

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DOS
ALIMENTOS

Caroline Sefrin Speroni

**FRACIONAMENTO GRANULOMÉTRICO E MICRONIZAÇÃO COMO
ESTRATÉGIA PARA AGREGAÇÃO DE VALOR AO BAGAÇO DE
OLIVA: COMPOSTOS BIOATIVOS E BIOACCESSIBILIDADE**

Santa Maria, RS.
2019

Caroline Sefrin Speroni

**FRACIONAMENTO GRANULOMÉTRICO E MICRONIZAÇÃO COMO
ESTRATÉGIA PARA AGREGAÇÃO DE VALOR AO BAGAÇO DE OLIVA:
COMPOSTOS BIOATIVOS E BIOACESSIBILIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof^a Dr^a Tatiana Emanuelli
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Leila Picolli da Silva

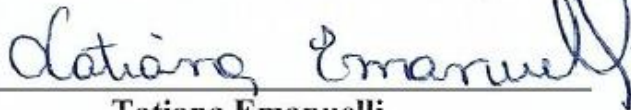
Santa Maria, RS
2019

Caroline Sefrin Speroni

**FRACIONAMENTO GRANULOMÉTRICO E MICRONIZAÇÃO COMO
ESTRATÉGIA PARA AGREGAÇÃO DE VALOR AO BAGAÇO DE OLIVA:
COMPOSTOS BIOATIVOS E BIOACESSIBILIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovada em 18 de setembro de 2019:



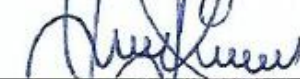
Tatiana Emanuelli
(Presidente/ Orientadora)



Aline de Oliveira Fogaça (UFN)



Juliano Smaniotto Barin (UFSM)



Leandro Machado de Carvalho (UFSM)



Wagner Luiz Priano (IFRS - Erechim)

Santa Maria, RS
2019

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antônio (*in memorian*) e Mara, e aos meus padrinhos, Valdemar (*in memorian*) e Theresinha, por serem incansáveis ao me ensinar os melhores valores e por sempre estarem presentes, apoiando-me em todas etapas.

AGRADECIMENTOS

À UFSM, instituição que nos acolhe e se torna nossa segunda casa. Gratidão pelas oportunidades de conhecimento ao longo de 11 anos nos espaços de convívio desta Universidade, desde o curso técnico ao doutorado. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da UFSM, pela oportunidade de ingressar nos cursos de mestrado e doutorado. Gratidão aos servidores e professores que tive o prazer de conviver e conhecer, os quais fazem parte da minha formação como ser humano e profissional. À CAPES, pela bolsa de estudos concedida, ao CNPq e à Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Sul pelo financiamento para a realização dos estudos.

À professora Tatiana Emanuelli, gratidão por todo suporte dado durante todo o período de doutorado, por todas as oportunidades que me proporcionou e pelo exemplo de pessoa e profissional dedicada. À professora Leila Picolli da Silva, por ter me acolhido em seu laboratório, pelos quase 10 anos de convívio, de muito aprendizado e experiências. Muito da minha formação hoje teve uma base sólida nestes anos de trabalho conjunto. À banca avaliadora deste trabalho, pelas valiosas contribuições.

Aos amigos e amigas do Laboratório de Piscicultura, Naglezi, Fernanda G., Bruno, Ana Betine, Karine, Silvino, Dirleise, Taida, Patrícia e Fernanda M. pelos momentos de convívio e aprendizado e muito auxílio nesta pesquisa, bem como os de descontração e alegrias, que não foram poucos. Meu carinho especial à Ana Betine, minha amiga de longa data, companheira para todos os momentos, por estar do meu lado sempre, por ter um coração tão nobre.

Aos amigos e amigas do Nidal, Sabrina Somacal, Daniela, Jessica, Júlia, Dariane, Roberson, Franciele, Camila, Luana, Andreia, Cristine, Lisiane, Aline, Erika, Sabrina M., Natália, Renata, Isabela e Gustavo meu carinho a vocês pelas ajudas, acolhimento e incentivo em tantos momentos. Gratidão à Jessica e à Daniela, que sempre foram incansáveis. Obrigada por alegrarem meus dias de trabalho. Gratidão também ao professor Cristiano Ballus pelo interesse no nosso trabalho e prontamente auxiliar sempre no que fosse necessário.

Ao NAPO, especialmente à professora Clarissa e à Bruna Kuhn por nos acolherem e emprestar seu espaço para o início dos estudos. Ao professor Danilo e Laboratório de Solos pelo empréstimo do granulômetro. Ao professor Fernando Morisso, do Laboratório de Estudos Avançados em Materiais, da Feevale, pela colaboração e empenho ao realizar as análises de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. À professora Rosana Goldbeck e equipe, pela colaboração com as análises de monossacarídeos.

Nossa gratidão à empresa Olivais da Fonte em especial ao Sr. Arno por sempre gentilmente nos receber em sua propriedade e nos conceder o bagaço de oliva para a execução deste trabalho. À empresa LNF pela concessão das enzimas para realização da análise de fibra alimentar.

Agradeço a meus pais, Antônio (*in memoriam*) e Mara, pelo amor incondicional, apoio nas minhas decisões, pelo carinho de sempre por serem nosso porto seguro. Sou grata por sempre terem nos mostrado que, com muita dedicação, um sonho pode ser concretizado. Às minhas irmãs, Katiane e Karine, minha gratidão por serem meu exemplo, como pessoas e profissionais dedicadas e competentes. Gratidão pelas nossas conversas, pelos momentos de descontração em família. Aos meus padrinhos, Valdemar (*in memoriam*) e Theresinha, minha sincera gratidão por tudo que me proporcionaram e proporcionam até hoje, por terem me acolhido como filha. Vocês são meu orgulho, meu exemplo e também minha força para seguir os obstáculos que vieram e virão. Gratidão ao meu padrinho por nos ensinar como ser uma pessoa de bom coração e um profissional exemplar. Jamais esquecerei a tua alegria no dia que fui aprovada no doutorado.

