene efectos prebióticos, favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas en el intestino. Al ser fermentado por la microbiota intestinal, produce ácidos grasos de cadena corta, que tienen efectos positivos en la salud intestinal, incluyendo la mejora de la barrera intestinal y la regulación del sistema inmune (Shoukat & Sorrentino, 2021).

## **1.5. ALEGACIONES**

Las alegaciones de alimentos son declaraciones utilizadas en el etiquetado y promoción de productos alimenticios que informan a los consumidores sobre las propiedades específicas de un alimento en relación con su contenido nutricional o su

impacto en la salud. Estas alegaciones pueden ser de dos tipos principales: alegaciones nutricionales y alegaciones saludables.

### 1.5.1. ALEGACIONES NUTRICIONALES

Las alegaciones nutricionales se refieren a la cantidad de un nutriente o componente en un alimento. Según el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, una alegación nutricional se define como cualquier mensaje que indique, sugiera o implique que un alimento posee propiedades nutricionales beneficiosas particulares, debido a la energía, los nutrientes u otras sustancias que contiene, por un aumento o disminución de estos. Pueden señalar, por ejemplo, si un producto tiene un bajo contenido de grasa, es rico en fibra o es una buena fuente de vitaminas y minerales.

### 1.5.2. ALEGACIONES SALUDABLES

Las alegaciones saludables son aquellas que vinculan un alimento o uno de sus componentes con un efecto específico en la salud, como la prevención de enfermedades o la mejora de alguna función corporal. Estas declaraciones son más complejas, ya que deben estar respaldadas por pruebas científicas que avalen la relación entre el consumo del alimento y el beneficio para la salud que se alega.

Para que una alegación sea aceptada, las autoridades competentes requieren que se presenten estudios científicos sólidos que demuestren la relación entre el alimento y el beneficio alegado. En la Unión Europea, las alegaciones saludables están reguladas por el Reglamento (CE) N° 1924/2006, el cual establece que todas las declaraciones de salud deben ser aprobadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) tras una rigurosa evaluación científica.

Las alegaciones saludables pueden subdividirse en dos categorías principales:

## INTRODUCCIÓN

- **Alegaciones de función en el organismo.** Estas alegaciones hacen referencia a los efectos que un nutriente o sustancia tiene en el crecimiento, desarrollo, y funciones normales del cuerpo, por ejemplo: “el calcio es necesario para el mantenimiento de los huesos en condiciones normales”.
- **Alegaciones de reducción de riesgo de enfermedad.** Estas alegaciones indican que el consumo de un alimento o componente alimentario puede reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad, por ejemplo: “el consumo de esteroides vegetales contribuye a la reducción de los niveles de colesterol en sangre”, lo que implica una posible reducción en el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

Los  $\beta$ -glucanos, según el Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños, poseen las siguientes alegaciones saludables:

- *“Los betaglucanos contribuyen a mantener niveles normales de colesterol sanguíneo”.* Esta declaración puede utilizarse únicamente respecto a alimentos que contengan, como mínimo, 1 g de betaglucanos procedentes de avena, salvado de avena, cebada o salvado de cebada, o bien de mezclas de estos betaglucanos por porción cuantificada. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 3 g de betaglucanos procedentes de avena, salvado de avena, cebada o salvado de cebada, o bien de mezclas de estos betaglucanos.
- *“El consumo de betaglucanos procedentes de avena o cebada en una comida contribuye a reducir la subida de glucosa en sangre después de comer”.* Esta declaración solo puede utilizarse respecto a alimentos que contienen un mínimo de 4 g de betaglucanos procedentes de avena o cebada por cada 30 g de hidratos de

carbono presentes en una porción cuantificada como parte de la comida. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene tomando betaglucanos procedentes de avena o cebada como parte de la comida.

### 1.6. SÍNDROME METABÓLICO

#### 1.6.1. DEFINICIÓN

El síndrome metabólico (SM) hace referencia a un conjunto de factores de riesgo, como son la obesidad abdominal, la hipertensión arterial, la resistencia a la insulina, un estado proinflamatorio, la dislipidemia y un estado protrombótico, los cuales pueden dar lugar a otras enfermedades relacionadas con el metabolismo, como pueden ser las enfermedades cardiovasculares (ECV) o la diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) (K. G. M. M. Alberti et al., 2006; Grundy et al., 2004).

#### 1.6.2. EPIDEMIOLOGÍA

El SM afecta en torno al 25% de la población mundial, aumentando su prevalencia debido al consumo de alimentos más calóricos y la adopción de estilos de vida sedentarios. La presencia de SM aumenta significativamente el riesgo de padecer estas enfermedades crónicas asociadas a los factores incluidos en su definición, como pueden ser el infarto de miocardio, el accidente cerebrovascular, la insuficiencia cardíaca, la enfermedad renal, nefropatías, retinopatías, entre otros (Ardern & Janssen, 2007; Madan et al., 2023). Sin embargo, aunque el SM en sí mismo no es una causa directa de muerte, las enfermedades asociadas a él, como las ECV, la DM-2 y la enfermedad renal crónica (ERC), suponen un impacto considerable en la mortalidad a nivel global. Las ECV son una de las principales causas de muerte a nivel mundial, alcanzando los 9,18 millones de muertes en mujeres y 10,2 millones de muertes en hombres (IHME, 2022a). La mortalidad relacionada con la DM-2 alcanzó los 1,61

millones de muertes en 2021 (IHME, 2022c), mientras que la ERC alcanzó los 1,58 millones de muertes en 2021 (IHME, 2022b).

En España, el estudio di@bet.es mostró que el 25,7% de los sujetos desarrollaron SM durante el seguimiento, mientras que el 20,1% de los sujetos con SM, previo al estudio, presentaron regresión. Estos datos trasladados a la población española indica que cada día se diagnostiquen alrededor de 257 pacientes con SM. Los autores de este estudio determinaron que los factores que aumentan la probabilidad de desarrollar SM son el sobrepeso o la obesidad, mientras que una adherencia a la dieta mediterránea y la actividad física reducen la probabilidad de desarrollar SM (Cuesta et al., 2020).

### 1.6.3. FACTORES DE RIESGO

Existen diversos factores de riesgo que favorecen el desarrollo de SM, que de forma individual no suponen un impacto significativo, pero en su combinación permiten el desarrollo de SM.

- *Factores genéticos.* A pesar de no haber probado la existencia de genes directamente responsables del desarrollo del SM, cada uno de los factores de riesgo tienen una componente de base genética, que de forma individual no tienen un impacto limitado y en muchas ocasiones necesitan la presencia de estrés ambiental para que se desencadene la enfermedad (K. C. Clark & Kwitek, 2021).
- *Estilo de vida.* Una dieta poco saludable con un alto consumo de calorías, grasas saturadas y carbohidratos, junto con el sedentarismo suponen un alto factor de riesgo para el SM (Aron-Wisnewsky & Clément, 2016; Grundy, 2016; Mohamed et al., 2023). Del mismo modo, el tabaquismo y el consumo de alcohol contribuyen a la aparición de SM (Freiberg et al., 2004; Geslain-Biquez et al., 2003).

- **Otros factores.** Personas que tienen un sueño inadecuado, sufren periodos de estrés o tienen antecedentes familiares son más propensas al desarrollo de SM (Mohamed et al., 2023).

### 1.6.4. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

Los criterios diagnósticos presentan variaciones según el tipo de sociedad científica que emita los criterios, destacando:

- **Adult Treatment Panel III (ATP-III)**, 2001 (Expert Panel On Detection, Evaluation, And Treatment Of High Blood Cholesterol In Adults, 2001). Los pacientes han de cumplir como mínimo tres de los siguientes criterios:
  - Triglicéridos (TAG) séricos  $\geq 150$  mg/dL.
  - Glucosa en ayunas  $> 100$  mg/dL.
  - Presión arterial (PA)  $\geq 130/85$  mm Hg
  - Circunferencia de cintura (CC)  $> 88$  cm en mujeres y  $> 102$  cm en hombres.
  - Colesterol HDL  $< 50$  mg/dL en mujeres y  $< 40$  mg/dL en hombres.
- **International Diabetes Federation (IDF)**, 2005 (K. G. M. Alberti et al., 2005). Las pacientes deben mostrar una CC  $\geq 80$  cm para mujeres y  $\geq 94$  cm para hombres de raza caucásica (siendo diferentes para otras razas) y mínimo dos de los siguientes criterios:
  - TAG  $> 150$  mg/dL.
  - Glucosa en ayunas  $\geq 100$  mg/dL.
  - PA  $\geq 130/85$  mm Hg.
  - Colesterol HDL  $< 50$  mg/dL en mujeres y  $< 40$  mg/dL en hombres.
- **American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute (AHA/NHLBI)**, 2009 (K. G. M. M. Alberti et al., 2009). Los pacientes han de mostrar la presencia de tres de los siguientes criterios como mínimo:
  - CC superior al valor establecido para cada raza.

## INTRODUCCIÓN

- TAG  $\geq$  150 mg/dL o en tratamiento farmacológico.
- Glucosa en ayunas  $\geq$  100 mg/dL o en tratamiento farmacológico.
- PA  $\geq$  130/85 mm Hg o en tratamiento farmacológico.
- Colesterol HDL  $<$  50 mg/dL en mujeres y  $<$  40 mg/dL en hombres o en tratamiento farmacológico.

### 1.6.5. COMPONENTES DEL SM

Los componentes del SM (Figura 1.5.1.) han sido descritos por diversos autores (K. G. M. Alberti et al., 2005; K. G. M. M. Alberti et al., 2009), destacando los siguientes:

- **Obesidad abdominal.** La obesidad abdominal juega un papel crucial en el desarrollo del SM, ya que está fuertemente asociada con un incremento en la acumulación de grasa visceral, la cual es más activa metabólicamente en comparación con la grasa subcutánea. Esta acumulación central de grasa promueve un ambiente proinflamatorio y disfunción en la liberación de adipocinas, lo que contribuye al deterioro de la sensibilidad a la insulina. Además, el exceso de grasa visceral libera ácidos grasos libres en el torrente sanguíneo, afectando negativamente a la función del hígado y los músculos al interferir con la señalización de la insulina, además de promover otros componentes del SM, como la hiperglucemia y la dislipidemia (Després et al., 2008).
- **Hipertensión.** La hipertensión es un reconocido factor de riesgo cardiovascular por sí misma y su presencia es común en personas con SM. Se asocia estrechamente con la obesidad, especialmente la obesidad abdominal, y es frecuente en individuos que presentan resistencia a la insulina, lo que ha llevado a considerarla un factor de riesgo metabólico importante. Aunque algunos expertos sugieren que la hipertensión tiene un componente metabólico menos evidente en comparación con otros elementos del SM, su inclusión como

## SÍNDROME METABÓLICO

parte de este síndrome se justifica por su alta prevalencia y su impacto significativo en el riesgo cardiovascular global (Natali & Ferrannini, 2004).

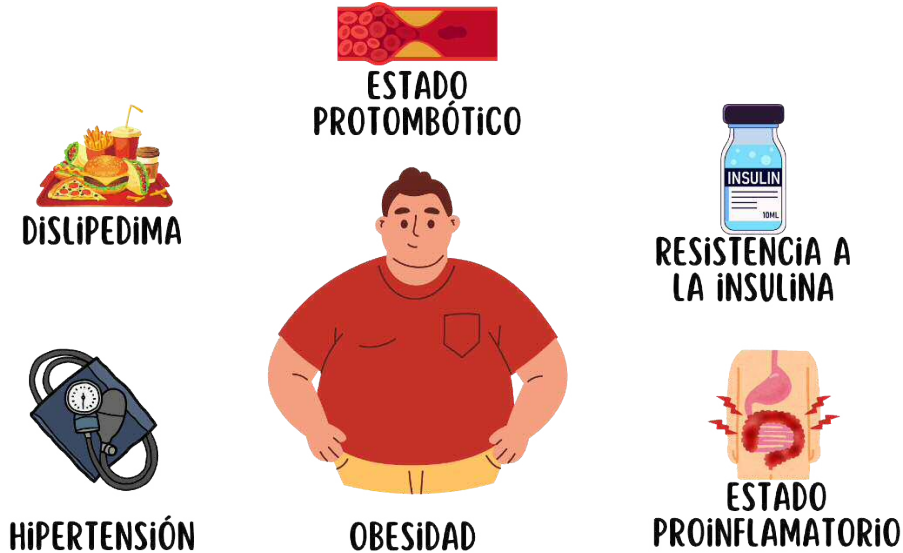


Figura 1.6.1. Componentes del síndrome metabólico.

- **Resistencia a la insulina.** La resistencia a la insulina se ha propuesto como un componente clave en la fisiopatología del síndrome metabólico, caracterizándose por una respuesta deficiente de los tejidos periféricos a la acción de la insulina, lo que lleva a la hiperinsulinemia compensatoria para mantener los niveles de glucosa dentro de un rango normal. Esta resistencia es común en la mayoría de los individuos con SM y se encuentra estrechamente relacionada con varios de sus componentes, como la dislipidemia y la obesidad abdominal, aunque su vínculo con la hipertensión es menos sólido. La resistencia a la insulina no solo precede a la aparición de diabetes tipo 2, sino que también es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, contribuyendo a la progresión de la aterosclerosis y otros eventos cardiovasculares adversos (Natali & Ferrannini, 2004).
- **Dislipidemia.** La dislipidemia asociada al SM es uno de los factores más vinculados tanto con la resistencia a la insulina como con el riesgo cardiovascular elevado. Se manifiesta por un perfil lipídico característico que

incluye un aumento en los niveles séricos de triglicéridos, una reducción en las concentraciones de colesterol HDL, y un predominio de partículas LDL, las cuales son particularmente aterogénicas. Además, se observa un incremento en las lipoproteínas remanentes, aumentando los niveles de Apo B y disminuyendo los niveles de Apo AI. Estas alteraciones lipídicas no solo reflejan una disfunción en el metabolismo lipídico, sino que también juegan un papel central en el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis, aumentando significativamente el riesgo de eventos cardiovasculares (Pearson et al., 2003).

- ***Estado protrombótico.*** Los principales defectos protrombóticos identificados en individuos con SM se ven relacionados con la elevación de los niveles de fibrinógeno y del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1). Este estado protrombótico puede contribuir al riesgo cardiovascular de diversas maneras, como en la promoción y progresión de la aterosclerosis o el deterioro de la placa de ateroma. Aunque estas alteraciones están claramente asociadas con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares, aún no se ha establecido un consenso sobre la utilidad de incluir estas mediciones de manera rutinaria en la práctica clínica (Cornier et al., 2008).
- ***Estado proinflamatorio.*** Diversos estudios han demostrado una relación entre el SM con el aumento de los niveles de proteína C reactiva (PCR). El tejido adiposo en exceso, especialmente la grasa visceral, libera citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  e IL-6, que desencadenan una respuesta inflamatoria, lo que lleva a una elevación de las concentraciones de PCR. Algunas guías clínicas sugieren la medición de la PCR junto con el perfil lipídico en pacientes con riesgo moderado de ECV, aunque actualmente sigue siendo motivo de debate su inclusión como un criterio adicional para el diagnóstico del SM (Paoletti et al., 2006; Pearson et al., 2003).

## HIPÓTESIS



## 2. HIPÓTESIS

El estrés oxidativo y la inflamación son dos de las patologías presentes en pacientes que padecen síndrome metabólico, los cuales muestran un elevado nivel de estrés oxidativo e inflamación crónica, lo que contribuye al deterioro de su estado de salud general y al riesgo de desarrollar enfermedades crónicas, como diabetes mellitus tipo 2 o enfermedades cardiovasculares.

El consumo de ingredientes nutraceuticos por parte de esta población directo o introducido en un alimento, como fuente de antioxidantes y compuestos antiinflamatorios, podría desempeñar un papel fundamental en la reducción de los factores de riesgo, ayudando a mejorar su calidad de vida y a mitigar el impacto negativo del síndrome metabólico en su bienestar a largo plazo.

El trigo y la avena y sus subproductos salvado y cascarilla respectivamente pueden ser empleados como materia prima para la obtención de ingredientes nutraceuticos que permitan mejorar la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos.

Por tanto, la hipótesis de trabajo de esta tesis y que da lugar al objetivo principal fue que los granos de trigo y avena, así como sus subproductos procedentes de la molienda (salvados y cascarillas) pueden ser empleados para la producción de ingredientes nutraceutico con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.



## OBJETIVOS



### 3. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral ha sido el de desarrollar un ingrediente nutracéutico, a través del uso de salvados y granos integrales de trigo y avena, que contribuya a la reducción de los procesos oxidativos e inflamatorios.

Para el logro del objetivo principal, se establecen los siguientes objetivos secundarios:

- 1) Caracterizar diferentes variedades de granos de trigo y avena y sus correspondientes salvados con el objetivo de seleccionar aquellas variedades con mejores propiedades bioactivas y nutricionales.
- 2) Desarrollar y optimizar procesos hidrolíticos en salvados de trigo y avena y procesos germinativos en granos de avena y trigo que permitan obtener ingredientes nutracéuticos derivados de cereales/salvados con un alto contenido en ácido ferúlico libre y/u otros compuestos fenólicos con actividades antioxidantes, antiinflamatoria e inmunomoduladora.
- 3) Estudiar el efecto de la combinación de las altas presiones hidrostáticas (APH), la temperatura junto con hidrólisis enzimática sobre las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.
- 4) Formular ingredientes mixtos a partir de los ingredientes desarrollados con el objetivo de potenciar las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias del ingrediente final.
- 5) Evaluar la bioaccesibilidad y la actividad biológica in vitro mediante la aplicación de procesos de simulación gastrointestinal utilizando sistemas estáticos, semi-dinámicos y continuos.



## RESULTADOS



## 4. RESULTADOS

En este apartado se recogen las reproducciones exactas de los artículos científicos que forman parte de esta Tesis Doctoral:

1. **Jiménez-Pulido, I.J.**; Daniel, R.; Pérez, J.; Martínez-Villaluenga, C.; De Luis, D.; Martín Diana, A.B. Impact of protein content on the antioxidants, anti-inflammatory properties and glycemic index of wheat and wheat bran. *Foods* 2022, 11(14), 2049, doi: 10.3390/foods11142049.
2. **Jiménez-Pulido, I.J.**; Rico, D.; Martínez-Villaluenga, C.; Pérez-Jiménez, J.; Luis, D.D.; Martín-Diana, A.B. Sprouting and hydrolysis as biotechnological tools for development of nutraceutical ingredients from oat grain and hull. *Foods* 2022, 11(18), 2769, doi: 10.3390/foods11182769.
3. **Jiménez-Pulido, I.J.**; Rico, D.; De Luis, D.; Martín-Diana, A.B. Combined strategy using High Hydrostatic Pressure, temperature and enzymatic hydrolysis for development of fibre-rich ingredients from oat and wheat by-products. *Foods* 2024, 13, 378, doi:10.3390/foods13030378.
4. **Jiménez-Pulido, I.J.**; Martín-Diana, A.B.; Tomé-Sánchez, I.; de Luis, D.; Martínez-Villaluenga, C.; Rico, D. Boosting Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties Blending Cereal-Based Nutraceuticals Produced Using Sprouting and Hydrolysis Tools. *Foods* 2024, 13, 1868. doi: 10.3390/foods13121868
5. **Jiménez-Pulido, I. J.**; Martín-Diana, A. B.; de Luis, D.; Rico, D. Comparative bioaccessibility study of cereal-based nutraceutical ingredients using INFOGEST static, semi-dynamic and dynamic *in vitro* gastrointestinal digestion. (Artículo enviado para su publicación)



#### 4.1. IMPACT OF PROTEIN CONTENT ON THE ANTIOXIDANTS, ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES AND GLYCEMIC INDEX OF WHEAT AND WHEAT BRAN

Jiménez-Pulido, I.J.; Daniel, R.; Pérez, J.; Martínez-Villaluenga, C.; De Luis, D.; Martín Diana, A.B. Impact of protein content on the antioxidants, anti-inflammatory properties and glycemic index of wheat and wheat bran. *Foods* 2022, 11(14), 2049, doi: 10.3390/foods11142049.

##### **Abstract**

Conventional wheat milling generates important volumes of wheat bran (WB), which is a concentrated source of polyphenols and insoluble fiber. In terms of health benefits and based on epidemiological and experimental evidence, these compounds contribute to reducing the risk of certain chronic pathologies. Protein concentration is the main quality factor conditioning wheat use in the agroindustry. When turning waste into feasible resources, it is essential to evaluate the variability of the raw material. The aim of this study was the evaluation of the impact of protein content in the valorization of WB based on its antioxidants, anti-inflammatory properties and glycemic index (GI). A significantly ( $p \leq 0.05$ ) lower content of phenolic compounds was found in the whole grain (WG) fractions, both free (FP) and bound (BP), as compared to the WB phenolic fractions, differences that ranged from 4- to 6-fold (538 to 561 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> in WG vs. 1027 to 1236 in WB mg GAE 100 g<sup>-1</sup> in FP and 2245 to 2378 vs. 6344 to 7232 mg GAE 100 g<sup>-1</sup> in BP). A significant ( $p \leq 0.05$ ) effect of the protein content on the resulting phenolic content and antioxidant capacity was observed, especially in WG, but also in WB, although in the latter a significant ( $p \leq 0.05$ ) negative correlation was observed, and increasing the protein content resulted in decreasing total phenolic content, antioxidants, and ferric-reducing capacities, probably due to their different types of proteins. The highest protein content in WB produced a

## RESULTADOS

significant ( $p \leq 0.05$ ) reduction in GI value, probably due to the role of protein structure in protecting starch from gelatinization, along with phytic acid, which may bind to proteins closely associated to starch and chelate calcium ions, required for  $\alpha$ -amylase activity. A significant ( $p \leq 0.05$ ) effect of the protein content on the GI was also found, which may be explained by the structural effect of the proteins associated with starch, reducing the GI (21.64). The results obtained show the importance of segregation of WB in valorization strategies in order to increase the efficiency of the processes.

**Keywords:** valorization; wheat bran; antioxidant activity; glycemic index; anti-inflammatory activity

doi: 10.3390/foods11142049

## 4.2. SPROUTING AND HYDROLYSIS AS BIOTECHNOLOGICAL TOOLS FOR DEVELOPMENT OF NUTRACEUTICAL INGREDIENTS FROM OAT GRAIN AND HULL

Jiménez-Pulido, I.J.; Rico, D.; Martínez-Villaluenga, C.; Pérez-Jiménez, J.; Luis, D.D.; Martín-Diana, A.B. Sprouting and hydrolysis as biotechnological tools for development of nutraceutical ingredients from oat grain and hull. *Foods* 2022, 11(18), 2769, doi: 10.3390/foods11182769.

### Abstract

Oat consumption has increased during the last decade because of the health benefits associated with its soluble dietary fiber ( $\beta$ -glucan), functional proteins, lipids, and the presence of specific phytochemicals, such as avenanthramides. Oat is consumed mainly as whole grain, and the hull (seed coat), comprising 25–35% of the entire grain, is removed, generating a large amount of waste/by-product from the milling industry. The objective of this study was to evaluate the use of biotechnological strategies, such as sprouting for oat grain (OG) and hydrolysis for oat hull (OH), to enhance antioxidant and anti-inflammatory properties and lower the glycemic index (GI). Sprouting produced significant ( $p \leq 0.05$ ) increases in free (32.10 to 76.62 mg GAE (100 g)<sup>-1</sup>) and bound phenols (60.45 to 124.36 mg GAE (100 g)<sup>-1</sup>), increasing significantly ( $p \leq 0.05$ ) the avenanthramide (2c, 2p and 2f) soluble phenolic alkaloid content and anti-inflammatory properties of OG. On the other hand, the hydrolysis of OH using Viscoferm (EH2-OH) and Ultraflo XL (EH21-OH) increased by 4.5 and 5-fold the release of bound phenols, respectively; meanwhile, the use of Viscoferm increased the 4.55-fold soluble  $\beta$ -glucan content in OH, reaching values close to those of OG (4.04 vs. 4.46 g (100 g)<sup>-1</sup>). The study shows the potential of both strategies to enhance the nutritional and bioactive properties of OG and OH and describes these processes as feasible for the industry to obtain an ingredient with high antioxidant and anti-

## RESULTADOS

inflammatory activities. Single or combined biotechnological tools can be used on oat grains and hulls to provide nutraceutical ingredients.

**Keywords:** oat; grain; hull; hydrolysis; antioxidant; glycemic index; anti-inflammatory

doi: 10.3390/foods11182769

### 4.3. COMBINED STRATEGY USING HIGH HYDROSTATIC PRESSURE, TEMPERATURE AND ENZYMATIC HYDROLYSIS FOR DEVELOPMENT OF FIBRE-RICH INGREDIENTS FROM OAT AND WHEAT BY-PRODUCTS

Jiménez-Pulido, I.J.; Rico, D.; De Luis, D.; Martín-Diana, A.B. Combined strategy using High Hydrostatic Pressure, temperature and enzymatic hydrolysis for development of fibre-rich ingredients from oat and wheat by-products. *Foods* 2024, 13, 378, doi: 10.3390/foods13030378.

#### **Abstract**

Wheat bran (WB) and oat hull (OH) are two interesting undervalued cereal processing sources rich in total dietary fibre (TDF) and other associated bioactive compounds, such as  $\beta$ -glucans and polyphenols. The aim of this study was to optimise a combination chemical (enzymes) and physical (high hydrostatic pressure-temperature) strategies to increase the bioaccessibility of bioactive compounds naturally bound to the bran and hull outer layers. WB and OH were hydrolysed using food-grade enzymes (UltraFloXL and Viscoferm, for WB and OH, respectively) in combination with HPP at different temperatures (40, 50, 60 and 70 °C) and hydrolysis either before or after HPP. Proximal composition, phytic acid,  $\beta$ -glucans, total phenolics (TPs) and total antioxidant activity (TAC) were evaluated to select the processing conditions for optimal nutritional and bioactive properties of the final ingredients. The application of the hydrolysis step after the HPP treatment resulted in lower phytic acid levels in both matrices (WB and OH). On the other hand, the release of  $\beta$ -glucan was more effective at the highest temperature (70 °C) used during pressurisation. After the treatment, the TP content ranged from 756.47 to 1395.27  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  in WB, and OH showed values from 566.91 to 930.45  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ . An interaction effect between the temperature and hydrolysis timing (applied before

## RESULTADOS

or after HPP) was observed in the case of OH. Hydrolysis applied before HPP was more efficient in releasing OH TPs at lower HPP temperatures (40–50 °C); meanwhile, at higher HPP temperatures (60–70 °C), hydrolysis yielded higher TP values when applied after HPP. This effect was not observed in WB, where the hydrolysis was more effective before HPP. The TP results were significantly correlated with the TAC values. The results showed that the application of optimal process conditions (hydrolysis before HPP at 60 or 70 °C for WB; hydrolysis after HPP at 70 °C for OH) can increase the biological value of the final ingredients obtained.

**Keywords:** high pressure thermal (HPP); ultraFloXL; viscoferm; oat; wheat; bran; fibre hull; antioxidant;  $\beta$ -glucans; phytic acid

doi: 10.3390/foods13030378

#### 4.4. BOOSTING SYNERGISTIC ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES BLENDING CEREAL-BASED NUTRACEUTICALS PRODUCED USING SPROUTING AND HYDROLYSIS TOOLS

Jiménez-Pulido, I.J.; Martín-Diana, A.B.; Tomé-Sánchez, I.; de Luis, D.; Martínez-Villaluenga, C.; Rico, D. Boosting Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties Blending Cereal-Based Nutraceuticals Produced Using Sprouting and Hydrolysis Tools. *Foods* 2024, 13, 1868. doi: 10.3390/foods13121868.

##### **Abstract**

Nutraceuticals obtained from sprouted wheat and oat grains and processing by-products (bran and hull, respectively) naturally containing antioxidant and anti-inflammatory compounds were evaluated. The objective of this study was the development of a cereal-based nutraceutical formula combining extracts from sprouts and by-products and the exploration for potential synergetic effects in their bioactive properties. The antioxidant and anti-inflammatory capacities, glycemic index, phytic acid, and  $\beta$ -glucan of individual wheat bran hydrolysate (EH-WB), sprouted wheat (SW), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted oat (SO), and combined ingredients (CI 1, CI 2, and CI3) were used to tailor an optimal nutraceutical formula. The three blend ingredients (CI 1, CI2, and CI3) were formulated at different ratios (EH-WB:SW:EH-OH:SO; 1:1:1:1, 2:1:2:1, and 1:2:1:2,  $w:w:w:w$ , respectively). The resulting mixtures showed total phenol (TPs) content ranging from 412.93 to 2556.66  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  and antioxidant capacity values from 808.14 to 22,152.54  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  (ORAC) and 1914.05 to 7261.32  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  (ABTS $^{\bullet+}$ ), with  $\text{Fe}^{3+}$  reducing ability from 734.02 to 8674.51  $\text{mmol reduced Fe } 100 \text{ g}^{-1}$  (FRAP) for the individual ingredients produced from EH-WB and EH-OH, where high antioxidant activity was observed. However, the anti-inflammatory results exhibited an interesting behavior, with a potentially synergistic

## RESULTADOS

effect of the individual ingredients. This effect was observed in CI2 and CI3, resulting in a higher ability to inhibit IL-6 and TNF- $\alpha$  than expected based on the anti-inflammatory values of their individual ingredients. Similar to the antioxidant properties, oat-based ingredients significantly contributed more to the anti-inflammatory properties of the overall mixture. This contribution is likely associated with the  $\beta$ -glucans and avenanthramides present in oats. To ensure the bioaccessibility of these ingredients, further studies including simulated digestion protocols would be necessary. The ingredient formulated with a 2:1 hydrolysate-to-sprout ratio was the most effective combination, reaching higher biological characteristics.

**Keywords:** antioxidant; anti-inflammatory; oat; wheat; hydrolysis; sprouting;  $\beta$ -glucans; phytic acid

doi: 10.3390/foods13121868

#### 4.5. COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC *IN VITRO* GASTROINTESTINAL DIGESTION

Jiménez-Pulido, I. J.; Martín-Diana, A. B.; de Luis, D.; Rico, D. Comparative bioaccessibility study of cereal-based nutraceutical ingredients using INFOGEST static, semi-dynamic and dynamic *in vitro* gastrointestinal digestion. (Artículo enviado para su publicación)

##### **Abstract**

Efficient development of effective functional foods and nutraceuticals requires adequate estimation methods of the bioaccessibility of their bioactive compounds. Specially grain-based nutraceuticals and functional ingredients are often enriched in bound/low bioavailable bioactive phytochemicals. The objective of this work was to evaluate the differences in applying static or dynamic digestion models for the estimation of bioaccessibility of antioxidants present in cereal grain-based /fibre-rich ingredients produced using enzymatic hydrolysis and sprouting processes. Main phenolic compounds liberated, antioxidant activity (ABTS<sup>•+</sup> and ORAC) and ferric reducing capacity were evaluated in the samples after three digestion protocols with differences based on their dynamism: static, semi-dynamic and dynamic. The samples digested with the dynamic method showed higher antioxidant and reducing capacities than those digested with the static and semi-dynamic protocols. The results obtained from the digests with the dynamic model showed a total phenol content (TPs) ranging from 1068.22 to 1456.65  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  and antioxidant capacity values from 7944.62 to 15,641.90  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  (ORAC) and from 8454.08 to 11,002.64  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  (ABTS<sup>•+</sup>), with a reducing power ranging from 2103.32 to 2679.78 mmol Fe reduced  $100 \text{ g}^{-1}$  (FRAP). The dynamic character of the protocols used for developing

bioactive cereal-based foods significantly affects the estimation of their bioaccessibility probably giving a better approach of their potential bioavailability *in vivo* systems.

**Keywords:** bioaccessibility; digestion; dynamic; nutraceutic ingredient; gastrointestinal dynamic model

### 1. Introduction

In the search for a healthier and more balanced diet, functional foods have gained importance and provided opportunities to improve health and prevent certain diseases, such as those associated with metabolic syndrome, such as diabetes, hypertension or cardiovascular diseases [1–3].

Cereals, such as wheat or oats, are a fundamental part of the human diet worldwide. In addition to providing energy in the form of carbohydrates, these grains are rich in dietary fibre and bioactive compounds [4,5]. Fibre is found mostly in the bran layer; fibre promotes digestive health, by regulating bowel function, and reduces the risk of chronic diseases [6,7]. On the other hand, most of the bioactive compounds present in those sources are in bound form and highly associated to dietary fibre, resulting in low bioaccessibility values. Nevertheless, these bioactive compounds have shown significant health effects, with phytosterols helping reduce serum LDL cholesterol levels and antioxidant polyphenols protecting against oxidative stress and inflammation [8–11].

In order to increase the health potential of cereal whole grains and bran, different biotechnological strategies have been attempted. One of these strategies is grain germination, which involves enzymatic activation and the release of bioactive compounds [12]. During germination, endogenous enzymes are activated, leading to the degradation of structural components of the kernel, such as starch and proteins, and leading to the release of nutrients and bioactive compounds [13]. Another

## COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

important biotechnological strategy is enzymatic hydrolysis, which involves the treatment of the bran or husk with cellulolytic and xylanolytic enzymes, which are responsible for breaking  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-glucosidic and  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4)-xylosidic bonds, and increasing extractability of phenolic compounds [14]. The use of these biotechnological tools can be obtention of functional foods and nutraceuticals with beneficial health-related properties of whole grain cereal bioactive compounds with low bioaccessibility. Furthermore, the biotechnological processes proposed avoid high temperature conditions occurring in other grain processes, conditions that have been reported to reduce polyphenol biaccessibility [15].

These and other strategies are intended to increase the bioavailability of the bioactive phytochemicals present in the food matrices. Prior to being bioavailable, compounds are released from the food matrix and solubilized during digestion, this way being bioaccessible for further uptake and absorption [16]. Testing the bioaccessibility of bioactive compounds or nutrients is of vital importance when developing effective functional foods and nutraceuticals. Bioaccessibility studies can result in a highly valuable approximation to understand the bioavailability of nutrients and bioactive compounds. *In vivo* studies to determine bioaccessibility and bioavailability are costly and constrained by ethical issues.

In order to evaluate the bioaccessibility of nutraceuticals or functional foods, it is interesting to determine how they behave in the digestive system. However, this is a complex process until *in vivo* trials can be performed, and sometimes it is not an easy process [17]. For this reason, development of a reliable intermediate method that simulates the human digestive system is interesting. Human digestive system replication *in vitro* has several advantages over conventional approaches. It allows for greater experimental controllability and reproducibility, and also offers the possibility to perform preliminary studies without the need to perform *in vivo* methods.

## RESULTADOS

In this regard, *in vitro* methods and models for simulated digestion have rapidly evolved in the recent decades in order to facilitate studies that provide evidence on the dynamics of release of nutrients and bioactive compounds [18]. Static artificial digestion systems are the most widely used, due to their low cost and simplicity of implementation in any laboratory without the need to purchase specific equipment [19]. Semi-dynamic and dynamic models provide a closer approach to physiological conditions than static digestion models. Despite the limitations of *in vitro* models, these have facilitated screening studies of an important number of compounds and matrices in variable testing conditions. On the other hand, there is a large number of models published with diverse experimental conditions. This is in detriment of the comparability of the results from different studies. An important effort for standardization was carried out by the International Network on Food Digestion (INFOGEST) project [20,21] for static and semi-dynamic models.

The protocol proposed by the COST action INFOGEST represents a significant advance in gastrointestinal digestion research, providing a standardised and reproducible method for the study of food digestion [22]. This method accurately simulates the physiological conditions of the human digestive tract, from chewing to intestinal absorption of nutrients. It uses a combination of digestive enzymes, gastrointestinal fluids and pH conditions to closely replicate the digestive processes that happen inside the human body. This approach allows a systematic and comparative assessment of how different foods, ingredients and formulations influence digestibility, nutrient release and bioaccessibility of bioactive compounds [23].

Nevertheless, differences between static, semi-dynamic and dynamic models are unavoidable, and so are their practical applications. It is important therefore to carry out studies comparing results from standardized methods using static and dynamic models, as proposed in this study.

# COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

Therefore, the main objective of this study was to evaluate three digestion models, with differences in dynamism, based on the INFOGEST consensus protocols, in order to determine the differences on the results obtained and potential utility for bioaccessibility determination.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-2-carboxylic acid (Trolox), fluorescein, 2,20-diazobis-(2-aminodinopropane)-dihydrochloride (AAPH), Folin–Ciocalteu (FC) reagent, iron (III) chloride hexahydrate ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), 2,20-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ( $\text{ABTS}^{•+}$ ), 2,4,6-tripyridyl-triazine (TPTZ), ammonium molybdate, iron (II) sulfate heptahydrate ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), ascorbic acid, sodium hydroxide, sodium phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), trichloroacetic acid, gallic acid (GA), ferulic acid, *p*-coumaric acid, sinapic acid, potassium chloride, potassium phosphate monobasic, sodium bicarbonate, sodium chloride, magnesium chloride hexahydrate, ammonium carbonate, calcium chloride dihydrate,  $\alpha$ -amylase, pepsin, pancreatin and bile salts were obtained from Sigma-Aldrich, Co. (St. Louis, MO, USA). Sulfuric acid, sodium acetate, hydrochloric acid and glacial acetic acid were obtained from PanReac AppliChem (ITW Reagents, Darmstadt, Germany). Food-grade enzymes UltraFlo XL and Viscoferm were generously supplied by Novozymes (Bagsværd, Copenhagen, Denmark).