Ao meu noivo Róbson, minha eterna gratidão, por todos estes anos de convívio, pelos tantos ensinamentos e me fazer uma pessoa cada dia melhor e mais alegre. Obrigada pela paciência e compreensão nos momentos de ausência. pelos momentos ao teu lado, pela vida que conquistamos juntos até agora. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial e me incentivar.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se concretizasse, a minha sincera gratidão.

RESUMO

Tese de doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

FRACIONAMENTO GRANULOMÉTRICO E MICRONIZAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA AGREGAÇÃO DE VALOR AO BAGAÇO DE OLIVA: COMPOSTOS BIOATIVOS E BIOACESSIBILIDADE

AUTORA: CAROLINE SEFRIN SPERONI
ORIENTADORA: TATIANA EMANUELLI

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fracionamento granulométrico e da micronização do bagaço de oliva como estratégia para melhorar as propriedades funcionais e tecnológicas da fibra alimentar e a bioacessibilidade de polifenóis. O bagaço de oliva bruto foi separado em peneiras de 2 mm resultando em F1 (> 2 mm) e F2 (< 2 mm). As amostras foram desengorduradas e submetidas a planejamento fatorial para micronização, visando aumento do teor de polifenóis extraíveis (EPP), testando rotação e tempo de moagem. F1 apresentou maior teor de EPP usando 500 rpm/24,8 min e F2 na condição 500 rpm/16 minutos. Amostras micronizadas tiveram redução no tamanho médio de partícula, que passou para 30 μm . A micronização aumentou o teor de EPP (1,7 g 100 g⁻¹ para 2,0 g 100 g⁻¹) e HT para F1 e F2 (6,4 e 6,9 g 100 g⁻¹, respectivamente) com a consequente elevação da capacidade antioxidante. Outro planejamento experimental utilizando micronização em tempos prolongados foi conduzido, visando a redução da razão IDF/SDF. A menor razão encontrada para ambas as amostras (F1 e F2) foi de 300 rpm/5 horas. Este tratamento com tempo prolongado reduziu o tamanho médio de partícula para 17.8 e 15.6 μm para F1 e F2, respectivamente. Além disso, o teor de fibra alimentar foi modificado pela micronização, com aumento da fibra alimentar solúvel e redução da fração insolúvel. Houve uma redistribuição das frações de fibra alimentar, refletindo-se também em modificações nas propriedades tecnológicas e funcionais dos pós formados. Estas mesmas amostras foram submetidas a testes de digestibilidade *in vitro* visando avaliar o comportamento dos polifenóis durante a digestão salivar, gástrica e intestinal (frações disponível e indisponível para absorção). Compostos fenólicos foram liberados na fase salivar e a micronização aumentou o teor de compostos liberados nesta fase. Condições ácidas na fase gástrica simulada foram responsáveis pela maior liberação de compostos fenólicos de todas as etapas da digestão. A micronização de F1 aumentou a digestibilidade do hidroxitirosol. Oleuropeína, apigenina e luteolina passaram pelo processo de digestão intactos. A capacidade antioxidante ao longo da digestão foi superior para as amostras micronizadas nas etapas da digestão, devido a maior liberação dos compostos fenólicos comparado com as demais etapas da digestão. A micronização do bagaço de oliva resultou em modificações importantes na composição química e física dos produtos formados. Através deste estudo, conclui-se que o fracionamento granulométrico e a micronização são métodos eficientes para melhoria das características físico-químicas do bagaço de oliva, um subproduto que deve ser aproveitado por se destacar quanto ao teor de polifenóis e de fibra alimentar solúvel, podendo ser fonte destes compostos quando utilizado na nutrição humana e animal.

Palavras-chave: antioxidantes, azeite de oliva, fibra alimentar, moagem ultrafina, moinho de bolas, nutracêutico, subproduto, polifenóis da oliva.

ABSTRACT

Doctoral Thesis Graduate
Program on Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

GRANULOMETRIC FRACTIONATION AND MICRONIZATION AS A STRATEGY FOR AGGREGATION OF VALUE TO OLIVE POMACE: BIOACTIVE COMPOUNDS AND BIOACCESSIBILITY

AUTHOR: CAROLINE SEFRIN SPERONI
ADVISOR: TATIANA EMANUELLI

The objective of this study was to evaluate the effects of granulometric fractionation and micronization of olive pomace as a strategy to improve the functional and technological properties of dietary fiber and polyphenol bioaccessibility. Crude olive pomace was separated into 2 mm sieves resulting in F1 (> 2 mm) and F2 (< 2 mm). The micronized samples were defatted and a factorial design was conducted aiming to increase the extractable polyphenol (EPP) content, testing rotation and milling time. Thus, F1 presented higher EPP content using 500 rpm/24.8 min and F2 at 500 rpm/16 minutes. Micronized samples reduced the average particle size to 30 μm . Micronization increased the EPP (1.7 g 100 g⁻¹ to 2.0 g 100 g⁻¹) and hydrolysable tannins (6.4 and 6.9 g 100 g⁻¹, respectively) content in F1 and F2, with the consequent increase of antioxidant activity. Another experimental design using higher times of micronization was conducted aiming the reduction of IDF/SDF ratio. The lowest ratio was found after micronization at 300 rpm/5 hours for both samples (F1 and F2). This extended time treatment reduced the average particle size to 17.8 and 15.6 μm for F1 and F2, respectively. In addition, the dietary fiber content was modified, increasing the soluble dietary fiber and reducing the insoluble fraction. There was a redistribution of dietary fiber fractions, also reflecting changes in the technological and functional properties of the powders formed. These samples were submitted to *in vitro* digestibility assay to verify the bioaccessibility after salivary, gastric and intestinal digestion (absorbable and non-absorbable fractions). Phenolic compounds were released in the salivary phase and micronization was responsible for increasing the content of released compounds in this phase. Acid conditions in simulated gastric phase were responsible for the greatest release of phenolic compounds from all digestion stages. F1 micronization increased the digestibility of hydroxytyrosol. Oleuropein, apigenin and luteolin underwent the digestion process intact. Antioxidant capacity was higher for micronized samples in the digestion stages, due to the greater release of phenolic compounds. The use of olive pomace micronization yielded important changes in the chemical and physical composition of powder products. Through this study, it can be concluded that granulometric fractionation and micronization are efficient methods for improving the physicochemical characteristics of olive pomace, a by-product that should be used because of its polyphenol and soluble dietary fiber content, that can be a source of these compounds when used in human and animal nutrition.