### 2.2. Materials

Wheat grain (WG) and bran (WB) were generously supplied by Emilio Esteban, S.A. (Valladolid, Spain). Wheat (*Triticum aestivum* L.) was harvested in Valladolid in 2020. A dry milling process was used to separate the bran from the endosperm. Oat grain (OG) and hull (OH) were kindly provided by Sdad. Coop.

Regional Ltda. Ribera del Duero (Burgos, Spain). Oat (*Avena sativa* L., var. *Chimene*) was harvested in Burgos during the 2019-2020 season. Oat hulls were mechanically separated from the grain under dry conditions. The samples were milled and stored in vacuum plastic bags until analysis.

### 2.3 Sample preparation

Wheat grain (WG) and oat grain (OG) were germinated using a previously described method [13]. The grains were sanitized by soaking them in water with 0.5% sodium hypochlorite (*v/v*) for 30 minutes at a ratio of 1:6 (*w/v*). After rinsing with water to neutralize the pH, the grains were soaked in distilled water for 4 hours. Sanitized grains were then placed in trays and kept in a germination chamber (Snijders Scientific, Tilburg, The Netherlands) for 5 days at 21 °C with a relative humidity of over 90%. The resulting sprouts, SW and SO, were subjected to a high-pressure process (HPP) (Wave 6000/135, Hiperbaric, Burgos, Spain) at 600 MPa for 5 minutes, and then freeze-dried (LyoBeta, Telstar, Barcelona, Spain).

Wheat bran (WB) and oat hulls (OH) were subjected to an enzymatic hydrolysis treatment, following a previously described method [13], with slight modifications. WB and OH were resuspended in water at a 1:20 (*w/v*) ratio, and the pH was adjusted to 5 using malic acid. Enzymes (UltraFlo XL for WB and Viscoferm for OH) were added at 1% of the dry weight of WB or OH (*w/w*). The mixtures were incubated in a water bath at 47 °C for 20 hours with agitation (Unitronic Vaivén C, Selecta S.A., Spain). After incubation, the enzymes were inactivated by heating at 95 °C for 5 minutes, followed by a high-pressure treatment (HPP) at 600 MPa for 5 minutes. The insoluble fraction of the resulting hydrolysates, EH-WB and EH-OH, was drained using a nylon filter (200 µm mesh) and freeze-dried (LyoBeta, Telstar, Barcelona, Spain).

# COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

All ingredients (SW, SO, EH-WB, and EH-OH) were milled to a particle size of 0.5 mm. Subsequently, three different combinations of these ingredients were prepared in various proportions by weight, as described previously by authors [24]. Table 1 shows the different proportions by weight of the combined ingredients.

**Table 1.** Proportion of each ingredient by weight in the combined ingredients.

	Combined Ingredient 1 (CI1)	Combined Ingredient 2 (CI2)	Combined Ingredient 3 (CI3)
EH-WB	1	2	1
EH-OH	1	2	1
SW	1	1	2
SO	1	1	2

Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW) and sprouted oat (SO).

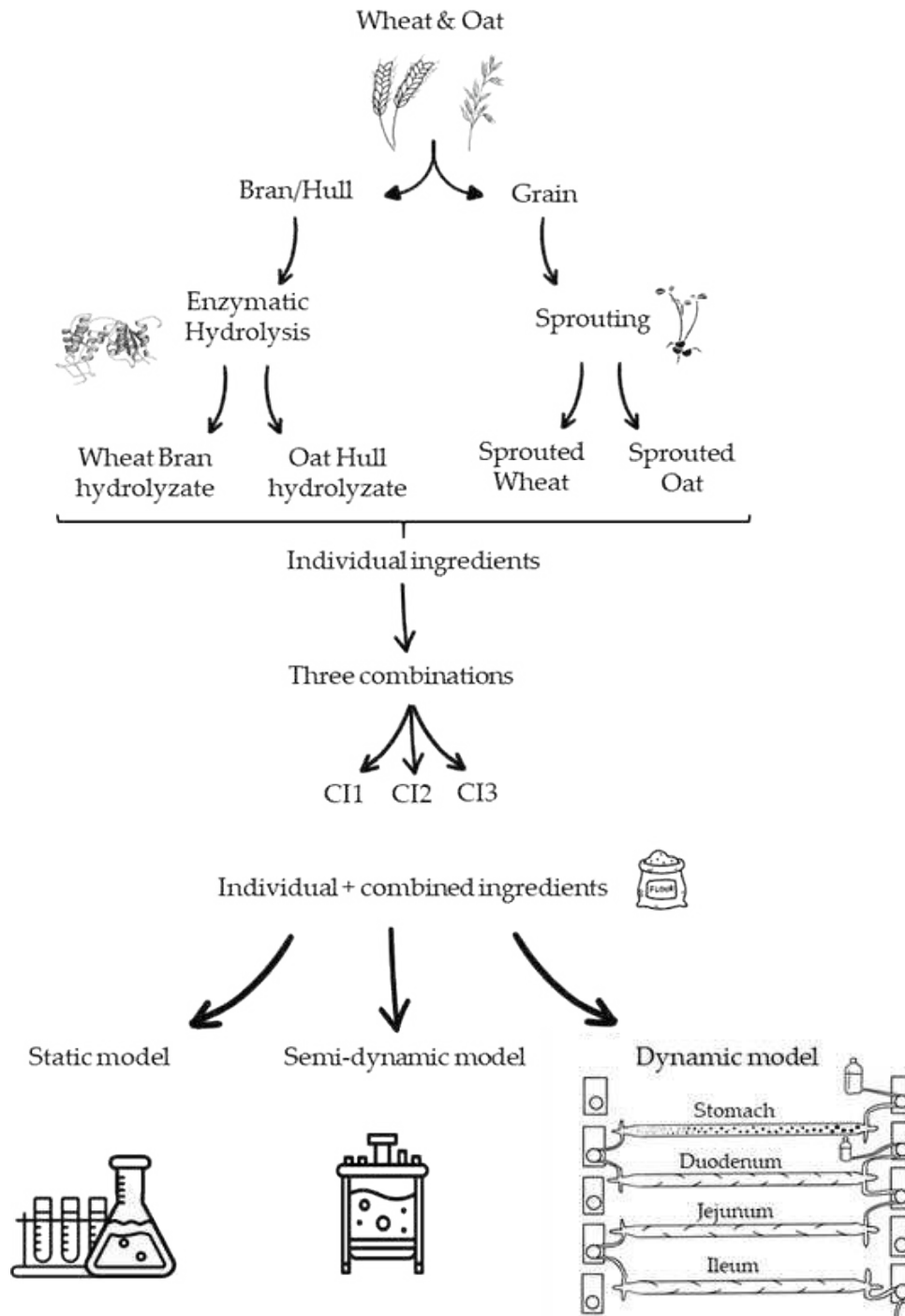
## 2.4. Digestion

The individual ingredients and the combined ingredients have been digested by three different methods, static, semi-dynamic and dynamic, following and adapting the INFOGEST protocol [22] in each case (Figure 1).

### 2.4.1. Static digestion model

One gram of each ingredient was weighed into a 15 mL tube and 1 mL of distilled water and 1 mL of simulated salivary fluid (SSF) were added. The tubes were incubated at 37 °C for 2 min. Then, 2 mL of simulated gastric fluid (SGF) was added, pH was adjusted to 3 with 1 M HCl and incubated for 2 hours at 37°C. After this time, 4 mL of simulated intestinal fluid (SIF) was added, pH adjusted to 7 with 1 M NaHCO<sub>3</sub> and incubated for 2 hours at 37 °C. Finally, the enzymes were inactivated at 95 °C for 10 minutes.

## RESULTADOS



**Figure 1.** Scheme of digestion models of individual and combined ingredients.

### 2.4.2. Semi-dynamic digestion model

60 g of ingredient was weighed, and 400 mL of distilled water and 60 mL of simulated salivary fluid were added. It was mixed and introduced into the equipment

## COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

(Minifors 2, INFORS HT, Bottmingen, Switzerland) and incubated at 37 °C for 2 min. Subsequently, 500 mL of simulated gastric fluid was added, the pH was adjusted to 3 with 1 M HCl and incubated for 2 hours at 37 °C with shaking at 200 rpm. After this time, 1 L of simulated intestinal fluid was added, pH adjusted to 7 with 0.5 M NaHCO<sub>3</sub> and incubated for 2 hours at 37 °C with shaking at 300 rpm. Finally, various aliquots of the digest were taken, and the enzymes were inactivated at 95 °C for 10 minutes.

### 2.4.3. Dynamic digestion model

The equipment was prepared with the different solutions necessary for pH adjustment (HCl, NaHCO<sub>3</sub>) and the different compartments were filled with the corresponding simulated fluid (gastric and intestinal), leaving the stomach half full. Six grams of sample were weighed, and 40 mL of distilled water and 6 mL of simulated salivary fluid were added, mixed well, and incubated for 2 min at 37 °C. After that, the sample was introduced into the stomach and incubated at 37 °C for 2 min. Subsequently, the sample was introduced into the stomach compartment and the next steps were started. The flow rate was 1 mL/min for the gastric phase and 2 mL/min for the intestinal phase. The pH adjustment was performed continuously using pH meters in each phase and adjustment pumps, maintaining pH 3 in the gastric phase and pH 7 in the intestinal phase. The sample was taken by collecting the output fluid at the end of the equipment from minute 120 to 330 minute. After that, the enzymes were inactivated at 95 °C for 10 min.

Finally, all samples of the digests obtained in each model were freeze-dried (LyoBeta, Telstar, Barcelona, Spain) for subsequent analysis.

### 2.5. Extraction

One gram of digested sample was weighed and 10 mL of methanol:distilled water (50 % *v/v*) pH 2 was added. Subsequently, they were centrifuged (4000 rpm, 10

## RESULTADOS

min, 4 °C) and the supernatant was filtered. The pellet was resuspended in 8 mL methanol:distilled water (50% *v/v*) pH 2 and incubated again. The samples were centrifuged a second time, and the supernatant was filtered over the previous one. Finally, they were stripped to a final volume of 20 mL with methanol:distilled water (50% *v/v*) pH 2 and aliquoted. Samples were stored at -80 °C until future analysis.

### 2.6. Total Phenolics content (TPs)

Total phenol content (TPs) was measured following the method reported by Slinkard and Singleton [25], utilizing the Folin-Ciocalteu phenol reagent. To quantify the TPs content in the samples, a standard curve was created using gallic acid (700-98 µM). The absorbance of the standards and samples was determined at 765 nm using a microplate reader (Fluostar Omega, BMG, Ortenberg, Germany). Results were expressed as µmol gallic acid equivalents (GAE) per 100 g dry matter (d.m.). All analyses were conducted in duplicate.

### 2.7. Determination of phenolic compounds by HPLC

Samples were filtered using a 0.22 µm nylon filter. An HPLC system (Agilent 1200, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with a DAD detector (Agilent G1315B) was employed to separate the phenolic compounds. Separation was performed on a Luna C18 column (250 mm x 2 mm i.d., 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA) at 25 °C. Gradient elution was performed using 0.1% aqueous formic acid (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). The gradient program at a flow rate of 0.4 mL/min was as follows: 0 min, 8% B; 10 min, 23% B; 15 min, 50% B; 20 min, 50% B; 23 min, 100% B; followed by a re-equilibration step. The injection volume was 20 µL.

For quantification, authentic standard curves for gallic acid, hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, and ferulic acid were prepared over a concentration range of 0.1

## COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

to 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , exhibiting good linearity ( $R^2 > 0.99$ ). Results were expressed as mg per 100 g of sample (d.m.).

### 2.8. Total Antioxidant Capacity (TAC)

Total antioxidant capacity (TAC) was determined, for duplicate, with different methods: oxygen radical absorbance capacity (ORAC), radical cation scavenging activity ABTS<sup>•+</sup> and ferric reducing antioxidant power (FRAP).

#### 2.8.1. Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)

ORAC assay was performed following the method described by Ou et al. [26], with some modifications. A standard Trolox curve (7.5-210  $\mu\text{M}$ ) and samples were diluted with phosphate buffer (75 mM, pH 7.4). 25  $\mu\text{L}$  of the sample, Trolox standard, and phosphate buffer (as blank) were added to a black 96-well microplate along with 125  $\mu\text{L}$  of fluorescein and incubated at 37 °C for 3 minutes. Then, 25  $\mu\text{L}$  of AAPH solution was added to initiate the oxidation reaction, and fluorescence was monitored for 150 minutes using a microplate reader (CLARIOstar Plus, BMG, Ortenberg, Germany) with excitation at 485 nm and emission at 520 nm. The areas under the fluorescein decay curves were plotted against Trolox concentration to calculate the results, which were expressed as  $\mu\text{mol TE}$  per 100 g of sample (d.m.).

#### 2.8.2. ABTS<sup>•+</sup> Radical Cation Scavenging Activity

The ABTS<sup>•+</sup> assay was performed according to the method described by Re et al. [27], with some modifications [28]. In a 96-well microplate, 20  $\mu\text{L}$  of the sample or standards was mixed with 200  $\mu\text{L}$  of ABTS<sup>•+</sup> working solution. After 60 minutes of incubation, absorbance was measured at 734 nm using a microplate reader (Spectrostar Omega, BMG Ortenberg, Germany). A Trolox standard curve (7.5-210  $\mu\text{M}$ ) was used as standard. Results were expressed as  $\mu\text{mol Trolox equivalents (TE)}$  per 100 g of sample (d.m.).

## 2.8.3. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

FRAP assay was conducted following the method described by Benzie and Strain [29], with slight modifications [30]. The FRAP working solution was prepared by mixing acetate buffer (300 mM, pH 3.6), TPTZ solution (10 mM in 40 mM HCl), and  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  solution (20 mM) in a 10:1:1 volume ratio. An  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  standard curve (400-3000  $\mu\text{M}$ ) was used for calibration. In Eppendorf tubes, 20  $\mu\text{L}$  of sample, standard, or distilled water (as blank) were mixed with 1.9 mL of the FRAP working solution. The tubes were stirred and incubated for 5 minutes. Absorbance was measured at 593 nm in a 96-well plate using a microplate reader (Spectrostar Omega, BMG Ortenberg, Germany). Results were expressed as mmol Fe equivalents (FeE) per 100 g of sample (d.m.).

## 2.9. Statistical Analysis

Results were reported as mean  $\pm$  standard deviation and range. Analysis of variance (ANOVA) and Duncan's post hoc tests were conducted to determine differences between mean values. The statistical analyses were carried out using Statgraphics Centurion XVI® software (StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). A p value below 0.05 was considered statistically significant.

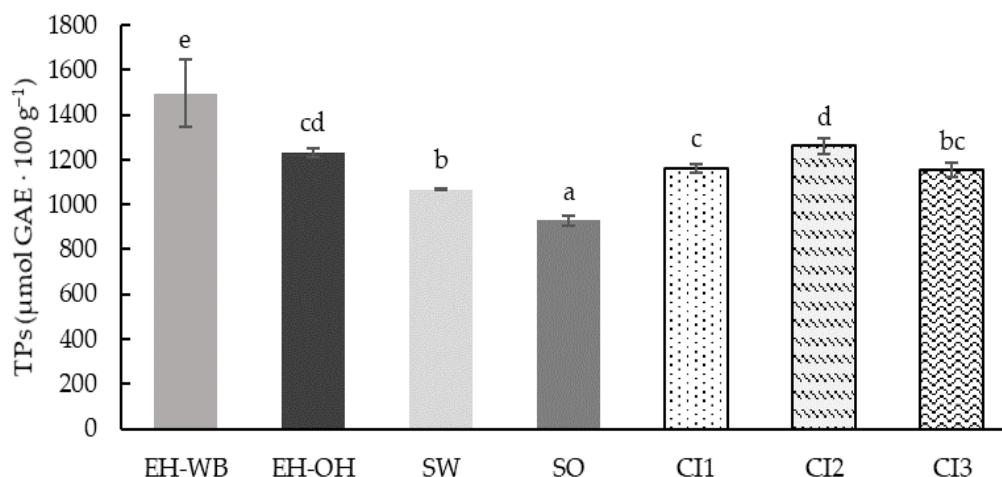
## 3. Results

### 3.1. Digestion in static model

Total phenolic compounds (TPs) content of the samples digested following the static model are shown in Figure 2. The values obtained ranged from 928.93 to 1495.76  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ , showing significant differences ( $p < 0.05$ ) between them. Digested samples of the ingredients obtained by enzymatic hydrolysis (EH-WB and EH-OH) showed higher contents than those obtained by germination (SW and SO). According to the type of matrix, ingredients from wheat showed higher TPs than those from oats.

## COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

Digested combined ingredients (CI1, CI2 and CI3) reflected the proportion of TPs as present in each individual ingredient used for their formulation, and the combined ingredient CI2, with a higher proportion of enzymatically hydrolyzates (EH-WB and EH-OH), presenting higher TPs values than CI1 and CI3.



**Figure 2.** Total Phenolics (TPs) content of the digests of the individual (EH-WB, EH-OH, SW and SO) and combined (CI1, CI2 and CI3) ingredients following the static model. Results were expressed  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  of d.m. Mean values represented as bars, and standard deviations represented as error bars. Different letters indicate significant differences from each other (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test,  $p < 0.05$ ). Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3).

HPLC was used to characterise and determine the content of the main phenolic compounds in the digests of the different individual ingredients (EH-WB, EH-OH, SW and SO) and the combined ingredients (CI1, CI2 and CI3). Table 2 shows the results obtained for the phenolic compounds characterised and determined in the different digested samples, which ranged from 0.15 to 1.08  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  for coumaric acid and from 0.16 to 3.26  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  for ferulic acid, showing significant differences ( $p < 0.05$ ). Similarly to TPs, digests from wheat samples showed higher content of these phenolic compounds; however, the enzymatic hydrolysis treatment did not favour their concentration, while germination did produce a higher amount of these compounds. The digests of the different combinations of ingredients, unlike the content in TPs, do

## RESULTADOS

not follow the proportionality in which the individual ingredients are found, with the digest of the CI2 ingredient standing out as containing the highest amount of both characterised phenolic compounds. This could be related to a possible interaction between phenolic compounds and other macromolecules, such as proteins or fibre.

**Table 2.** Phenolic compounds quantified by HPLC in digest samples following the static model. Results were expressed as mg 100 g<sup>-1</sup> of sample. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

	Cumaric acid	Ferulic acid
EH-WB	0.33 ± 0.07 <sup>b</sup>	0.16 ± 0.06 <sup>a</sup>
EH-OH	0.15 ± 0.00 <sup>a</sup>	< LOD
SW	1.08 ± 0.01 <sup>e</sup>	3.26 ± 0.05 <sup>e</sup>
SO	< LOD	< LOD
CI1	0.63 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.62 ± 0.05 <sup>c</sup>
CI2	0.86 ± 0.09 <sup>d</sup>	1.93 ± 0.17 <sup>d</sup>
CI3	0.58 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.60 ± 0.05 <sup>b</sup>

Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3), limit of detection (LOD).