Keywords: antioxidants, olive oil, dietary fiber, ultrafine grinding, ball mill, nutraceutical, byproduct, olive polyphenols.

LISTA DE ABREVIATURAS

3,4-DHPEA-EDA – descarboximetil oleuropeína aglicona
AAPH - dicloridrato de 2,2'-azobis (2-aminopropano)
ABTS - 2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico)
AF – fração intestinal absorvível
CEC – capacidade de ligação a cátions
CT – taninos condensados
DF – fibra alimentar
DM – matéria seca
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilidrazil
EPP – polifenóis extraíveis
F1 – fração granulométrica do bagaço de oliva > 2 mm
F1AG – fração granulométrica do bagaço de oliva (> 2 mm) após micronização
F2 – Fração granulométrica do bagaço de oliva < 2 mm
F2AG – fração granulométrica do bagaço de oliva (< 2 mm) após micronização
FTIR – espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
G – fração após digestão gástrica
HT – taninos hidrolisáveis
IDF – fibra alimentar insolúvel
LDL – colesterol de baixa densidade
NAF – fração intestinal não absorvível
NEPP – polifenóis não extraíveis
OHC – capacidade de retenção de óleo
OP – bagaço de oliva
PP – polifenóis
RID – digesta intestinal residual
S – fração após digestão salivar
SDF/fibra alimentar solúvel
SEM -(microscopia eletrônica de varredura
TDF – fibra alimentar total
TE – equivalentes de Trolox
U – amostra não digerida
WHC – capacidade de retenção de água

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 OLIVICULTURA	20
1.2 EXTRAÇÃO/PRODUÇÃO DO AZEITE DE OLIVA.....	23
1.3 BAGAÇO DE OLIVA.....	25
1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS	27
1.6 FIBRA ALIMENTAR	31
1.7 FRACIONAMENTO GRANULOMÉTRICO	33
1.8 MICRONIZAÇÃO	34
2. OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	39
3.1.1 Obtenção do bagaço de oliva.....	39
3.1.2 Fracionamento granulométrico.....	40
3.1.3 Micronização das frações do bagaço de oliva	40
3.2 ETAPA 1 - PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE OLIVA (F1, F2, F1AG E F2AG).....	42
3.2.1 Análises dos compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis	42
3.2.2 Análise do perfil de compostos fenólicos (HPLC)	42
3.2.3 Análise da capacidade antioxidante.....	43
3.2.4 Tamanho de partícula e microscopia eletrônica de varredura	43
3.2.5 Composição físico-química das amostras.....	44
3.3 ETAPA 2 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS (TECNOLÓGICAS) DO BAGAÇO DE OLIVA (F1, F2, F1AG E F2AG).....	44
3.3.1 Composição da fibra alimentar.....	44
3.3.2 Tamanho de partícula	45
3.3.3 Propriedades funcionais e tecnológicas	45
3.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) microscopia eletrônica de varredura (SEM)	46
3.4 ETAPA 3 - BIOACESSIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE OLIVA (F1, F2, F1AG E F2AG)	46
3.4.1 Método de digestão estática <i>in vitro</i>	46
3.4.2 Análise de UHPLC-MS dos compostos fenólicos e outros relacionados.....	47
3.4.3 Índices de bioacessibilidade, recuperação e índice de digesta intestinal residual	48
3.4.3 Análise da capacidade antioxidante.....	49
4 DESENVOLVIMENTO	51
4.1 MANUSCRITO 1:.....	51
MICRONIZATION AND GRANULOMETRIC FRACTIONATION IMPROVE POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF OLIVE POMACE	51
4.2 MANUSCRITO 2:.....	93
GRANULOMETRIC FRACTIONATION AND MICRONIZATION: A PROCESS FOR INCREASING SOLUBLE DIETARY FIBER CONTENT AND IMPROVING TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF OLIVE POMACE	93
4.3 MANUSCRITO 3:.....	117
MICRONIZATION INCREASES THE BIOACCESSIBILITY OF POLYPHENOLS FROM GRANULOMETRICALLY SEPARATED OLIVE POMACE FRACTION	117

5 DISCUSSÃO.....	143
6 CONCLUSÃO	149
REFERÊNCIAS	151

1 INTRODUÇÃO

O setor de olivicultura está em pleno desenvolvimento no Brasil. Os estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina mostram-se com amplo potencial para cultivo de oliveiras (COUTINHO et al., 2015). Bons resultados já estão sendo obtidos na olivicultura brasileira, com o crescimento anual de área de plantio e, conseqüentemente, o volume de azeite produzido. Segundo dados da FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database), a área cultivada e a quantidade de olivas colhidas no país no ano de 2017 foi aproximadamente o dobro do apresentado no ano de 2015 (FAOSTAT, 2019). Além disso, a cultura de oliveiras é responsável por impactos na economia das regiões, pois há geração de empregos sazonais de inverno, os quais complementam rendas familiares nos períodos em que outras culturas demandam menor trabalho (CEOLIN et al., 2008). As principais atividades que envolvem a produção de azeite de oliva são os processos de plantio, colheita, prensagem, decantação/filtração, envase e rotulagem do azeite.

O principal processo utilizado no Brasil para extração do azeite de oliva extravirgem é a centrifugação com utilizando o método bifásico. O rendimento do azeite extraído é dependente da variedade da planta, entretanto estima-se que a cada 100 kg de oliva colhida sejam produzidos de 80 a 95 kg de resíduo (SILVA, 2009; VALTA et al., 2015). A extração do azeite de oliva gera como resíduo uma fração pastosa com alto teor de umidade (aproximadamente 62%) e ainda lipídios de boa qualidade, denominada bagaço de oliva (SILVA, 2009). Embora a produção de azeite de oliva esteja sendo incentivada pelos órgãos governamentais, ainda não houve preocupação quanto ao resíduo gerado nesta atividade. Este subproduto é considerado um problema ambiental, devido à sua composição, pois apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (ROSELLÓ-SOTO et al., 2015). Desta forma, estratégias para utilização e/ou descarte adequado deste resíduo devem ser pesquisadas.