The total antioxidant capacity (TAC) was determined following assays to evaluate its activity against different radicals (ORAC and ABTS<sup>•+</sup>) and the reducing power was determined with the FRAP assay.

ORAC method enabled to evaluate in the digests of the individual and combined ingredients the capacity to neutralise peroxy radicals generated by AAPH through the transfer of hydrogen atoms (Figure 3I) [31]. The results obtained ranged from 6017.37 to 10,730.39  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ , showing significant differences ( $p < 0.05$ ). The digests from the samples from the enzymatic hydrolysis treatment gave higher activity against the peroxy radicals than the digests from the germinated samples. The digests from the wheat ingredient samples showed higher activity against the peroxy radicals than the oat ingredients. The digests from the combination of ingredients

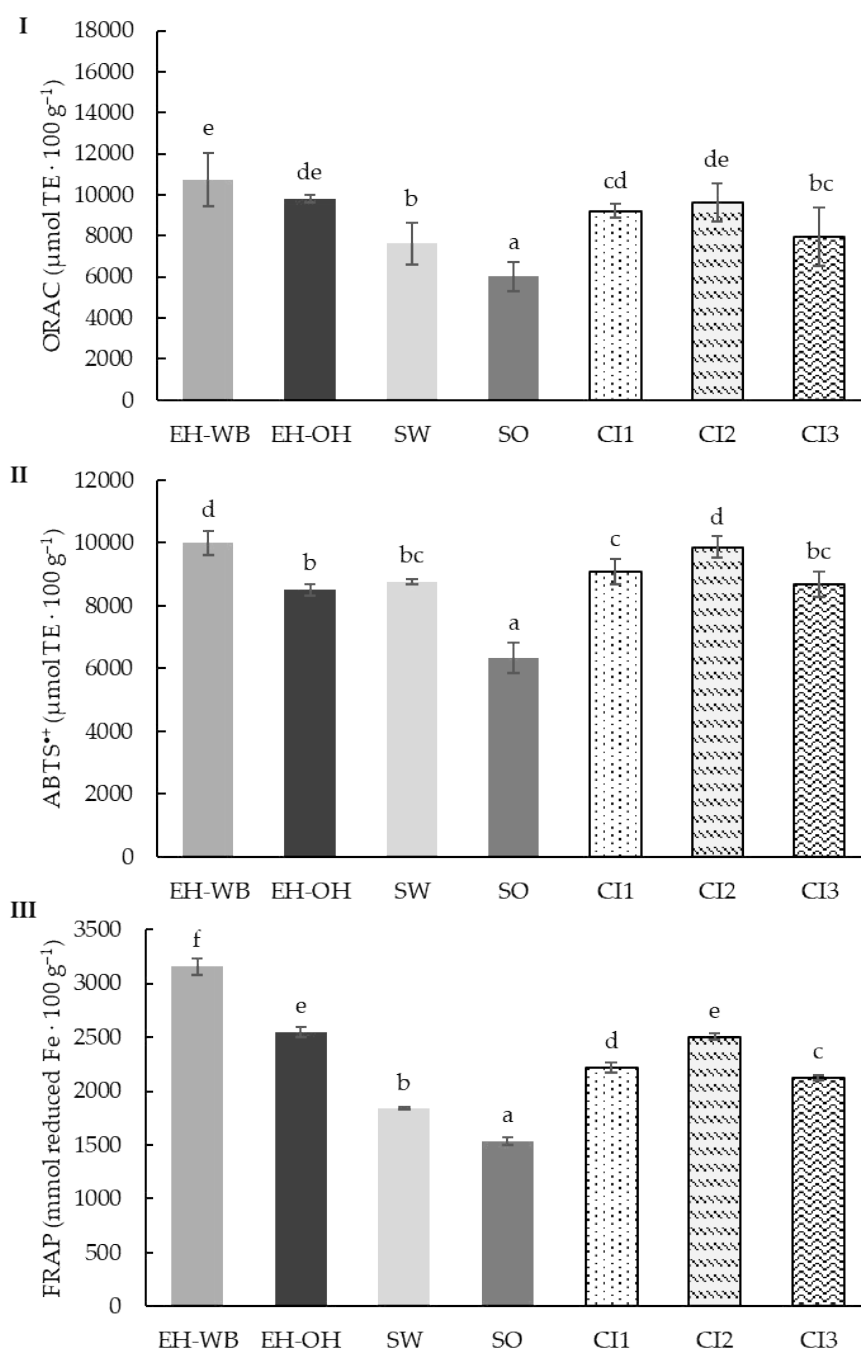
## COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

maintained the proportionality of the values obtained in the digests of the individual ingredients.

Also, ABTS<sup>•+</sup> radical activity of the digests of the different ingredients was determined (Figure 3II). This assay evaluates the ability of antioxidants to participate in electron transfer reactions [32]. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between the different ingredients with values ranging from 6345.17 to 10,010.76  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ . The results obtained for the digests of the hydrolysed ingredients were higher than those obtained for the digests of the germinated ingredients. According to the type of raw material, the digests of wheat ingredients showed higher activity against the ABTS<sup>•+</sup> radical than the digests of oat ingredients. The digests of the combined ingredients showed values between 8684.06 and 9871.01.09  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ , showing significant differences ( $p < 0.05$ ) between them and maintaining the proportion in which each individual ingredient is found, with the CI2 digest especially interesting.

The reducing power of the different digests was determined using the FRAP assay, and the results obtained are shown in Figure 3III. This assay measures the capacity to reduce iron (III) ions, which indicates the potential of the samples to neutralise free radicals. The values obtained ranged from 1538.10 to 3160.94 mmol reduced Fe 100  $\text{g}^{-1}$ , showing significant differences ( $p < 0.05$ ) between samples. Similar to the previous markers, the digests from the hydrolysed ingredients showed higher reducing power than the sprouts, and it was also higher in the digests from the wheat samples than from the oats. Likewise, the digests from the combined ingredients showed a reducing power according to the proportion in which the individual ingredients are found.

## RESULTADOS

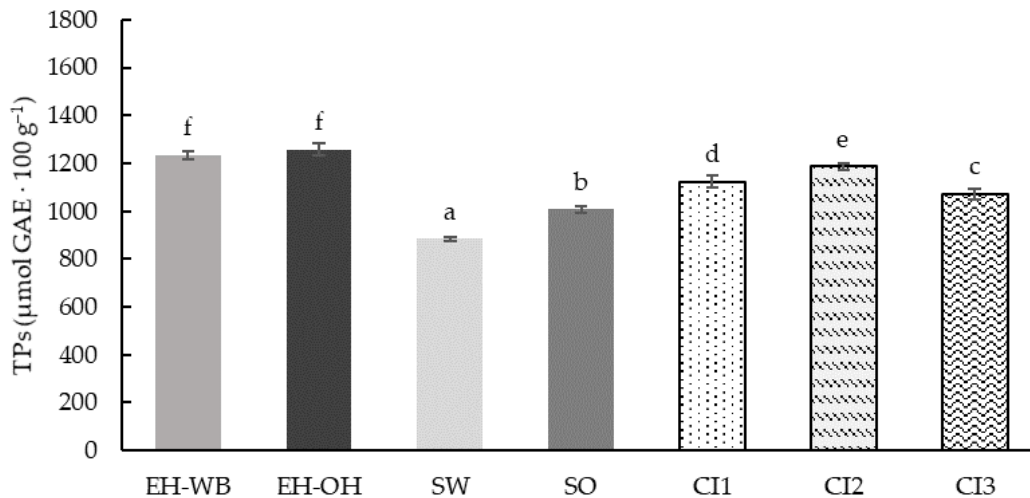


**Figure 3.** ORAC (I), ABTS $\bullet^+$  (II) and FRAP (III) values of the digests of the individual (EH-WB, EH-OH, SW and SO) and combined (CI1, CI2 and CI3) ingredients following the static model. Results were expressed  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  of sample and mmol reduced Fe  $100 \text{ g}^{-1}$ . Mean values represented as bars, and standard deviations represented as error bars. Different letters indicate significant differences from each other (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test,  $p < 0.05$ ). Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3).

# COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

## 3.2. Digestion in semi-dynamic model

As with samples subjected to digestion with the static model, total phenolic compounds (TPs) content of was determined in samples after digestion following the semi-dynamic model (Figure 4). In this case, the values obtained ranged from 884.21 to 1258.66  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ , showing significant differences ( $p < 0.05$ ) between them. Similarly to the static model, the digested samples of the hydrolyzed ingredients showed higher TPs content than those digested from the germinated ingredients. However, if we compare the matrix of the ingredients, the content of TPs is higher in those from oats compared to those from wheat. On the other hand, the digests of the combined ingredients showed a TPs content according to the proportion of the individual ingredients in each combination, with CI2 being the combined ingredient with the highest TPs content.



**Figure 4.** Total Phenolics (TPs) content of the digests of the individual (EH-WB, EH-OH, SW and SO) and combined (CI1, CI2 and CI3) ingredients following the semi-dynamic model. Results were expressed  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  of d.m. Mean values represented as bars, and standard deviations represented as error bars. Different letters indicate significant differences from each other (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test,  $p < 0.05$ ). Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3).

## RESULTADOS

Table 3 shows the values obtained for the phenolic compounds characterized in the different digests by HPLC. The values for coumaric acid ranged from 0.02 to 1.24 mg 100 g<sup>-1</sup>, and for ferulic acid from 0.07 to 0.87 mg 100 g<sup>-1</sup>, showing significant differences ( $p < 0.05$ ). Digested samples from wheat showed higher values than digested samples from oats. The germination process allows obtaining better values for the characterized compounds than after the hydrolysis process. The results observed for the digests of the combined ingredients were low, being under the limit of detection in some cases. Similarly to the static digestion model, it is possible that an interaction between phenolic compounds and other macromolecules, such as proteins or fibre, could exist due to the processes of germination and hydrolysis.

**Table 3.** Phenolic compounds quantified by HPLC in digest samples following the semi-dynamic model. Results were expressed as mg 100 g<sup>-1</sup> of sample. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

	Cumaric acid	Ferulic acid
EH-WB	0.02 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.07 ± 0.03 <sup>a</sup>
EH-OH	< LOD	< LOD
SW	1.24 ± 0.16 <sup>d</sup>	0.87 ± 0.02 <sup>d</sup>
SO	0.11 ± 0.06 <sup>b</sup>	< LOD
CI1	0.73 ± 0.05 <sup>c</sup>	0.20 ± 0.04 <sup>b</sup>
CI2	< LOD	0.27 ± 0.02 <sup>c</sup>
CI3	< LOD	< LOD

Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3), limit of detection (LOD).

The total antioxidant capacity (TAC) in the digests was also determined following the semi-dynamic model using ORAC, ABTS<sup>•+</sup> and FRAP assays (Figure 5).

The results obtained after evaluating the digests of the individual and combined ingredients with the ORAC method are shown in Figure 5I. The values obtained ranged from 8483.12 to 9878.20 μmol TE 100 g<sup>-1</sup>, with no significant differences ( $p < 0.05$ ) between them. The results obtained showed that the digests of

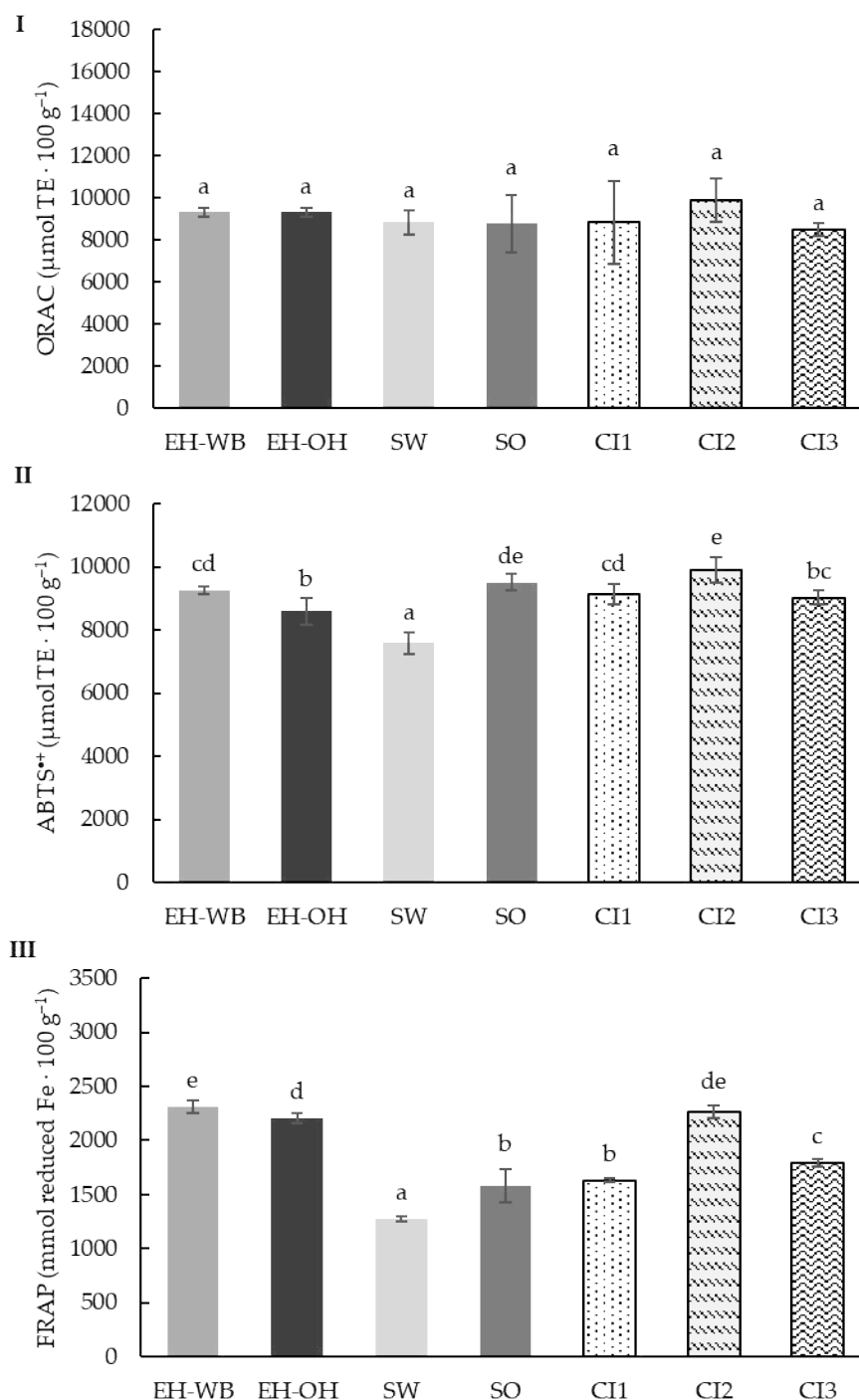
COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED  
NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC  
AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

the hydrolyzed ingredients were found to have a higher activity against the AAPH radical than the digests of the germinated ingredients, with no differences observed between the ingredient matrix (wheat or oat). Digests of the combined ingredients showed values ranging from 8483.12 to 9878.20  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ , with CI2 showing the highest activity against the radical.

Results obtained for the activity against the ABTS<sup>•+</sup> radical are shown in Figure 5II. Significant differences ( $p < 0.05$ ) are observed between the values obtained, which ranged from 7590.66 to 9894.70  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ . In this case, the matrix or the treatment used to obtain the ingredients did not show a clear pattern. However, the digests of the combined ingredients did maintain the proportionality of the individual ingredients, with the digest of CI2 being the most remarkable.

Finally, the reducing power of the different digests of the individual and combined ingredients was determined (Figure 5III). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between the values obtained, which ranged from 1274.20 to 2310.84  $\text{mmol reduced Fe } 100 \text{ g}^{-1}$ . The digests of the hydrolyzed ingredients showed higher reducing power compared to the sprouted ingredients, while the source matrix did not show any tendency. The values obtained in the digests of the combined ingredients maintained the ratio in which the individual ingredients are found, especially CI2.

## RESULTADOS

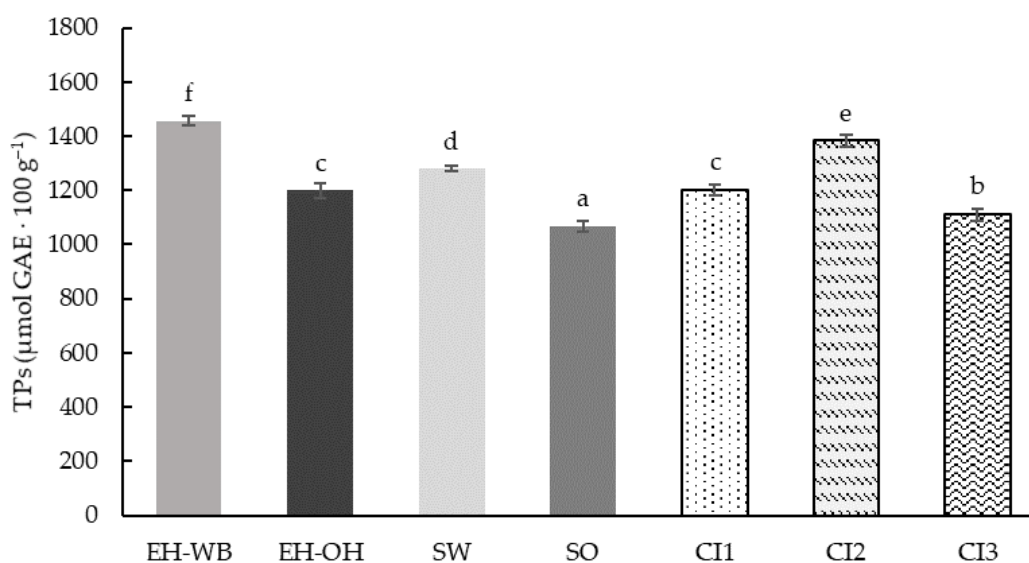


**Figure 5.** ORAC (I), ABTS $^{\bullet+}$  (II) and FRAP (III) values of the digests of the individual (EH-WB, EH-OH, SW and SO) and combined (CI1, CI2 and CI3) ingredients following the semi-dynamic model. Results were expressed  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  of sample and mmol reduced Fe  $100 \text{ g}^{-1}$ . Mean values represented as bars, and standard deviations represented as error bars. Different letters indicate significant differences from each other (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test,  $p < 0.05$ ). Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3).

# COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

## 3.3. Digestion in dynamic model

Similarly, to the previous digestion models, the content of phenolic compounds was determined in the digestate samples following the dynamic model (Figure 6). Significant differences ( $p < 0.05$ ) were observed between the values obtained, which ranged from 1068.22 to 1456.65  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$ . Digests of ingredients from wheat showed higher amounts of TPs than those from oats. The hydrolysis treatment favoured the release of phenolic compounds to a greater extent than the germination treatment. The digests of the combined ingredients maintained the proportion of the individual ingredients in each combination, with CI2 having a higher content of TPs.