O bagaço de oliva, é rico em compostos de interesse na nutrição humana e animal, com propriedades antioxidantes e bioativas, como polifenóis e fibra alimentar. Dos compostos fenólicos da oliva, a maior parte (cerca de 98%) fica retida no bagaço e apenas uma pequena fração (cerca de 2% do total de compostos fenólicos) são lipossolúveis e migram para o azeite (RODIS et al., 2002). Tais componentes merecem destaque, por apresentar agregado valor nutricional, sendo associadas à prevenção de doenças (SHAHIDI, AMBIGAIPALAN, 2015). Contudo, majoritariamente, compostos fenólicos encontrados no bagaço de oliva são caracterizados como insolúveis (lignocelulósicos), os quais são estruturas rígidas associadas à parede celular (NACZK; SHAHIDI, 2004). A lignina é um composto fenólico caracterizado

por apresentar grande rigidez, insolubilidade e alto peso molecular, sendo de difícil absorção pelo intestino delgado (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Em face disso, a aplicação de processos de modificação do bagaço de oliva, com foco na melhoria da bioacessibilidade destes compostos fortemente ligados faz-se importante, por beneficiar as características nutricionais e aumentar a aplicabilidade.

Métodos de modificação química e estrutural de subprodutos agroindustriais que utilizam poucos recursos naturais e geram pouco ou nenhum resíduo vêm tendo destaque especial na etapa de processamento (CHEMAT et al., 2012). O fracionamento granulométrico é um método simples que já vem sendo utilizado na Europa para separação de caroços do bagaço de oliva, e as diferentes frações obtidas apresentam são destinadas ao uso como combustíveis domésticos e industriais (MANFREDINI & SCHIANCHI, 2019). Até então, foram elucidados poucos destinos com ênfase ao aproveitamento do bagaço de oliva e ainda assim há carência de estudos com a preocupação em aproveitar os compostos de interesse nutricional deste resíduo. Dessa forma, o fracionamento granulométrico pode ser uma alternativa viável de um processo limpo e simples de implementar, a fim de obter produtos com fins alimentícios ou nutracêuticos a partir do bagaço de oliva.

Além disso, a micronização é uma técnica que visa a redução do tamanho de partícula e pode causar a ruptura de moléculas poliméricas (RASENACK e MÜLLER, 2004) e vem sendo utilizada em resíduos agroindustriais como bagaço de uva (ZHU et al., 2014a). Através dessa tecnologia limpa, é possível, por meio de modificações na estrutura molecular, expor ou liberar compostos orgânicos de grande interesse, aumentando a bioacessibilidade destes, com o aumento da superfície de contato e alterações nas características químicas e físicas (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005; GONG et al., 2007). Desta forma, submeter o bagaço de oliva a diferentes processos limpos visando melhorias na composição e consequente aumento da aplicabilidade pode ser uma estratégia interessante. O fracionamento granulométrico e a micronização podem apresentar bons resultados para modificação das propriedades físico-químicas do bagaço de oliva. Alterações positivas na composição e características podem gerar um produto com finalidades nutracêuticas e que devem ser estudadas para potencializar sua utilização.

1.1 OLIVICULTURA

O cultivo de olivas é considerado uma prática milenar, na qual os países europeus, como Espanha, Grécia e Itália lideram no ranking do cultivo de olivas, sendo grande quantidade destinada à exportação (FAOSTAT, 2019). No ramo de importação, o Brasil foi o segundo maior importador mundial de azeite de oliva, perdendo apenas para os Estados Unidos, com a entrada de aproximadamente 76 mil toneladas do produto no país no ano de 2017 (OIC, 2019). Devido às apreciadas características sensoriais e ao conhecimento de que os polifenóis e ácidos graxos monoinsaturados presentes no azeite de oliva trazem à saúde, seu consumo vem aumentando a cada ano (COVAS et al., 2006). Conseqüentemente, a demanda de importação de azeite para o mercado brasileiro também aumenta. Tal fato impulsionou o investimento em olivicultura no Brasil, que possui regiões de clima propício ao manejo desta cultura comprovado, o que impulsionou sua exploração. O estado do Rio Grande do Sul, principalmente sua metade-sul, é atualmente o maior investidor no plantio de oliveiras e líder nacional no volume de azeite produzido, por apresentar condições edafoclimáticas favoráveis à prática da olivicultura (ALBA et al., 2014).

A oliveira (*Olea europaea L.*) é uma planta conhecida pela humanidade há aproximadamente 6000 anos, cujos primeiros relatos datam a idade do Bronze (3150 a 1200 a.C) (VOSSEN, 2007). Esta é uma árvore de porte médio, pertencente à família botânica *Oleaceae*, que se adapta ao clima mediterrâneo, pode viver até centenas de anos e permanece alguns anos para alcançar capacidade plena de produção ou até mesmo para inicia-la (RAMALHEIRO, 2009; VOSSEN, 2007). O cultivo desta planta é favorável entre as latitudes 30° e 45° de ambos os hemisférios, norte e sul (COUTINHO et al., 2015). Por isso, esta uma planta necessita de amplitude térmica durante o ano, para que ocorra a indução floral. Desta forma, para bons resultados de produção, são necessários invernos rigorosos e verões secos (OLIVEIRA et al., 2012). Pelas exigências climáticas para desenvolvimento da oliveira, o estado do Rio Grande do Sul vem apresentando bons resultados de produção no setor, sendo o maior produtor de azeite de oliva do Brasil. Somente neste estado, há 6,8 milhões de hectares mapeados com aptidão ao cultivo das oliveiras, demonstrando que essa atividade que já está em pleno crescimento deve avançar ainda mais nos próximos anos (FAOSTAT, 2019).



Figura 1- Árvore de oliveira em um pomar do Rio Grande do Sul.
Fonte: autoria pessoal.