**Figure 6.** Total Phenolics (TPs) content of the digests of the individual (EH-WB, EH-OH, SW and SO) and combined (CI1, CI2 and CI3) ingredients following the dynamic model. Results were expressed  $\mu\text{mol GAE } 100 \text{ g}^{-1}$  of d.m. Mean values represented as bars, and standard deviations represented as error bars. Different letters indicate significant differences from each other (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test,  $p < 0.05$ ). Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3).

The results obtained for the phenolic compounds characterised by HPLC in the different digests are shown in Table 4. Coumaric acid ranged from 0.01 to 3.36 mg

## RESULTADOS

100 g<sup>-1</sup>, and ferulic acid from 1.44 to 28.57 mg 100 g<sup>-1</sup>, showing significant differences ( $p < 0.05$ ) between the values obtained. As it occurred with the TPs results, the digests of the ingredients obtained from wheat showed higher content of the characterized compounds than the ingredients obtained from oat. The digests of the combined ingredients do not reflect the proportional proportions of the individual ingredients. Notably, the digest of the CI2 ingredient has the highest concentration of identified phenolic compounds.

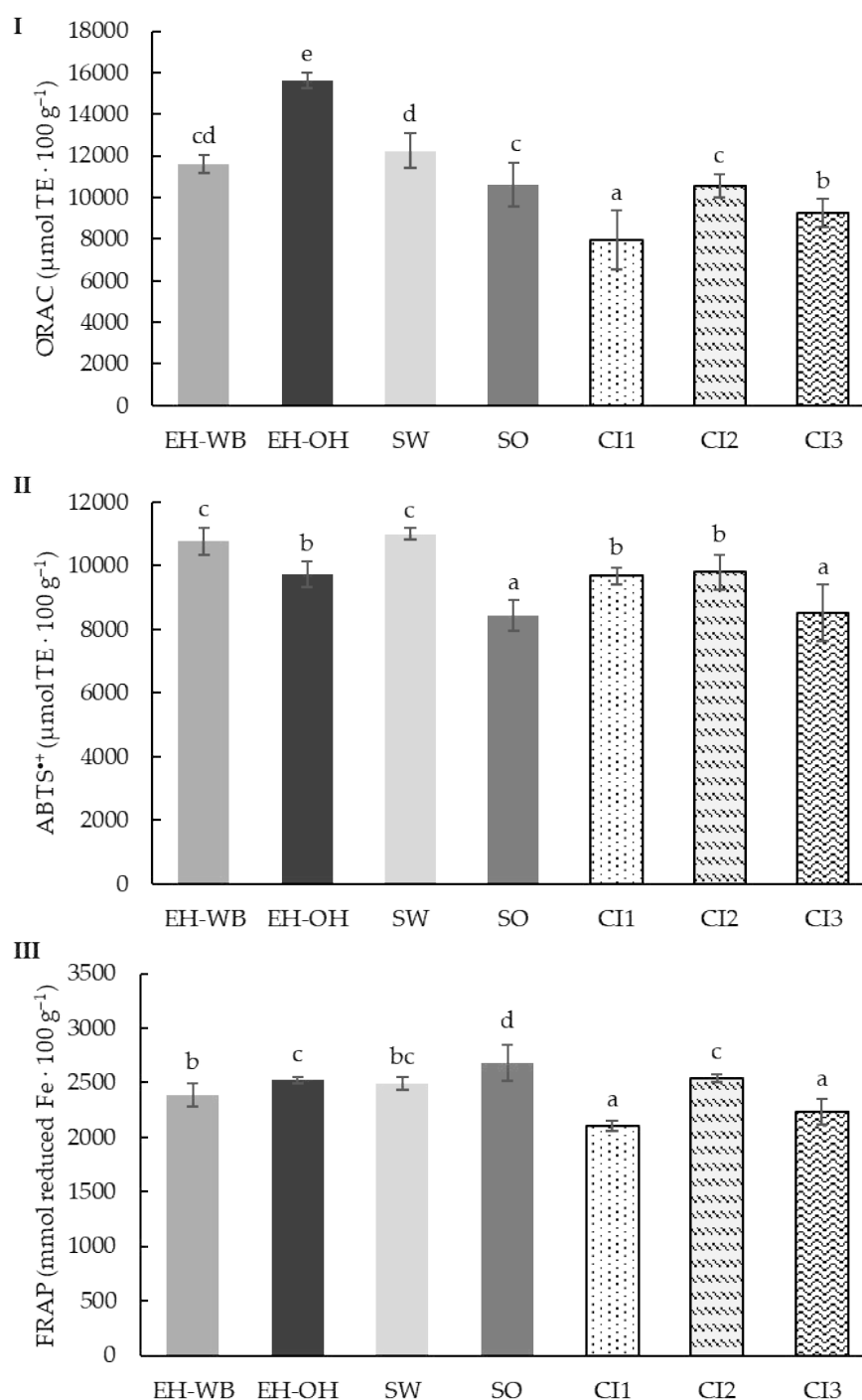
**Table 4.** Phenolic compounds quantified by HPLC in digest samples following the dynamic model. Results were expressed as mg 100 g<sup>-1</sup> of sample. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

	Cumaric acid	Ferulic acid
EH-WB	3.36 ± 0.02 <sup>e</sup>	21.84 ± 0.00 <sup>e</sup>
EH-OH	0.80 ± 0.47 <sup>c</sup>	3.74 ± 0.46 <sup>b</sup>
SW	0.01 ± 0.00 <sup>a</sup>	28.57 ± 0.04 <sup>f</sup>
SO	0.24 ± 0.00 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.00 <sup>a</sup>
CI1	0.77 ± 0.04 <sup>c</sup>	18.39 ± 0.17 <sup>d</sup>
CI2	1.39 ± 0.02 <sup>d</sup>	22.10 ± 0.35 <sup>e</sup>
CI3	0.26 ± 0.07 <sup>b</sup>	11.97 ± 0.20 <sup>c</sup>

Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3), limit of detection (LOD).

Furthermore, ORAC, ABTS<sup>•+</sup> and FRAP assays were used to determine the total antioxidant capacity (TAC) of the digests following the dynamic model. Figure 7I shows the results obtained for the activity against the peroxyl radicals of the different digests, determined by ORAC assay. Significant differences ( $p < 0.05$ ) are observed between the values obtained, which ranged from 7944.62 to 15,641.90 µmol TE 100 g<sup>-1</sup>. The type of raw material of the ingredients or the treatment carried out to obtain them does not show a clear trend in the results obtained. In relation to the digests of the combined ingredients, the results ranged from 7944.62 to 10,569.33 µmol TE 100 g<sup>-1</sup>, especially CI2.

# COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION



**Figure 7.** ORAC (I), ABTS $\bullet^+$  (II) and FRAP (III) values of the digests of the individual (EH-WB, EH-OH, SW and SO) and combined (CI1, CI2 and CI3) ingredients following the dynamic model. Results were expressed  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$  of sample and  $\mu\text{mol reduced Fe } 100 \text{ g}^{-1}$ . Mean values represented as bars, and standard deviations represented as error bars. Different letters indicate significant differences from each other (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test,  $p < 0.05$ ). Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3).

## RESULTADOS

Figure 7II shows the results obtained in the ABTS<sup>•+</sup> radical activity test. The values obtained ranged from 8454.08 to 11,002.64  $\mu\text{mol TE } 100 \text{ g}^{-1}$ , showing significant differences ( $p < 0.05$ ) between the results. The type of raw material showed differences between the results, with the highest ABTS<sup>•+</sup> radical activity in the digested samples of the wheat-based ingredients. However, the type of treatment applied to the ingredients showed no differences. In the same way as the previous markers, the results obtained in the digests of the combined ingredients maintain the proportion of the individual ingredients, in particular CI1 and CI2 with no differences between them.

Finally, the reducing power of the different digests of the individual and combined ingredients was evaluated (Figure 7III). The values obtained ranged from 2103.32 to 2679.78 mmol reduced Fe  $100 \text{ g}^{-1}$ , showing significant differences ( $p < 0.05$ ) between the results. The digests of the ingredients from oat showed higher reducing power than those from wheat. The treatment applied to the ingredients with the highest reducing power was the germination treatment. The digests of the combined ingredients obtained values from 2103.32 to 2539.39 mmol reduced Fe  $100 \text{ g}^{-1}$ , especially the combined ingredient CI2.

The different digestion models were compared in each assay in order to observe possible differences between them (Figure 8). The static and semi-dynamic models showed no differences between them; however, the dynamic model obtained the highest values with significant differences ( $p < 0.05$ ) in all assays. This suggests that the dynamic digestion model could be a potential model to determine the bioaccessibility of bioactive compounds in an approximation to the human digestion process.

## 4. Discussion

Different biotechnological strategies have been developed in the research for new ingredients with functional properties. Some of these options are based on the

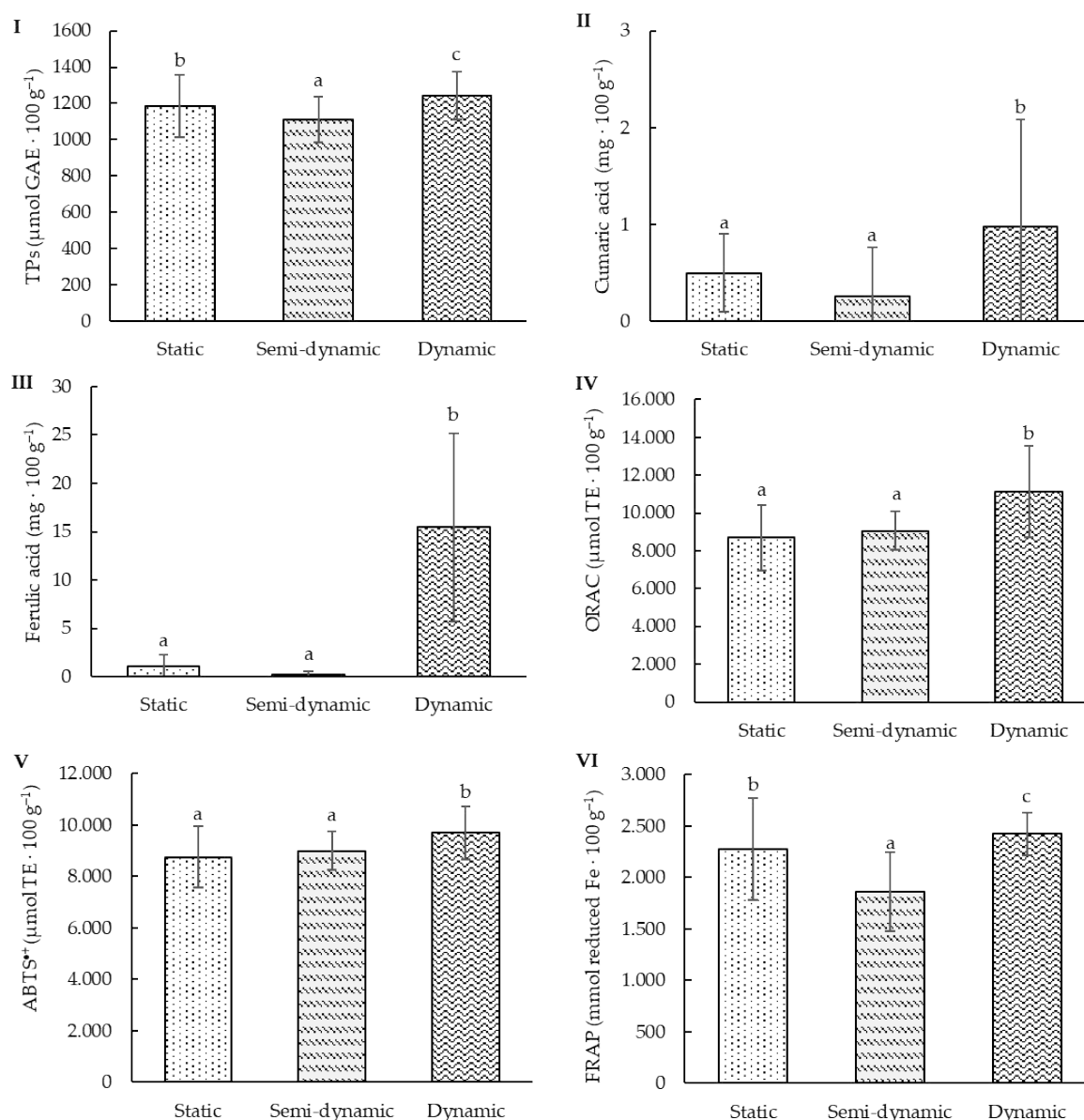
## COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

hydrolysis of the bran or hulls of cereals or the germination of whole grains [13,33]. However, the combination of different matrices has been found to be a promising strategy [24]. Furthermore, during the development of these ingredients, it is important to assess their bioaccessibility. For this, it is necessary to develop an *in vitro* process that allows to approach the human digestive system, because *in vivo* methods are complex and difficult to perform [17], being the INFOGEST protocol a good starting point [22]. For this reason, three *in vitro* digestion models were evaluated to observe the differences related to the determination of bioaccessibility.

On the one hand, regarding the content of total phenols (TPs), the results obtained after digestion of the ingredients produced by hydrolysis (EH-WB and EH-OH) showed similar values to those previously reported [13,33]. Hydrolysis with enzymes enhances the release of phenolic compounds linked to other structures such as cellulose, lignin and proteins, which are the constituents of the bran structure [34]. The germination process produces physiological and structural changes in the grains, due to the degradation of the structures by the action of endogenous enzymes. This promotes the release of phenolic compounds leading to an increase in the content of TPs [35,36].

The values obtained in TPs after digestion of the sprouted ingredients (SW and SO) showed higher values than previously reported by our group [13,24] and other authors, too [37,38]. This could be related to the varietal effect of the grains, to the conditions used during germination, as well as to the action of the enzymes involved in digestion, which may favour the release of phenolic compounds and their absorption throughout the digestive system [39]. The results obtained after digestion of the combined ingredients (CI1, CI2 and CI3) were similar to those previously reported by the authors [24], maintaining the proportion of the individual ingredients.

## RESULTADOS



**Figure 8.** Comparison of the different models of digestion according to the assays of Total Phenolics (TPs, **I**), cumaric acid (**II**), ferulic acid (**III**), ORAC (**IV**), ABTS<sup>+</sup> (**V**) and FRAP (**VI**), Mean values represented as bars, and standard deviations represented as error bars. Different letters indicate significant differences from each other (one-way ANOVA, post hoc Duncan's test,  $p < 0.05$ ). Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3).

When comparing the content of TPs obtained in the different digestion models, significant differences are observed between them (Figure 8I), especially in the dynamic model, showing a high content of TPs. This could be due to a higher contact of the food with the different phases of the process, and that, using a large volume, the

## COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

release of phenolic compounds associated with the macromolecules that constitute the food matrix is favored.

In the characterization of phenolic compounds by HPLC, it has been observed that results are lower than those previously reported by the authors [13,33]. This reduction of phenolic compounds was probably due to the degradation of phenolic compounds and the production of secondary metabolites during the digestion process [40]. Comparing the three digestion models, similar to the TPs content, significant differences ( $p < 0.05$ ) are observed between them, highlighting the dynamic model (Figure 8II and 8III), which, being more in contact with the phases of the process due to the large volume used, the phenolic compounds are released from the different matrices comprising the food.

On the other hand, ORAC, ABTS<sup>•+</sup> and FRAP assays were used to determine the antioxidant capacity of the samples digested with the different digestion models.

The values obtained for the digests of the hydrolysed ingredients (EH-WB and EH-OH) obtained in the assay against the AAPH radical (ORAC) were similar to results previously reported by the group [24,33]. Results of the digestion of the hydrolysed by-products against the ABTS<sup>•+</sup> radical were higher than the results previously obtained [24,33]. This increase can be associated with the degradation of the macromolecules of the food matrix and the production of other metabolites, such as peptides, which also present affinity with the ABTS<sup>•+</sup> radical due to their capacity to donate hydrogen atoms to free radicals [41]. The values obtained for the reducing power (FRAP) of the EH-WB and EH-OH digests were lower than those previously reported [24].

The results obtained in the ORAC assay for the digests of the germinated grains (SW and SO) were higher than those obtained previously by the group [13,24], due to digestion process promoting the release of compounds that are linked to other

## RESULTADOS

macromolecules, and also by other authors [37], due to the varietal effect and the germination process. Results obtained from SW and SO digests against the ABTS<sup>•+</sup> radical, similar to the digests of hydrolyzed ingredients, were higher than the results previously reported [13,24], which could be associated to the production of metabolites with antioxidant capacity, such as peptides. The reducing power (FRAP) observed in the digests of the germinated grains was higher than those previously obtained by the group [13,24].

Finally, regarding the digests of the combined ingredients (CI1, CI2 and CI3), the results obtained in the ORAC assay are slightly higher than those observed previously to the digestion [24]. This increase, as we have seen previously, is associated with the degradation of the structure of the macromolecules and the release of compounds associated with them. The results obtained in the static and semi-dynamic models maintained the proportion of the individual ingredients, while the dynamic model showed a reduction of 20–40% with respect to the expected value.

The values obtained for the digests of the combined ingredients against the ABTS<sup>•+</sup> radical is double the previously observed without digestion [24]. Similarly to the ORAC assay, the degradation of macromolecules that occurs during the digestion process produces smaller metabolites. Some of these metabolites, such as peptides, have a high antioxidant capacity and are able to react with the ABTS radical. The results observed for the reducing power (FRAP) of the digested combined ingredients are lower than previously observed [24]. In the ABTS<sup>•+</sup> and FRAP assays, no substantial differences are observed between the expected and real values of the different ingredient combinations, maintaining the proportion of each individual ingredient.

Comparing the results obtained for the antioxidant capacity in these models (Figures 8IV-8VI), it was observed that the digestion with the dynamic model showed

## COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

the highest antioxidant capacity compared to the other two digestion models. The values observed in these assays were higher than those previously reported by other authors [40,42–44]. Differences found are mainly related to the methodology used during the digestion process, as well as to the varietal differences of the raw materials.

Our study has some limitations, despite the dynamic models' improvements, they still fall short in capturing the complex interplay of factors such as gut microbiota, hormonal influences, and individual variability. Furthermore, *in vitro* digestion methods, while cost-effective and less ethically constrained, cannot completely replace *in vivo* studies. The absence of key physiological parameters limits the full understanding of nutrient absorption and metabolism. Moreover, our design has some strengths, one major strength is its standardization of *in vitro* digestion models, particularly in the context of nutrient and bioactive compound bioaccessibility from food matrices. This ensures reproducibility and comparability of results across different laboratories, facilitating the understanding of food digestion and the bioavailability of nutrients.