Existem diversas cultivares de oliveiras e os frutos que geram podem se destinar ao consumo de mesa ou para produção de azeite, dependendo da quantidade de óleo que cada fruto possui e do volume de polpa apresentado (COUTINHO et al., 2009). Estima-se que aproximadamente 4% da produção mundial de oliva seja destinada para consumo de mesa e o restante seja cultivado para produção de azeite (GUILHERME, 2012). Além disso, uma única oliveira em fase adulta tem capacidade de produzir até 20 kg de frutos, que rendem de 5 a 6 kg de azeite (BLANCO, 2014). As principais variedades com potencial de cultivo e que estão sendo utilizadas para a produção de azeite no Rio Grande do Sul são: Arbequina, Arbosana, Koroneiki, Picual e Frantoio (TERAMOTO, 2010). As diferentes variedades caracterizam distintamente os azeites, principalmente quanto às propriedades organolépticas e composição físico-química dos produtos, como tamanho do fruto, quantidade de polifenóis e óleo (ORTEGA-GARCIA et al., 2008; VOSSEN, 2007).

A oliva é um fruto pequeno, com formato variável (elíptico a globular), composto de 60 a 90% da massa total de polpa e de 10 a 40% de caroço (CUSTÓDIO, 2009). Este fruto possui em torno de 50% de umidade, 1,6% de proteínas, 22% de lipídios, 19,1% de carboidratos, 1,5% de minerais e 1 a 3% de polifenóis (MANDARINO et al., 2005; JÚLIO, 2015; D'ANTUONO et al., 2018). As olivas são impróprias para o consumo *in natura*, devido à presença de oleuropeína e ligstrosídeo. Estas substâncias conferem sabor amargo à oliva, sendo necessários tratamentos para melhoria da palatabilidade. Com isso são feitos tratamentos com salmouras, substâncias de caráter básico e microrganismos fermentadores, a fim de promover a hidrólise

dos compostos e melhorar as características (D'ANTUONO et al., 2018). A oleuropeína é o principal composto fenólico presente na oliva, apresenta alta capacidade antioxidante e comprovados efeitos na prevenção de doenças, como o câncer (ORTEGA-GARCIA et al., 2008; SHAMSHOUM; VLAVCHESKI; TSIANI, 2017).

1.2 EXTRAÇÃO/PRODUÇÃO DO AZEITE DE OLIVA

Os cuidados para obter um azeite de qualidade já começam no momento da colheita dos frutos, evitando rupturas nas cascas e exposição da polpa. Após, os frutos devem imediatamente ser destinados ao lagar para a extração do azeite de oliva, a fim de evitar alterações indesejáveis na composição, ocasionadas pelo metabolismo vegetal. Para manutenção da qualidade do produto, as olivas devem ser processadas no período pós-colheita de 12 a 24 horas. Ao serem recebidas, as olivas passam por seleção e lavagem com água para a retirada de impurezas. A seleção é uma etapa muito importante para os parâmetros de qualidade do azeite obtido (VOSSEN, 2007). Após lavagem e separação, uma pasta de oliva é preparada, através dos processos de moagem e batidura para quebra celular e liberação da fração lipídica para o meio (separação do óleo).

A extração do óleo contido na pasta formada pode ocorrer através do uso de: prensa tradicional, filtração seletiva, denominados sistema contínuo e centrifugação (bifásica e trifásica), denominado sistema descontínuo (BOLANOS et al., 2004; VOSSEN, 2007). Após a separação das fases sólida e líquida, o óleo e a água são separados por decantação ou centrifugação. Em seguida, a fase oleosa (azeite) é armazenada para maturação do azeite e decantação de impurezas leves ou filtrada, antes do envase (UCEDA et al., 2006).

O sistema descontínuo de extração é o mais antigo e consiste no uso de prensas manuais ou hidráulicas, contudo ainda é utilizado nos lagares mais tradicionais. Este consiste no uso da pressão hidráulica para prensar uma massa de oliva através de discos de fibra, separando as frações líquidas (água e óleo) das sólidas (bagaço). Neste método, quando necessário, é adicionado água em uma pequena quantidade para facilitar a separação do óleo das demais fases. O processo de prensas é menos rentável e mais demorado do que os outros métodos, além de ser mais suscetível à oxidação. O mosto extraído é centrifugado ou deixado em repouso para separação das fases oleosa e aquosa por decantação. A baixa temperatura de extração do azeite eleva a qualidade do produto, em comparação a outros métodos. A desvantagem do uso de prensas é que frutos mais firmes são parcialmente rompidos, restando quantidades consideráveis de lipídios no resíduo final. Além disso, o processo é mais oneroso, por necessitar

de maior mão de obra (BORJA et al., 2002; AIRES, 2007; DERMECHE et al., 2013). A adição de pouca quantidade de água, diminui a quantidade de águas residuais a serem eliminadas. Essas águas são consideradas um problema ambiental grave, por apresentarem alta demanda bioquímica de oxigênio, necessitando de tratamento prévio ao descarte (DI GIOVACCHINO et al., 2002).

O sistema de extração contínuo consiste de dois métodos: centrifugação (decantação) bifásica e trifásica. Este método foi criado para substituir o sistema de prensas, sendo vantajoso, por aumentar a produtividade e reduzir o tempo de exposição da amostra, reduzindo as possíveis perdas de qualidade (BORJA et al., 2002). Neste, utilizam-se decantadores para separar as partes da oliva (sólidas e líquidas) por meio das diferenças de densidade entre os componentes. Em um sistema trifásico, é adicionada água morna para ajudar a separação por centrifugação, melhorando a fluidez da pasta ao longo do decantador. A desvantagem deste método é a eliminação de sabor e de compostos fenólicos devido a diluição em água (VOSSSEN, 2007). Além de perdas na qualidade do azeite, este método de extração acarreta na produção de maior volume de resíduo líquido, aumentando os problemas ambientais, pois a migração de substâncias fenólicas hidrofílicas faz este subproduto apresentar alto potencial poluidor (BENITEZ et al., 1997; ALBUQUERQUE et al., 2004; ROIG et al., 2006; DEMERCHE et al., 2013).

A fim de diminuir a quantidade de água utilizada no sistema trifásico, foi criado o sistema de extração bifásico, o qual utiliza pequenas quantidades de água, porém somente quando se constata baixa umidade na pasta para extração do óleo (BORJA et al., 2002). Como a quantidade de água é pequena, há preservação dos polifenóis no azeite. O óleo gerado neste sistema tem características diferenciadas, como aroma e sabor frutados característicos, sabores verdes acentuados, além de amargor e maior pungência (VOSSSEN, 2007). Após a centrifugação do mosto, apenas um tipo de resíduo é gerado, com uma consistência sólida, mas com alto teor umidade (cerca de 65 a 75%) e não mais é gerado um resíduo líquido e outro sólido como no sistema trifásico (DEMERCHE et al., 2013). Assim, há possibilidade de o resíduo ser reprocessado, a fim de extrair a fração lipídica resultante com o uso de solventes. Mesmo gerando resíduos com menor demanda bioquímica de oxigênio e serem mais fáceis de manejar, o aproveitamento deste resíduo ainda é um desafio. Os produtos que geram preocupação ao meio ambiente, como os compostos fenólicos e as gorduras, ainda estão presentes neste sistema, em concentrações consideráveis. Mesmo assim, o fato de adicionar pouca ou nenhuma quantidade de água, diminuindo o volume de águas residuais, faz este método ser o mais

vantajoso, também pela qualidade do azeite gerado (ROIG et al., 2006; KAPELLAKIS et al., 2008; DEMERCHE et al., 2013).

Posteriormente à etapa de extração do azeite de oliva, seja por prensagem ou centrifugação, o óleo é colocado em descanso por 1 a 3 meses para separar pequenas partículas sólidas e gotículas de água remanescentes no óleo, as quais podem afetar a qualidade do óleo, principalmente no sabor. Alguns azeites ainda são filtrados para remoção completa de resíduos indesejáveis. Após, o azeite é envasado em garrafas, rotulado e finalmente está pronto para comercialização (VOSSSEN, 2007).

As diferentes técnicas de extração utilizadas para a produção do azeite de oliva extravirgem acarretam em alterações na composição do produto final, já que algumas facilitam a passagem de alguns compostos de interesse, como os compostos fenólicos. Klen e Vodopivec (2012), realizaram um estudo que visava monitorar a influência do método de extração com a migração dos compostos fenólicos para o azeite. Comparando os três métodos, o estudo evidenciou que o sistema bifásico apresentou maior transferência de compostos fenólicos ao azeite, além de apresentar maior atividade antioxidante para este produto.

1.3 BAGAÇO DE OLIVA

O bagaço de oliva (Figura 2) compreende o resíduo sólido gerado a partir da extração do azeite de oliva, independentemente do método de extração utilizado. No sistema bifásico, 100 kg de oliva processada produzem em torno de 80 a 95 kg de bagaço (SILVA, 2009; VALTA et al., 2015). Em 2018, foram produzidos 58 mil litros de azeite de oliva extravirgem no Rio Grande do Sul, logo o volume estimado de bagaço de oliva produzido estava em torno de 350000 quilogramas do produto (RIO GRANDE DO SUL, 2019). Com o crescimento da olivicultura no Brasil, surge um agravamento de problemas ambientais ocasionados pelo descarte incorreto e/ou falta de aplicação deste resíduo. Atualmente, o destino que se tem dado a este co-produto, rico em compostos de grande interesse, é a compostagem, para posterior aplicação na adubação do solo. Além disso, algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de aproveitar este resíduo com vistas à geração de renda, seja extraíndo compostos, como os lipídios residuais, seja modificando a matriz para agregar valor (DAL BOSCO et al., 2012; OMAR et al., 2012). A utilização do bagaço de oliva apresentou resultados positivos na nutrição animal, como na aquicultura, ovinocultura e bovinocultura de leite (NASOPOULOU et al., 2011; ABBEDDOU et al., 2015; CASTELLANI et al., 2017). Na nutrição humana, poucos estudos foram realizados, a inclusão deste resíduo em biscoitos e massas tipo pasta.

Estes estudos mostraram um enriquecimento nutricional dos produtos, principalmente um incremento no teor de fibras e polifenóis, sem causar alterações nas propriedades organolépticas esperadas dos produtos (CONTERNO et al., 2019; SIMONATO et al., 2019).



Figura 2- Bagaço de oliva bruto.
Fonte: autoria pessoal.

Assim como o azeite, a composição do bagaço de oliva apresenta variações em relação aos diferentes cultivares, bem como às condições de cultivo e os métodos de extração utilizados (CARDOSO, 2010). Em estudo realizado por Julio (2015), a cada 100 g de bagaço de oliva obtém-se 11,5 g de lipídios, 8,9 g de proteínas e 4 g de cinzas. Quanto ao perfil lipídico, o bagaço de olivas produzidas no Brasil, quando fresco, contém ácidos graxos de grande interesse nutricional, tais como os ácidos oléico, linoléico e palmítico, que representam, respectivamente, cerca de 73, 10 e 12% do total de ácidos graxos identificados (CARDOSO, 2010; SILVA et al., 2012; URIBE et al., 2013).

Atenção especial deve ser dada à composição de fibra alimentar presente no bagaço de oliva. Foram quantificados 54,5 g/100 g de fibra alimentar total, sendo que 51,6 g/100 g encontra-se na fração insolúvel (JULIO, 2015). Os principais polissacarídeos fibrosos encontrados no bagaço de oliva são de origem pécica, hemicelulósica e celulolítica (DERMECHE et al., 2013). Desta forma, faz-se urgente estudos que avaliem o aproveitamento nutricional destes resíduos, pois a ingestão de fibra alimentar exerce propriedades benéficas ao organismo. Esta fração contribui com os efeitos fisiológicos do organismo humano, por melhorar o trânsito intestinal, reduzir o colesterol e a resposta glicêmica (MUDGIL; BARAK, 2013). O bagaço de oliva também possui uma composição de minerais interessante para nutrição humana e animal. Os principais minerais essenciais que podem ser encontrados no

bagaço fresco são potássio, magnésio, cálcio, ferro e sódio (URIBE et al., 2013; DERMECHE et al., 2013).