Additionally, the use of a dynamic digestion model offers a more physiologically relevant simulation of the human gastrointestinal process compared to static models. This enhances the accuracy of bioaccessibility estimates, making the study outcomes more translatable to real-world settings.

### 5. Conclusions

The results obtained indicate that, INFOGEST protocol shows differences associated to the *in vitro* digestion models. As far as we know, this is the first study to compare three *in vitro* digestion models using the same protocol.

The digestion process using a dynamic model promotes more contact of the food with the different phases of digestion (oral, gastric and intestinal). This results in

## RESULTADOS

the degradation of structures and the fragmentation of macromolecules into smaller molecules, thus releasing compounds that were linked to them. These compounds, such as phenolic compounds, have biological activity and, according to various studies, have antioxidant, anticarcinogenic, anti-inflammatory, antidiabetic and cardioprotective properties.

This study shows that the development of a dynamic digestion model could be a useful strategy to evaluate the bioaccessibility of foods helping to tailor formulations for *in vivo* studies.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.B.M.-D. and D.R.; methodology, A.B.M.-D., D.R. and I.J.J.-P.; software, A.B.M.-D., D.R. and I.J.J.-P.; validation, A.B.M.-D., D.R., I.J.J.-P. and D.d.L.; formal analysis, I.J.J.-P.; investigation, A.B.M.-D., I.J.J.-P. and D.d.L.; data curation, I.J.J.-P.; writing—original draft preparation, A.B.M.-D., D.R. and I.J.J.-P.; writing—review and editing, A.B.M.-D., D.R., D.d.L. and I.J.J.-P.; visualization, A.B.M.-D., D.R., D.d.L. and I.J.J.-P.; supervision, A.B.M.-D., D.R., and D.d.L.; project administration, A.B.M.-D.; funding acquisition, A.B.M.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Grant AGL2017-83718-R funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and “ERDF A way of making Europe”. I.J.J.-P. is thankful for his FPI fellowship (PRE2019-087824) from AEI/Spain and ESF/UE.

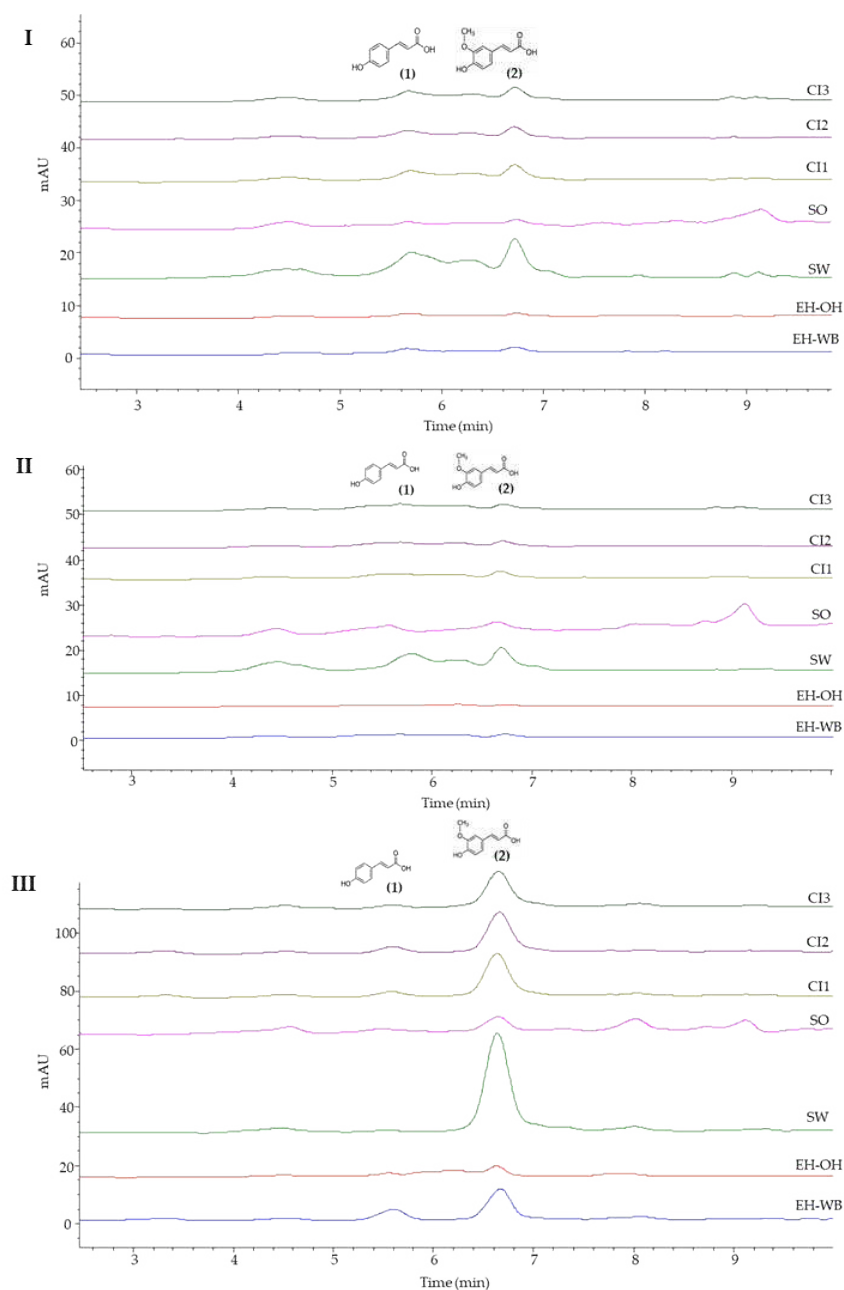
**Data Availability Statement:** The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

**Acknowledgments:** The authors acknowledge EMESA, S.A. (Valladolid, Spain) for providing wheat bran and grain, the factory Sdad. Coop. Regional Ltda, and Ribera del Duero (Burgos, Spain) for kindly providing the oat hull and grain used in this

# COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

study. Also, the authors would like to thank Novozyme for kindly providing the enzymes used in the hydrolysis process.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.



**Figure S1.** Chromatograms for the identified phenolic compounds in the digests of the individual (EH-WB, EH-OH, SW and SO) and combined (CI1, CI2 and CI3) ingredients following the static (I), semi-dynamic (II) and dynamic (III) model: 1 = cumaric acid, 2 = ferulic acid. Abbreviations: wheat bran hydrolysate (EH-WB), oat hull hydrolysate (EH-OH), sprouted wheat (SW), sprouted oat (SO), combined ingredient 1, 2 and 3 (CI1, CI2, CI3).

## References

1. Cena, H.; Calder, P.C. Defining a Healthy Diet: Evidence for the Role of Contemporary Dietary Patterns in Health and Disease. *Nutrients* **2020**, *12*, 334. <https://doi.org/10.3390/nu12020334>.
2. Björck, I.; Östman, E.; Kristensen, M.; Mateo Anson, N.; Price, R.K.; Haenen, G.R.M.M.; Havenaar, R.; Bach Knudsen, K.E.; Frid, A.; Mykkänen, H.; et al. Cereal Grains for Nutrition and Health Benefits: Overview of Results from in Vitro, Animal and Human Studies in the HEALTHGRAIN Project. *Trends Food Sci. Technol.* **2012**, *25*, 87–100. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.11.005>.
3. Aune, D.; Keum, N.; Giovannucci, E.; Fadnes, L.T.; Boffetta, P.; Greenwood, D.C.; Tonstad, S.; Vatten, L.J.; Riboli, E.; Norat, T. Whole Grain Consumption and Risk of Cardiovascular Disease, Cancer, and All Cause and Cause Specific Mortality: Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies. *BMJ* **2016**, i2716. <https://doi.org/10.1136/bmj.i2716>.
4. Robert, W. Nutrient Composition and Nutritional Quality of Oats and Comparisons with Other Cereals. In *Oats: Chemistry and Technology*, 2nd ed.; Webster, H.F., Wood, P.J., Eds.; Academic Press: Cambridge: MA, USA, 2016; pp. 95–108.
5. Kaur, A.; Yadav, M.P.; Singh, B.; Bhinder, S.; Simon, S.; Singh, N. Isolation and Characterization of Arabinoxylans from Wheat Bran and Study of Their Contribution to Wheat Flour Dough Rheology. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *221*, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.06.002>.
6. Anderson, J.W.; Baird, P.; Davis, R.H., Jr; Ferreri, S.; Knudtson, M.; Koraym, A.; Waters, V.; Williams, C.L. Health Benefits of Dietary Fiber. *Nutr. Rev.* **2009**, *67*, 188–205. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2009.00189.x>.

COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED  
NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC  
AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

7. de Punder, K.; Pruimboom, L. The Dietary Intake of Wheat and Other Cereal Grains and Their Role in Inflammation. *Nutrients* **2013**, *5*, 771–787. <https://doi.org/10.3390/nu5030771>.
8. Hui, S.; Liu, K.; Lang, H.; Liu, Y.; Wang, X.; Zhu, X.; Doucette, S.; Yi, L.; Mi, M. Comparative Effects of Different Whole Grains and Brans on Blood Lipid: A Network Meta-Analysis. *Eur. J. Nutr.* **2019**, *58*, 2779–2787. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1827-6>.
9. Huang, W.; Tian, F.; Wang, H.; Wu, S.; Jin, W.; Shen, W.; Hu, Z.; Cai, Q.; Liu, G. Comparative Assessment of Extraction, Composition, and in Vitro Antioxidative Properties of Wheat Bran Polyphenols. *Lebenson. Wiss. Technol.* **2023**, *180*, 114706. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114706>.
10. Zhang, Y.; Bai, B.; Huang, K.; Li, S.; Cao, H.; Guan, X. Bound Polyphenols of Oat Bran Released by Gut Microbiota Mitigate High Fat Diet-Induced Oxidative Stress and Strengthen the Gut Barrier via the Colonic ROS/Akt/Nrf2 Pathway. *J. Agric. Food Chem.* **2024**, *72*, 13099–13110. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.4c01666>.
11. Calder, P.C.; Ahluwalia, N.; Brouns, F.; Buetler, T.; Clement, K.; Cunningham, K.; Esposito, K.; Jönsson, L.S.; Kolb, H.; Lansink, M.; et al. Dietary Factors and Low-Grade Inflammation in Relation to Overweight and Obesity. *Br. J. Nutr.* **2011**, *106* Suppl 3, S5-78. <https://doi.org/10.1017/S0007114511005460>.
12. Chethan Kumar, P.; Amutha, S.; Oberoi, H.S.; Kanchana, S.; Azeez, S.; Rupa, T.R. Germination Induced Changes in Bioactive Compounds and Nutritional Components of Millets. *J. Food Sci. Technol.* **2022**, *59*, 4244–4252. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05485-2>.
13. Jiménez-Pulido, I.J.; Rico, D.; Martínez-Villaluenga, C.; Pérez-Jiménez, J.; Luis, D.D.; Martín-Diana, A.B. Sprouting and Hydrolysis as Biotechnological Tools for Development of Nutraceutical Ingredients from Oat Grain and Hull. *Foods* **2022**, *11*, 2769. <https://doi.org/10.3390/foods11182769>.

## RESULTADOS

14. Bautista-Expósito, S.; Tomé-Sánchez, I.; Martín-Diana, A.B.; Frias, J.; Peñas, E.; Rico, D.; Casas, M.J.G.; Martínez-Villaluenga, C. Enzyme Selection and Hydrolysis under Optimal Conditions Improved Phenolic Acid Solubility, and Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Wheat Bran. *Antioxidants* **2020**, *9*, 984. <https://doi.org/10.3390/antiox9100984>.
15. Qie, X.; Cheng, Y.; Chen, Y.; Zeng, M.; Wang, Z.; Qin, F.; Chen, J.; Li, W.; He, Z. In Vitro Phenolic Bioaccessibility of Coffee Beverages with Milk and Soy Subjected to Thermal Treatment and Protein–Phenolic Interactions. *Food Chem.* **2022**, *375*, 131644. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131644>.
16. Parada, J.; Aguilera, J.M. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *J. Food Sci.* **2007**, *72*, R21-32. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x>.
17. Rico, D.; Martín-Diana, A.B. Nutracéuticos y Alimentos Funcionales Aliados Para La Salud: La Necesidad de Un Diseño “a Medida”. *Nutr Clin Med* **2023**, *17*, 103–118. <https://doi.org/10.7400/NCM.2023.17.2.5121>.
18. Stewart, R.J.C.; Morton, H.; Coad, J.; Pedley, K.C. In Vitro Digestion for Assessing Micronutrient Bioavailability: The Importance of Digestion Duration. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2019**, *70*, 71–77. <https://doi.org/10.1080/09637486.2018.1481200>.
19. Tan, Y.; Zhou, H.; McClements, D.J. Application of Static in Vitro Digestion Models for Assessing the Bioaccessibility of Hydrophobic Bioactives: A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2022**, *122*, 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.028>.
20. Minekus, M.; Alming, M.; Alvito, P.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; Corredig, M.; Dupont, D.; et al. A Standardised Static in Vitro Digestion Method Suitable for Food - an International Consensus. *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/c3fo60702j>.
21. Mulet-Cabero, A.-I.; Egger, L.; Portmann, R.; Ménard, O.; Marze, S.; Minekus, M.; Le Feunteun, S.; Sarkar, A.; Grundy, M.M.-L.; Carrière, F.; et al. A Standardised

COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED  
NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC  
AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

- Semi-Dynamic in Vitro Digestion Method Suitable for Food - an International Consensus. *Food Funct.* **2020**, *11*, 1702–1720. <https://doi.org/10.1039/c9fo01293a>.
22. Brodkorb, A.; Egger, L.; Alming, M.; Alvito, P.; Assunção, R.; Ballance, S.; Bohn, T.; Bourlieu-Lacanal, C.; Boutrou, R.; Carrière, F.; et al. INFOGEST Static in Vitro Simulation of Gastrointestinal Food Digestion. *Nat. Protoc.* **2019**, *14*, 991–1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.
23. Zhou, H.; Tan, Y.; McClements, D.J. Applications of the INFOGEST in Vitro Digestion Model to Foods: A Review. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2023**, *14*, 135–156. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-060721-012235>.
24. Jiménez-Pulido, I.J.; Martín-Diana, A.B.; Tomé-Sánchez, I.; de Luis, D.; Martínez-Villaluenga, C.; Rico, D. Boosting Synergistic Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties Blending Cereal-Based Nutraceuticals Produced Using Sprouting and Hydrolysis Tools. *Foods* **2024**, *13*, 1868. <https://doi.org/10.3390/foods13121868>.
25. Slinkard, K.; Singleton, V.L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. *Am. J. Enol. Vitic.* **1977**, *28*, 49–55. <https://doi.org/10.5344/ajev.1974.28.1.49>.
26. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4619–4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>.
27. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *26*, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(98)00315-3).
28. Martín-Diana, A.B.; Izquierdo, N.; Albertos, I.; Sánchez, M.S.; Herrero, A.; Sanz, M.A.; Rico, D. Valorization of Carob's Germ and Seed Peel as Natural Antioxidant Ingredients in Gluten-Free Crackers: Carob Antioxidant by-Products in Gluten-

## RESULTADOS

- Free Snack. *J. Food Process. Preserv.* **2017**, *41*, e12770. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12770>.
29. Benzie, I.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.
30. Jimenez-Pulido, I.J.; Daniel, R.; Perez, J.; Martínez-Villaluenga, C.; De Luis, D.; Martín Diana, A.B. Impact of Protein Content on the Antioxidants, Anti-Inflammatory Properties and Glycemic Index of Wheat and Wheat Bran. *Foods* **2022**, *11*, 2049. <https://doi.org/10.3390/foods11142049>.
31. Ou, B.; Huang, D.; Hampsch-Woodill, M.; Flanagan, J.A.; Deemer, E.K. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3122–3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>.
32. Siddeeg, A.; AlKehayez, N.M.; Abu-Hiamed, H.A.; Al-Sanea, E.A.; Al-Farga, A.M. Mode of Action and Determination of Antioxidant Activity in the Dietary Sources: An Overview. *Saudi J. Biol. Sci.* **2021**, *28*, 1633–1644. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.064>.
33. Jiménez-Pulido, I.J.; Rico, D.; De Luis, D.; Martín-Diana, A.B. Combined Strategy Using High Hydrostatic Pressure, Temperature and Enzymatic Hydrolysis for Development of Fibre-Rich Ingredients from Oat and Wheat by-Products. *Foods* **2024**, *13*, 378. <https://doi.org/10.3390/foods13030378>.
34. Engert, N.; John, A.; Henning, W.; Honermeier, B. Effect of Sprouting on the Concentration of Phenolic Acids and Antioxidative Capacity in Wheat Cultivars (*Triticum Aestivum* Ssp. *Aestivum* L.) in Dependency of Nitrogen Fertilization. *J. Appl. Bot. Food Qual.* **2011**, *84*, 111–118.

COMPARATIVE BIOACCESSIBILITY STUDY OF CEREAL-BASED  
NUTRACEUTICAL INGREDIENTS USING INFOGEST STATIC, SEMI-DYNAMIC  
AND DYNAMIC IN VITRO GASTROINTESTINAL DIGESTION

35. Nguyen, T.H.D.; Nguyen, L.L.P.; Baranyai, L. Influence of Sprouting on Phenolic Acids, Carotenoids, and Antioxidant Activity of Millet Varieties. *J. Agric. Food Res.* **2023**, *14*, 100810. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100810>.
36. Aborus, N.E.; Šaponjac, V.T.; Čanadanović-Brunet, J.; Četković, G.; Hidalgo, A.; Vulić, J.; Šeregelj, V. Sprouted and Freeze - dried Wheat and Oat Seeds – Phytochemical Profile and in Vitro Biological Activities. *Chem. Biodivers.* **2018**, *15*. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800119>.
37. Miyahira, R.F.; de Lima Pena, F.; Fabiano, G.A.; de Oliveira Lopes, J.; Ponte, L.G.S.; da Cunha, D.T.; Bezerra, R.M.N.; Antunes, A.E.C. Changes in Phenolic Compound and Antioxidant Activity of Germinated Broccoli, Wheat, and Lentils during Simulated Gastrointestinal Digestion. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2022**, *77*, 233–240. <https://doi.org/10.1007/s11130-022-00970-7>.
38. Tomé-Sánchez, I.; Martín-Diana, A.B.; Peñas, E.; Frias, J.; Rico, D.; Jiménez-Pulido, I.; Martínez-Villaluenga, C. Bioprocessed Wheat Ingredients: Characterization, Bioaccessibility of Phenolic Compounds, and Bioactivity During in Vitro Digestion. *Front. Plant Sci.* **2022**, *12*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.790898>.
39. Zhang, Q.; Xing, B.; Sun, M.; Zhou, B.; Ren, G.; Qin, P. Changes in Bio-Accessibility, Polyphenol Profile and Antioxidants of Quinoa and Djulis Sprouts during in Vitro Simulated Gastrointestinal Digestion. *Food Sci. Nutr.* **2020**, *8*, 4232–4241. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1718>.
40. Ed Nignpense, B.; Francis, N.; Blanchard, C.; Santhakumar, A.B. Effect of Gastrointestinal Digestion on the Stability, Antioxidant Activity, and Caco - 2 Cellular Transport of Pigmented Grain Polyphenols. *J. Food Sci.* **2024**, *89*, 2701 – 2715. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.17009>.
41. Martínez-Medina, G.A.; Carranza-Méndez, R.; Amaya-Chantaca, D.P.; Ilyna, A.; Gaviria-Acosta, E.; Hoyos-Concha, J.L.; Chávez-González, M.L.; Govea-Salas, M.; Prado-Barragán, L.A.; Aguilar-González, C.N. Bioactive Peptides from Food Industrial Wastes. In *Bioactive Peptides: Production, Bioavailability, Health*

- Potential and Regulatory Issues, 1st ed.; Onuh, J.O., Selvamuthukumaran, M., Pathak, Y.V., Eds.; CRC Press: Boca Raton: FL, USA, 2021; pp. 169–203 ISBN 9781003052777.
42. Gong, E.S.; Gao, N.; Li, T.; Chen, H.; Wang, Y.; Si, X.; Tian, J.; Shu, C.; Luo, S.; Zhang, J.; et al. Effect of in Vitro Digestion on Phytochemical Profiles and Cellular Antioxidant Activity of Whole Grains. *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 7016–7024. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b02245>.
  43. Wang, L.; Zhao, H.; Brennan, M.; Guan, W.; Liu, J.; Wang, M.; Wen, X.; He, J.; Brennan, C. In Vitro Gastric Digestion Antioxidant and Cellular Radical Scavenging Activities of Wheat-Shiitake Noodles. *Food Chem.* **2020**, *330*, 127214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127214>.
  44. Li, Y.; Wang, H.; Wang, L.; Qiu, J.; Li, Z.; Wang, L. Milling of Wheat Bran: Influence on Digestibility, Hydrolysis and Nutritional Properties of Bran Protein during in Vitro Digestion. *Food Chem.* **2023**, *404*, 134559. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134559>.

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## CONCLUSIONES



## 5. CONCLUSIONES

1. El salvado de trigo y la cascarilla de avena presentan un contenido significativamente mayor de compuestos fenólicos en comparación con el grano entero, lo que indica que se trata de una materia prima con un gran potencial para el desarrollo ingredientes nutraceuticos.
2. La germinación (6 días, 21 °C, >90% humedad) y la hidrólisis enzimática (20 h, 47 °C, 1% p/v enzima –UltraFloXL para trigo y Viscoferm para avena–) resultan procesos biotecnológicos efectivos para favorecer la bioaccesibilidad de compuestos activos mejorando las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de los granos y salvados de trigo y avena.
3. La combinación del proceso de hidrólisis enzimática y el tratamiento con altas presiones hidrostáticas (APH) a 60–70 °C aumenta significativamente el contenido en compuestos bioactivos, como son los compuestos fenólicos y los  $\beta$ -glucanos, en el salvado de trigo y la cáscara de avena. Así mismo, mejora la estabilidad y la vida útil de los ingredientes, facilitando su incorporación en productos nutraceuticos.
4. La combinación de ingredientes obtenidos a partir de trigo y avena potencia la capacidad antioxidante y modulan la respuesta inflamatoria, sugiriendo una posible sinergia entre estos compuestos en la formulación de ingredientes nutraceuticos.
5. El proceso de digestión in vitro siguiendo el modelo dinámico resulta una herramienta interesante para evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos procedentes de los ingredientes nutraceuticos, proporcionando una aproximación mucho más exacta que los sistemas estáticos tradicionalmente empleados en los estudios in vivo.
6. Ingredientes nutraceuticos combinados como el CI2, formado por dos partes de hidrolizado y una parte de germinado, tanto de trigo como de avena, presentan

## CONCLUSIONES

un potencial efecto para la prevención de procesos oxidativos e inflamación con especial interés en población con síndrome metabólico.

## BIBLIOGRAFÍA



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abotaleb, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2020). Therapeutic Potential of Plant Phenolic Acids in the Treatment of Cancer. *Biomolecules*, 10(2), 221. <https://doi.org/10.3390/biom10020221>
- Abuajah, C. I., Ogbonna, A. C., & Osuji, C. M. (2015). Functional components and medicinal properties of food: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2522-2529. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1396-5>
- Ajiboye, T. O., Ajala-Lawal, R. A., & Abdullahi, R. (2019). Metabolic syndrome: Protective potentials of dietary phenolic acids. En *Molecular Nutrition: Carbohydrates* (pp. 225-235). Elsevier.
- AlAli, M., Alqubaisy, M., Aljaafari, M. N., AlAli, A. O., Baqais, L., Molouki, A., Abushelaibi, A., Lai, K.-S., & Lim, S.-H. E. (2021). Nutraceuticals: Transformation of Conventional Foods into Health Promoters/Disease Preventers and Safety Considerations. *Molecules*, 26(9), 2540. <https://doi.org/10.3390/molecules26092540>
- Alberti, K. G. M. M., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J.-C., James, W. P. T., Loria, C. M., & Smith, S. C. (2009). Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International

## BIBLIOGRAFÍA

- Association for the Study of Obesity. *Circulation*, 120(16), 1640-1645.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644>
- Alberti, K. G. M. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2006). Metabolic syndrome—A new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, 23(5), 469-480. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x>
- Alberti, K. G. M., Zimmet, P., & Shaw, J. (2005). The metabolic syndrome—A new worldwide definition. *The Lancet*, 366(9491), 1059-1062.  
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67402-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67402-8)
- Albertos, I., Martin-Diana, A. B., Sanz, M. A., Barat, J. M., Diez, A. M., Jaime, I., & Rico, D. (2016). Effect of high pressure processing or freezing technologies as pretreatment in vacuum fried carrot snacks. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.11.004>
- Aparicio-García, N., Martínez-Villaluenga, C., Frias, J., & Peñas, E. (2021). Sprouted oat as a potential gluten-free ingredient with enhanced nutritional and bioactive properties. *Food Chemistry*, 338, 127972.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127972>
- Ardern, C. I., & Janssen, I. (2007). Metabolic syndrome and its association with morbidity and mortality. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32(1), 33-45. <https://doi.org/10.1139/h06-099>

## BIBLIOGRAFÍA

- Aron-Wisnewsky, J., & Clément, K. (2016). The gut microbiome, diet, and links to cardiometabolic and chronic disorders. *Nature Reviews Nephrology*, 12(3), 169-181. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.191>
- Aryal, D., Joshi, S., Thapa, N. K., Chaudhary, P., Basaula, S., Joshi, U., Bhandari, D., Rogers, H. M., Bhattarai, S., Sharma, K. R., Regmi, B. P., & Parajuli, N. (2024). Dietary phenolic compounds as promising therapeutic agents for diabetes and its complications: A comprehensive review. *Food Science & Nutrition*, 12(5), 3025-3045. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3983>
- Balasubramaniam, V. M. (Bala), Martínez-Monteagudo, S. I., & Gupta, R. (2015). Principles and Application of High Pressure-Based Technologies in the Food Industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 435-462. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022814-015539>
- Baranzelli, J., Somacal, S., Monteiro, C. S., Mello, R. D. O., Rodrigues, E., Prestes, O. D., López-Ruiz, R., Garrido Frenich, A., Romero-González, R., Miranda, M. Z. D., & Emanuelli, T. (2023). Grain Germination Changes the Profile of Phenolic Compounds and Benzoxazinoids in Wheat: A Study on Hard and Soft Cultivars. *Molecules*, 28(2), 721. <https://doi.org/10.3390/molecules28020721>
- Bautista-Expósito, S., Tomé-Sánchez, I., Martín-Diana, A. B., Frias, J., Peñas, E., Rico, D., Casas, M. J. G., & Martínez-Villaluenga, C. (2020). Enzyme Selection and Hydrolysis under Optimal Conditions Improved Phenolic Acid Solubility, and

## BIBLIOGRAFÍA

- Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Wheat Bran. *Antioxidants*, 9(10), 984. <https://doi.org/10.3390/antiox9100984>
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118-129. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.03.006>
- Bock, P. M., Telo, G. H., Ramalho, R., Sbaraini, M., Leivas, G., Martins, A. F., & Schaan, B. D. (2021). The effect of probiotics, prebiotics or synbiotics on metabolic outcomes in individuals with diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, 64(1), 26-41. <https://doi.org/10.1007/s00125-020-05295-1>
- Borchers, A. T., Keen, C. L., & Gershwin, M. E. (2016). The Basis of Structure/Function Claims of Nutraceuticals. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 51(3), 370-382. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8536-9>
- Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., ... Recio, I. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14(4), 991-1014. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>
- Calabriso, N., Massaro, M., Scoditti, E., Pasqualone, A., Laddomada, B., & Carluccio, M. A. (2020). Phenolic extracts from whole wheat biofortified bread dampen overwhelming inflammatory response in human endothelial cells and

## BIBLIOGRAFÍA

- monocytes: Major role of VCAM-1 and CXCL-10. *European Journal of Nutrition*, 59(6), 2603-2615. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-02109-y>
- Calder, P. C. (2017). Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: From molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, 45(5), 1105-1115. <https://doi.org/10.1042/BST20160474>
- Cesar, T. B., Ramos, F. M. M., & Ribeiro, C. B. (2022). Nutraceutical Eriocitrin (Eriomin) Reduces Hyperglycemia by Increasing Glucagon-Like Peptide 1 and Downregulates Systemic Inflammation: A Crossover-Randomized Clinical Trial. *Journal of Medicinal Food*, 25(11), 1050-1058. <https://doi.org/10.1089/jmf.2021.0181>
- Che Zain, M. S. (2024). Emerging botanical processing technology of bioflavonoid for sustainable production of high value standardized nutraceutical ingredients: A review. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 18(7), 5602-5621. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02591-x>
- Clark, K. C., & Kwitek, A. E. (2021). Multi-Omic Approaches to Identify Genetic Factors in Metabolic Syndrome. En *Comprehensive Physiology* (pp. 3045-3084). Wiley. <https://doi.org/10.1002/cphy.c210010>
- Clark, M. A., Springmann, M., Hill, J., & Tilman, D. (2019). Multiple health and environmental impacts of foods. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(46), 23357-23362. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906908116>

## BIBLIOGRAFÍA

- Cornier, M.-A., Dabelea, D., Hernandez, T. L., Lindstrom, R. C., Steig, A. J., Stob, N. R., Van Pelt, R. E., Wang, H., & Eckel, R. H. (2008). The Metabolic Syndrome. *Endocrine Reviews*, 29(7), 777-822. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0024>
- Cuesta, M., Fuentes, M., Rubio, M., Bordiu, E., Barabash, A., Garcia De La Torre, N., Rojo-Martinez, G., Valdes, S., Soriguer, F., Vendrell, J. J., Urrutia, I. M., Ortega, E., Montanya, E., Menendez, E., Lago-Sampedro, A., Gomis, R., Goday, A., Castell, C., Badia-Guillen, R., ... Calle-Pascual, A. L. (2020). Incidence and regression of metabolic syndrome in a representative sample of the Spanish population: Results of the cohort di@bet.es study. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 8(1), e001715. <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-001715>
- Das, L., Bhaumik, E., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2012). Role of nutraceuticals in human health. *Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 173-183. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0269-4>
- DeFelice, S. L. (1995). The nutraceutical revolution: Its impact on food industry R&D. *Trends in Food Science & Technology*, 6(2), 59-61. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)88944-X](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)88944-X)
- Després, J.-P., Lemieux, I., Bergeron, J., Pibarot, P., Mathieu, P., Larose, E., Rodés-Cabau, J., Bertrand, O. F., & Poirier, P. (2008). Abdominal Obesity and the Metabolic Syndrome: Contribution to Global Cardiometabolic Risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(6), 1039-1049. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.159228>

## BIBLIOGRAFÍA

- Di Lorenzo, C., Colombo, F., Biella, S., Stockley, C., & Restani, P. (2021). Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. *Nutrients*, 13(1), 273. <https://doi.org/10.3390/nu13010273>
- Dias-Martins, A. M., Trombete, F. M., Cappato, L. P., Chávez, D. W. H., Santos, M. B., & Carvalho, C. W. P. (2024). Processing, composition, and technological properties of decorticated, sprouted, and extruded pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) flours. *Journal of Food Process Engineering*, 47(2), e14561. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14561>
- Dillard, C. J., & German, J. B. (2000). Phytochemicals: Nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(12), 1744-1756. [https://doi.org/10.1002/1097-0010\(20000915\)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1097-0010(20000915)80:12<1744::AID-JSFA725>3.0.CO;2-W)
- Elliott, H., Woods, P., Green, B. D., & Nugent, A. P. (2022). Can sprouting reduce phytate and improve the nutritional composition and nutrient bioaccessibility in cereals and legumes? *Nutrition Bulletin*, 47(2), 138-156. <https://doi.org/10.1111/nbu.12549>
- Expert Panel On Detection, Evaluation, And Treatment Of High Blood Cholesterol In Adults. (2001). Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III).

## BIBLIOGRAFÍA

- JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 285(19), 2486-2497.  
<https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>
- FAO. (s. f.). *FAOSTAT*. Disponible en: <https://www.fao.org/faostat/en/#data>
- Ferri, M., Happel, A., Zanaroli, G., Bertolini, M., Chiesa, S., Commisso, M., Guzzo, F., & Tassoni, A. (2020). Advances in combined enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran. *New Biotechnology*, 56, 38-45.  
<https://doi.org/10.1016/j.nbt.2019.10.010>
- Freiberg, M. S., Cabral, H. J., Heeren, T. C., Vasan, R. S., & Curtis Ellison, R. (2004). Alcohol Consumption and the Prevalence of the Metabolic Syndrome in the U.S. *Diabetes Care*, 27(12), 2954-2959. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.12.2954>
- Galanakis, C. M. (2021). Functionality of Food Components and Emerging Technologies. *Foods*, 10(1), 128. <https://doi.org/10.3390/foods10010128>
- Geslain-Biquez, C., Vol, S., Tichet, J., Caradec, A., D'Hour, A., & Balkau, B. (2003). The metabolic syndrome in smokers. The D.E.S.I.R. study. *Diabetes & Metabolism*, 29(3), 226-234. [https://doi.org/10.1016/S1262-3636\(07\)70031-9](https://doi.org/10.1016/S1262-3636(07)70031-9)
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. A. F. (2010). Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292-302.  
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00110.x>
- Grundy, S. M. (2016). Metabolic syndrome update. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 26(4), 364-373. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2015.10.004>

## BIBLIOGRAFÍA

- Grundy, S. M., Brewer, H. B., Cleeman, J. I., Smith, S. C., & Lenfant, C. (2004). Definition of Metabolic Syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation*, 109(3), 433-438. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000111245.75752.C6>
- Gutiérrez, Á. L., Rico, D., Ronda, F., Martín-Diana, A. B., & Caballero, P. A. (2022). Development of a gluten-free whole grain flour by combining soaking and high hydrostatic pressure treatments for enhancing functional, nutritional and bioactive properties. *Journal of Cereal Science*, 105, 103458. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2022.103458>
- Halliwell, B. (2024). Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 25(1), 13-33. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00645-4>
- Hasler, C. M. (2002). Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges—A Position Paper from the American Council on Science and Health. *The Journal of Nutrition*, 132(12), 3772-3781. <https://doi.org/10.1093/jn/132.12.3772>
- Ibitoye, O. B., & Ajiboye, T. O. (2018). Dietary phenolic acids reverse insulin resistance, hyperglycaemia, dyslipidaemia, inflammation and oxidative stress in high-fructose diet-induced metabolic syndrome rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 124(5), 410-417. <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1415938>

## BIBLIOGRAFÍA

- IHME. (2022a). *Cardiovascular diseases — Level 2 cause*. Global Health Metrics. Disponible en: <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-cardiovascular-diseases-level-2-disease>
- IHME. (2022b). *Chronic kidney disease — Level 3 cause*. Global Health Metrics. Disponible en: <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-chronic-kidney-disease-level-3-disease>
- IHME. (2022c). *Diabetes mellitus type 2 — Level 4 cause*. Global Health Metrics. Disponible en: <https://www.healthdata.org/research-analysis/diseases-injuries-risks/factsheets/2021-diabetes-mellitus-type-2-level-4-disease>
- Koo, A., Chew, D. X., Ghate, V., & Zhou, W. (2023). Residual polyphenol oxidase and peroxidase activities in high pressure processed bok choy (*Brassica rapa* subsp. *Chinensis*) juice did not accelerate nutrient degradation during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 84, 103284. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2023.103284>
- Lante, A., Canazza, E., & Tessari, P. (2023). Beta-Glucans of Cereals: Functional and Technological Properties. *Nutrients*, 15(9), 2124. <https://doi.org/10.3390/nu15092124>
- Lebert, L., Buche, F., Sorin, A., & Aussenac, T. (2022). The Wheat Aleurone Layer: Optimisation of Its Benefits and Application to Bakery Products. *Foods*, 11(22), 3552. <https://doi.org/10.3390/foods11223552>

## BIBLIOGRAFÍA

- Lin, Y., Wang, C.-L., & Chiang, T.-I. (2024). Eicosapentaenoic acid supplementation alleviates pruritus, enhances skin moisture, and mitigates depression in maintenance hemodialysis patients. *Frontiers in Nephrology*, 4, 1365809. <https://doi.org/10.3389/fneph.2024.1365809>
- Liu, L., Deng, X., Huang, L., Li, Y., Zhang, Y., Chen, X., Guo, S., Yao, Y., Yang, S., Tu, M., Xiang, W., Li, H., & Rao, Y. (2022). Comparative effects of high hydrostatic pressure, pasteurization and nisin processing treatments on the quality of pickled radish. *LWT*, 167, 113833. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113833>
- Liu, Y., Shi, L., Qiu, W., & Shi, Y. (2022). Ferulic acid exhibits anti-inflammatory effects by inducing autophagy and blocking NLRP3 inflammasome activation. *Molecular & Cellular Toxicology*, 18(4), 509-519. <https://doi.org/10.1007/s13273-021-00219-5>
- Lu, W., Yang, X., Shen, J., Li, Z., Tan, S., Liu, W., & Cheng, Z. (2021). Choosing the appropriate wall materials for spray-drying microencapsulation of natural bioactive ingredients: Taking phenolic compounds as examples. *Powder Technology*, 394, 562-574. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2021.08.082>
- Lutz, M., Fuentes, E., Ávila, F., Alarcón, M., & Palomo, I. (2019). Roles of Phenolic Compounds in the Reduction of Risk Factors of Cardiovascular Diseases. *Molecules*, 24(2), 366. <https://doi.org/10.3390/molecules24020366>
- Ma, Y., Yi, J., Jin, X., Li, X., Feng, S., & Bi, J. (2023). Freeze-Drying of Fruits and Vegetables in Food Industry: Effects on Phytochemicals and Bioactive