1.4 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são substâncias originadas do metabolismo secundário das plantas, os quais possuem estrutura química com, no mínimo, um anel aromático, podendo ter um ou mais substituintes nas hidroxilas. Estes são classificados de acordo com o número de anéis benzênicos e os ligantes. Os radicais que se associam às hidroxilas formam novas estruturas, desde simples até complexas, de alto peso molecular (NACZK; SHAHIDI, 2004; D'ARCHIVIO et al., 2007). Os tipos de ligantes classificam estas substâncias em diversos grupos, sendo os principais: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2004; SOUZA et al., 2007).

A principal fonte destes compostos é a dieta, particularmente o consumo de frutas e legumes, já que estes são responsáveis pela cor, aroma e adstringência dos alimentos naturais (ROLEIRA et al., 2015; ANGELO; JORGE, 2007). Os compostos fenólicos apresentam-se como moléculas de baixo peso molecular até aquelas com alto grau de polimerização (ANGELO; JORGE, 2007). Podem se apresentar na forma solúvel (livre) e insolúvel (complexados). Os compostos solúveis estão na forma livre ou conjugada e são facilmente liberados pelo tecido vegetal, pois a maioria destes compostos encontra-se no vacúolo da célula vegetal (BECKMAN, 2000). Dentre estes, encontram-se os ácidos fenólicos, as proantocianidinas e os flavonóides. A forma insolúvel está ligada à parede celular vegetal, geralmente apresentam-se em forma de polímeros e estão associados às moléculas de celulose, hemicelulose, lignina e pectina. Também reconhecidos como compostos associados à fibra alimentar, os principais são os taninos condensados e os hidrolisáveis e as ligninas (GOÑI et al., 2009; ARRANZ et al., 2010; MERCADO-MERCADO et al., 2015; ANGELO; JORGE, 2007).

Estes compostos, considerados nutracêuticos, possuem propriedades antioxidantes, contudo a habilidade em sequestrar radicais livres está relacionada com sua estrutura química. Como antioxidantes diretos ou primários, estes atuam através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres ou como quelantes de cátions metálicos, transformando-os em compostos mais estáveis e, conseqüentemente, menos reativos. A ação antioxidante indireta ou secundária ocorre através da indução da expressão de enzimas endógenas antioxidantes ou

modulação da resposta imunológica, retardando a etapa de iniciação da autoxidação. Muitos compostos fenólicos apresentam importante reação com o radical peróxido na etapa da autoxidação. Dessa forma, ocorre a proteção de moléculas biologicamente importantes, como DNA, proteínas e membranas lipídicas (RICE-EVANS et al. 1997; BALASUNDRAM et al., 2006; ANGELO; JORGE, 2007; STEVENSON; HURST, 2007; WANG et al., 2014). Devido a essas propriedades, os compostos fenólicos apresentam efeitos benéficos à saúde, prevenindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, osteoporose, diabetes e a oxidação do colesterol LDL (DILLARD; GERMAN, 2000; SCALBERT et al., 2005). É importante destacar que a ação antioxidante direta dos polifenóis não é responsável pela ação biológica sistêmica destes, uma vez que são encontrados níveis muito baixos nos tecidos e plasma para que ocorra este efeito. Ainda assim, os mecanismos de ação destes compostos ainda não foram totalmente elucidados. Por isso, sugere-se que os compostos fenólicos tenham efeitos preventivos nas condições inflamatórias de doenças crônicas, atuando no sistema por diversos mecanismos (CHEN et al., 2016).

Compostos fenólicos presentes no azeite de oliva têm demonstrado ser um dos responsáveis pelos diversos efeitos benéficos que o seu consumo prolongado apresenta. Os principais compostos fenólicos presentes no azeite de oliva são: oleuropeína, hidroxitirosol e tirosol. O hidroxitirosol é o principal composto encontrado no azeite de oliva e também permanece em grandes quantidades no resíduo (TUCK; HAYBALL, 2002; ARAÚJO et al., 2015). As principais classes de compostos fenólicos que podem ser encontrados nos resíduos de extração do azeite são: álcoois fenólicos (hidroxitirosol e tirosol), secoiridoides (oleuropeína aglicona e derivados), ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzoico (ácidos gálico, protocatecuico, vanílico e siríngico) e do ácido ácido hidroxicinâmico (ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico e sináptico). Além disso, ácido quínico é encontrado em grande quantidade, e flavonoides também estão presentes, mas em menores quantidades, sendo os principais luteolina e apigenina (ANGELO; JORGE, 2007; FRANCO et al., 2014; ARAÚJO et al., 2015). A composição fenólica presente no azeite de oliva apresenta elevada atividade antioxidante e estão associados à prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo como as cardiovasculares, degenerativas e câncer (ROLEIRA et al., 2015). O consumo desses polifenóis está associado à alta longevidade e à qualidade de vida associada à dieta do Mediterrâneo, a qual apresenta o azeite de oliva e outros alimentos de origem vegetal ricos em compostos fenólicos como base na alimentação (TUCK; HAYBALL, 2002).

A importância nutricional do azeite de oliva extravirgem tem sido associada ao seu conteúdo de polifenóis e ácidos graxos mono e poli-insaturados. Os polifenóis estão

relacionadas à prevenção de doenças, como o câncer e coronarianas, pois possuem elevada atividade antioxidante e anti-inflamatória (SERVILI et al., 2009; VISSERS et al., 2004). Na oliva, os compostos fenólicos apresentam-se tanto com características lipofílicas quanto hidrofílicas e estas características determinam a migração dos compostos para o azeite e/ou a permanência, ficando retidos no bagaço (BOSKOU, 2015). A cada 100 g deste coproduto seco há aproximadamente 3000 mg de ácido gálico, quantidade bastante superior a encontrada em resíduos de outras frutas que são considerados fontes de polifenóis, como acerola e maracujá (OLIVEIRA et al., 2009; URIBE et al., 2014).