## BIBLIOGRAFÍA

- Properties Attributes - A Comprehensive Review. *Food Reviews International*, 39(9), 6611-6629. <https://doi.org/10.1080/87559129.2022.2122992>
- Madan, K., Paliwal, S., Sharma, S., Kesar, S., Chauhan, N., & Madan, M. (2023). Metabolic Syndrome: The Constellation of Co-morbidities, A Global Threat. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 23(12), 1491-1504. <https://doi.org/10.2174/1871530323666230309144825>
- Malik, F., Iqbal, A., Zia, S., Ranjha, M. M. A. N., Khalid, W., Nadeem, M., Selim, S., Hadidi, M., Moreno, A., Manzoor, M. F., Kowalczewski, P. Ł., & Aadil, R. M. (2023). Role and mechanism of fruit waste polyphenols in diabetes management. *Open Chemistry*, 21(1), 20220272. <https://doi.org/10.1515/chem-2022-0272>
- Markowiak, P., & Ślizewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Martín-Diana, A. B., & Rico, D. (2023). La importancia del proceso digestivo. Simuladores gastrointestinales. Implicaciones en la investigación nutraceutica. *Nutrición Clínica en Medicina*, 17(3), 207-220. <https://doi.org/10.7400/NCM.2023.17.3.5128>
- Martín-Diana, A. B., Tomé-Sánchez, I., García-Casas, M. J., Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., & Rico, D. (2021). A Novel Strategy to Produce a Soluble and Bioactive Wheat Bran Ingredient Rich in Ferulic Acid. *Antioxidants*, 10(6), 969. <https://doi.org/10.3390/antiox10060969>

## BIBLIOGRAFÍA

- Martirosyan, D., Kanya, H., & Nadalet, C. (2021). Can functional foods reduce the risk of disease? Advancement of functional food definition and steps to create functional food products. *Functional Foods in Health and Disease*, 11(5), 213. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v11i5.788>
- Martirosyan, D. M., & Singh, J. (2015). A new definition of functional food by FFC: What makes a new definition unique? *Functional Foods in Health and Disease*, 5(6), 209. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v5i6.183>
- Mathews, R., & Chu, Y. (2024). An encompassing review of meta-analyses and systematic reviews of the effect of oats on all-cause mortality, cardiovascular risk, diabetes risk, body weight/adiposity and gut health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1-22. <https://doi.org/10.1080/10408398.2024.2382352>
- Minekus, M. (2015). The TNO Gastro-Intestinal Model (TIM). En *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 37-46). Springer International Publishing.
- Mishra, A. P., Gupta, E., Singh, P., & Prasad, R. (2021). Application of microalgae metabolites in food and pharmaceutical industry. En *Preparation of phytopharmaceuticals for the management of disorders: The nutraceuticals and traditional medicine* (pp. 391-408). Elsevier.
- Mohamed, S. M., Shalaby, M. A., El-Shiekh, R. A., El-Banna, H. A., Emam, S. R., & Bakr, A. F. (2023). Metabolic syndrome: Risk factors, diagnosis, pathogenesis, and management with natural approaches. *Food Chemistry Advances*, 3, 100335. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100335>

## BIBLIOGRAFÍA

- Monteiro, C. A., Cannon, G., Lawrence, M., Costa Louzada, M. L., & Pereira Machado, P. (2019). *Ultra-processed foods, diet quality, and health using the NOVA classification system*. Rome: FAO. Disponible en: <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/5277b379-0acb-4d97-a6a3-602774104629/content>
- Nakashima, A., Yamada, K., Iwata, O., Sugimoto, R., Atsuji, K., Ogawa, T., Ishibashi-Ohgo, N., & Suzuki, K. (2018).  $\beta$ -Glucan in Foods and Its Physiological Functions. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 64(1), 8-17. <https://doi.org/10.3177/jnsv.64.8>
- Natali, A., & Ferrannini, E. (2004). Hypertension, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 33(2), 417-429. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2004.03.007>
- Nawawi, N. I. M., Ijod, G., Senevirathna, S. S. J., Aadil, R. M., Yusof, N. L., Yusoff, M. M., Adzahan, N. M., & Azman, E. M. (2023). Comparison of high pressure and thermal pasteurization on the quality parameters of strawberry products: A review. *Food Science and Biotechnology*, 32(6), 729-747. <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01276-3>
- Neta, R. S. D. O., Lima, S. C. V. C., Nascimento, L. L. D., Souza, C. V. S. D., Lyra, C. D. O., Marchioni, D. M. L., & Oliveira, A. G. R. D. C. (2023). Indices for measurement of sustainable diets: A scoping review. *PLOS ONE*, 18(12), e0296026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296026>

## BIBLIOGRAFÍA

- Nguyen, T. H. D., Nguyen, L. L. P., & Baranyai, L. (2023). Influence of sprouting on phenolic acids, carotenoids, and antioxidant activity of millet varieties. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100810.  
<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100810>
- Niccolai, A., Chini Zittelli, G., Rodolfi, L., Biondi, N., & Tredici, M. R. (2019). Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. *Algal Research*, 42, 101617.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101617>
- Nishi, N. (2022). Food System for Sustainable Healthy Diets: Global and Local Efforts. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 68(Supplement), S98-S100.  
<https://doi.org/10.3177/jnsv.68.S98>
- Olaerts, H., & Courtin, C. M. (2018). Impact of Preharvest Sprouting on Endogenous Hydrolases and Technological Quality of Wheat and Bread: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(3), 698-713.  
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12347>
- Organización de las Naciones Unidas (ONU). (2015). *Objetivos y metas de desarrollo sostenible*. Disponible en:  
<https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>

## BIBLIOGRAFÍA

- Ou, S., & Kwok, K. (2004). Ferulic acid: Pharmaceutical functions, preparation and applications in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(11), 1261-1269. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1873>
- P., N. P. V., & Joye, I. J. (2020). Dietary Fibre from Whole Grains and Their Benefits on Metabolic Health. *Nutrients*, 12(10), 3045. <https://doi.org/10.3390/nu12103045>
- Pandey, M., Shrestha, J., Subedi, S., & Shah, K. K. (2020). Role of nutrients in wheat: A review. *Tropical Agrobiodiversity*, 1(1), 18-23. <https://doi.org/10.26480/trab.01.2020.18.23>
- Paoletti, R., Bolego, C., Poli, A., & Cignarella, A. (2006). Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. *Vascular Health and Risk Management*, 2(2), 145-152. <https://doi.org/10.2147/vhrm.2006.2.2.145>
- Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O., Criqui, M., Fadl, Y. Y., Fortmann, S. P., Hong, Y., Myers, G. L., Rifai, N., Smith, S. C., Taubert, K., Tracy, R. P., & Vinicor, F. (2003). Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107(3), 499-511. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000052939.59093.45>
- Puri, V., Nagpal, M., Singh, I., Singh, M., Dhingra, G. A., Huanbutta, K., Dheer, D., Sharma, A., & Sangnim, T. (2022). A Comprehensive Review on Nutraceuticals:

## BIBLIOGRAFÍA

- Therapy Support and Formulation Challenges. *Nutrients*, 14(21), 4637.  
<https://doi.org/10.3390/nu14214637>
- Radenkovs, V., Juhnevica-Radenkova, K., Górnas, P., & Seglina, D. (2018). Non-waste technology through the enzymatic hydrolysis of agro-industrial by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 64-76.  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.013>
- Radenkovs, V., Juhnevica-Radenkova, K., Kviesis, J., Lazdina, D., Valdovska, A., Vallejo, F., & Lacis, G. (2021). Lignocellulose-Degrading Enzymes: A Biotechnology Platform for Ferulic Acid Production from Agro-Industrial Side Streams. *Foods*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/foods10123056>
- Rahman, M. N., Barua, N., Tin, M. C. F., Dharmaratne, P., Wong, S. H., & Ip, M. (2024). The use of probiotics and prebiotics in decolonizing pathogenic bacteria from the gut; a systematic review and meta-analysis of clinical outcomes. *Gut Microbes*, 16(1), 2356279. <https://doi.org/10.1080/19490976.2024.2356279>
- Redaelli, R., & Berardo, N. (2007). Prediction of fibre components in oat hulls by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(4), 580-585. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2709>
- Reglamento (CE) N.º 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (2006). Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2006/404/L00009-00025.pdf>

## BIBLIOGRAFÍA

- Reglamento (UE) N° 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños (2012). Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2012/136/L00001-00040.pdf>
- Reque, P. M., & Brandelli, A. (2021). Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022>
- Reynolds, A., Mann, J., Cummings, J., Winter, N., Mete, E., & Te Morenga, L. (2019). Carbohydrate quality and human health: A series of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet*, 393(10170), 434-445. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31809-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31809-9)
- Reynolds, A. N., Akerman, A. P., & Mann, J. (2020). Dietary fibre and whole grains in diabetes management: Systematic review and meta-analyses. *PLOS Medicine*, 17(3), e1003053. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003053>
- Ribas-Agustí, A., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., & Elez-Martínez, P. (2018). Food processing strategies to enhance phenolic compounds bioaccessibility and bioavailability in plant-based foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(15), 2531-2548. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1331200>

## BIBLIOGRAFÍA

- Rico, D., & Martín-Diana, A. B. (2023). Nutraceuticos y alimentos funcionales aliados para la salud: La necesidad de un diseño “a medida”. *Nutrición Clínica en Medicina*, 17(2), 103-118. <https://doi.org/10.7400/NCM.2023.17.2.5121>
- Roberfroid, M. B. (2000). Prebiotics and probiotics: Are they functional foods? *The American Journal of Clinical Nutrition*, 71(6), 1682S-1687S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/71.6.1682S>
- Roche, A., Ross, E., Walsh, N., O'Donnell, K., Williams, A., Klapp, M., Fullard, N., & Edelstein, S. (2017). Representative literature on the phytonutrients category: Phenolic acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(6), 1089-1096. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.865589>
- Rosa, N. N., Dufour, C., Lullien-Pellerin, V., & Micard, V. (2013). Exposure or release of ferulic acid from wheat aleurone: Impact on its antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 141(3), 2355-2362. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.132>
- Saha, D., Khataniar, A., Singh, A. K., & Jha, A. N. (2023). Review of Methods for Encapsulation of Nutraceutical Compounds. En *Nutraceuticals: Sources, processing methods, properties, and applications* (pp. 127-156). Elsevier.
- Santini, A., Cammarata, S. M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore, G. C., Pani, L., & Novellino, E. (2018). Nutraceuticals: Opening the debate for a regulatory framework. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(4), 659-672. <https://doi.org/10.1111/bcp.13496>

## BIBLIOGRAFÍA

- Schmidt, M. (2022). Cereal beta-glucans: An underutilized health endorsing food ingredient. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(12), 3281-3300.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1864619>
- Sharma, N., & Sarwat, M. (2022). Functional foods for better health and weight loss. *Annals of Phytomedicine*, 11(2), 114-121. <https://doi.org/10.54085/ap.2022.11.2.12>
- Shen, X., Zhao, T., Zhou, Y., Shi, X., Zou, Y., & Zhao, G. (2016). Effect of Oat  $\beta$ -Glucan Intake on Glycaemic Control and Insulin Sensitivity of Diabetic Patients: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 8(1), 39.  
<https://doi.org/10.3390/nu8010039>
- Shoukat, M., & Sorrentino, A. (2021). Cereal  $\beta$ -glucan: A promising prebiotic polysaccharide and its impact on the gut health. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(5), 2088-2097. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14971>
- Silva, F., & Sulaiman, A. (2022). Control of Enzymatic Browning in Strawberry, Apple, and Pear by Physical Food Preservation Methods: Comparing Ultrasound and High-Pressure Inactivation of Polyphenoloxidase. *Foods*, 11(13), 1942.  
<https://doi.org/10.3390/foods11131942>
- Sima, P., Vannucci, L., & Vetvicka, V. (2018).  $\beta$ -glucans and cholesterol (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 41(4), 1799-1808.  
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3411>

## BIBLIOGRAFÍA

- Tiwari, U., & Cummins, E. (2011). Meta-analysis of the effect of  $\beta$ -glucan intake on blood cholesterol and glucose levels. *Nutrition*, 27(10), 1008-1016.  
<https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.11.006>
- Tomé-Carneiro, J., González, M., Larrosa, M., Yáñez-Gascón, M. J., García-Almagro, F. J., Ruiz-Ros, J. A., García-Conesa, M. T., Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2012). One-Year Consumption of a Grape Nutraceutical Containing Resveratrol Improves the Inflammatory and Fibrinolytic Status of Patients in Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *The American Journal of Cardiology*, 110(3), 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.03.030>
- Tomé-Sánchez, I., Martín-Diana, A. B., Peñas, E., Bautista-Expósito, S., Frias, J., Rico, D., González-Maillo, L., & Martínez-Villaluenga, C. (2020). Soluble Phenolic Composition Tailored by Germination Conditions Accompany Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of Wheat. *Antioxidants*, 9(5), 426.  
<https://doi.org/10.3390/antiox9050426>
- Tomé-Sánchez, I., Martínez-Villaluenga, C., Martín-Diana, A. B., Rico, D., Jiménez-Pulido, I., Frias, J., & Dia, V. P. (2023). Antioxidant, Immunostimulatory, and Anticancer Properties of Hydrolyzed Wheat Bran Mediated through Macrophages Stimulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8), 7436.  
<https://doi.org/10.3390/ijms24087436>

## BIBLIOGRAFÍA

- Tontul, I., & Topuz, A. (2017). Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends in Food Science & Technology*, 63, 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.03.009>
- Tsiaka, T., Kritsi, E., Tsiantas, K., Christodoulou, P., Sinanoglou, V. J., & Zoumpoulakis, P. (2022). Design and Development of Novel Nutraceuticals: Current Trends and Methodologies. *Nutraceuticals*, 2(2), 71-90. <https://doi.org/10.3390/nutraceuticals2020006>
- Varzakas, T., Zakyntinos, G., & Verpoort, F. (2016). Plant Food Residues as a Source of Nutraceuticals and Functional Foods. *Foods*, 5(4), 88. <https://doi.org/10.3390/foods5040088>
- Walker, C., Gibney, E. R., Mathers, J. C., & Hellweg, S. (2019). Comparing environmental and personal health impacts of individual food choices. *Science of The Total Environment*, 685, 609-620. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.404>
- Willett, W., Rockström, J., Loken, B., Springmann, M., Lang, T., Vermeulen, S., Garnett, T., Tilman, D., DeClerck, F., Wood, A., Jonell, M., Clark, M., Gordon, L. J., Fanzo, J., Hawkes, C., Zurayk, R., Rivera, J. A., De Vries, W., Majele Sibanda, L., ... Murray, C. J. L. (2019). Food in the Anthropocene: The EAT–Lancet Commission on healthy diets from sustainable food systems. *Lancet*, 393(10170), 447-492. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31788-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31788-4)

## BIBLIOGRAFÍA

- Yeung, Y. T., Aziz, F., Guerrero-Castilla, A., & Arguelles, S. (2018). Signaling Pathways in Inflammation and Anti-inflammatory Therapies. *Current Pharmaceutical Design*, 24(14), 1449-1484. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180327165604>
- Yu, J., Xia, J., Yang, C., Pan, D., Xu, D., Sun, G., & Xia, H. (2022). Effects of Oat Beta-Glucan Intake on Lipid Profiles in Hypercholesterolemic Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*, 14(10), 2043. <https://doi.org/10.3390/nu14102043>
- Zabot, G. L., Schaefer Rodrigues, F., Polano Ody, L., Vinícius Tres, M., Herrera, E., Palacin, H., Córdova-Ramos, J. S., Best, I., & Olivera-Montenegro, L. (2022). Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers*, 14(19), 4194. <https://doi.org/10.3390/polym14194194>
- Zhai, Y., Wang, T., Fu, Y., Yu, T., Ding, Y., & Nie, H. (2023). Ferulic Acid: A Review of Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Effects on Pulmonary Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8011. <https://doi.org/10.3390/ijms24098011>
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2008). Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chemistry*, 109(4), 691-702. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.039>
- Zhao, Z., & Moghadasian, M. H. (2010). Bioavailability of hydroxycinnamates: A brief review of in vivo and in vitro studies. *Phytochemistry Reviews*, 9(1), 133-145. <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9145-5>

## BIBLIOGRAFÍA

Zhu, Y., & Sang, S. (2017). Phytochemicals in whole grain wheat and their health-promoting effects. *Molecular Nutrition & Food Research*, 61(7), 1600852.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201600852>

ANEXOS



## 7. ANEXOS

### 7.1. PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

- Efecto varietal en el proceso de valorización de salvados de trigo para el desarrollo de ingredientes nutraceúticos.

Jiménez-Pulido IJ, Rico D, Pérez-Jiménez J, de Luis D, Martínez-Villaluenga C, Martín-Diana AB.

Póster en las XXVI Jornadas Internacionales de Nutrición Práctica y XV Congreso Internacional de SEDCA (2022).

- Effect of high hydrostatic pressure (HPP) and temperature on the antioxidant activity of wheat and oat bran ingredients.

Jiménez-Pulido, I.J., Rico, D., de Luis, D., Martínez-Villaluenga, C. and Martín-Diana, A.B.

Póster para 36th EFFoST International Conference 2022.

- Germination as a green biotechnological process to enhance the nutritional and bioactive profile of oat grains.

Jiménez-Pulido, I.J., Rico, D., Pérez-Jiménez J., de Luis, D., Peñas, E., Martínez-Villaluenga, C. and Martín-Diana, A.B.

Póster para 36th EFFoST International Conference 2022.

### 7.2. OTRAS PUBLICACIONES

- Tomé-Sánchez, I.; Martín-Diana, A.B.; Peñas, E.; Frías, J.; Rico, D.; Jiménez-Pulido, I.; Martínez-Villaluenga, C. Bioprocessed Wheat Ingredients: Characterization, Bioaccessibility of Phenolic Compounds, and Bioactivity During in vitro Digestion. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 790898, <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.790898>.

- Martín-Diana, A.B., Blanco Espeso, B., Jimenez Pulido, I.J., Acebes Martínez, P.J., Rico, D. Twin-Screw Extrusion as Hydrothermal Technology for the Development of Gluten-Free Teff Flours: Effect on Antioxidant, Glycaemic Index and Techno-Functional Properties. *Foods* **2022**, *11*, 3610, <https://doi.org/10.3390/foods11223610>.
- Tomé-Sánchez, I.; Martínez-Villaluenga, C.; Martín-Diana, A.B.; Rico, D.; Jiménez-Pulido, I.; Frias, J.; Dia, V.P. Antioxidant, Immunostimulatory, and Anticancer Properties of Hydrolyzed Wheat Bran Mediated through Macrophages Stimulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 7436, <https://doi.org/10.3390/ijms24087436>.