1.4.1 Compostos fenólicos do bagaço de oliva

Os principais compostos fenólicos livres/extraíveis encontrados no bagaço de oliva bruto são os ácidos: protocatecuico, hidroxibenzóico, ρ -cumárico, vanílico e ferrúlico. Os principais compostos fenólicos ligados à matriz, encontrados, foram os ácidos: siríngico, protocatecuico, caféico, sinápico e rutina (ALU'DATT et al., 2010). Além disso, compostos característicos dos azeites de oliva também são encontrados no bagaço, como hidroxitirosol, oleuropein, apigenina, luteolina, pinosresinol e outros (DERMECHE et al., 2013; SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Além dos compostos fenólicos encontrados de forma livre nos tecidos vegetais, há aqueles que se apresentam na forma de polímeros, como os taninos e as ligninas (SOARES, 2002). No bagaço de oliva, estes compostos estão presentes em quantidade considerável, principalmente os polímeros lignocelulósicos, que compõem cerca de 60% deste coproduto (SILVA et al., 2012). A lignina é um composto fenólico de alta massa molecular (600 a 15000 kDa), composto por uma estrutura fenilpropanóide altamente ramificada. Os principais monômeros que compõem este polímero são os álcoois cumaril, coniferil e sinapil (KLEINERT; BARTH, 2008). Por serem de difícil absorção, os compostos lignocelulósicos reduzem as possíveis aplicações dos resíduos da oliva para a nutrição humana e animal. Uma alternativa para agregar valor a este coproduto é empregar processos que modifiquem a composição da matriz fibrosa e aumentem a biodisponibilidade desta fração de polifenóis ligados. Neste contexto, os métodos mecânicos, como a micronização são particularmente interessantes, pois não utilizam produtos químicos nem geram resíduos.

1.5 BIOACESSIBILIDADE DOS POLIFENÓIS

A bioacessibilidade é compreendida como a capacidade de os polifenóis serem liberados do alimento durante a digestão gastrointestinal e estarem mais suscetíveis, sendo que suas estruturas químicas estão mais aptas à penetração no epitélio e conseqüentemente, ocorrer a absorção intestinal (CARDOSO et al., 2015). Os compostos fenólicos ligados são pouco absorvidos pelo trato gastrointestinal, embora a taxa de absorção destes esteja relacionada as diversas estruturas químicas apresentadas e também às condições do meio no trato gastrointestinal (MANACH et al., 2005; TAGLIAZUCCHI et al., 2010). Durante a digestão, algumas alterações na estrutura química dos polifenóis podem ocorrer, seja por desordens metabólicas seja por condições fisiológicas e interações com o meio ao qual estão em contato. Estas modificações podem influenciar na bioacessibilidade dos compostos, como peso molecular, glicosilação e esterificações na molécula (AHMAD-QASEM et al., 2014; SCALBERT et al., 2005). Desta forma, a matriz alimentar pode influenciar bioacessibilidade dos fenóis, pois a quantidade liberada dentro da matriz irá influenciar a fração disponibilizada para absorção intestinal (ANGELINO et al., 2017). Além disso, a bioacessibilidade dos compostos fenólicos pode ser afetada por componentes alimentares comumente consumidos, como proteínas e ferro. Estas substâncias interagem com os polifenóis durante a digestão no lúmen e as proteínas podem formar fortes complexos de proteína-polifenol (ARGYRI et al., 2005; ISHII et al., 2008).

Os compostos fenólicos livres são mais facilmente absorvidos durante a digestão gastrointestinal, enquanto os compostos ligados são menos absorvidos, por estarem associados a uma matriz alimentícia complexa em suas formas intactas (MANACH et al., 2005). Assim, estima-se que a maioria destes (95%) não é absorvida, acumulando-se no cólon (CLIFFORD, 2004). Os compostos menos absorvidos, como as proantocianidinas ou taninos condensados, chegam ao cólon intactos e são metabolizados pela microbiota intestinal, mostrando potencial prebiótico, por aumentar a população de bactérias benéficas como *Lactobacillus* ou *Bifidobactérias*, servindo como substrato, e reduzir a população de microrganismos patogênicos (TZOUNIS et al., 2011). Além disso, estes compostos apresentam efeitos na mucosa intestinal, devido a produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais protegem a mucosa de inflamações e doenças intestinais (MANACH et al, 2005; MONAGAS et al., 2010; MOLINO et al., 2019).

Desta forma, modificações físicas, como a micronização, devem ser estudadas, principalmente em produtos ricos em compostos fenólicos livres e ligados, como o bagaço de oliva. As modificações na estrutura física da matéria podem expor os compostos ligados,

levando a uma maior bioacessibilidade destes e ao aproveitamento e agregação de valor a subprodutos, obtendo um produto com maior bioacessibilidade e bioatividade.

1.6 FIBRA ALIMENTAR

Segundo o Codex Alimentarius, “a fibra alimentar é constituída de polímeros de carboidratos com dez ou mais unidades monoméricas, que não são hidrolisados pelas enzimas endógenas no intestino delgado humano e que podem pertencer às seguintes categorias: polímeros de carboidratos comestíveis que ocorrem naturalmente nos alimentos na forma como são consumidos; polímeros de carboidratos obtidos de material cru por meio físico, químico ou enzimático e que tenham comprovado efeito fisiológico benéfico sobre a saúde humana, de acordo com evidências científicas propostas e aceitas por autoridades competentes; polímeros de carboidratos sintéticos que tenham comprovado efeito fisiológico benéfico sobre a saúde humana, de acordo com as evidências científicas propostas e aceitas por autoridades competentes” (CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

A fibra alimentar compreende compostos que fazem parte da estrutura celular vegetal, como ligninas, celuloses, hemiceluloses e pectinas, mucilagens e gomas, além de polissacarídeos e oligossacarídeos associados à matéria vegetal e que conferem rigidez à parede celular (CATALANI et al., 2003; CHAWLA; PATIL, 2010). Esta classe de carboidratos é resistente à ação das enzimas digestivas humanas, passando pelo intestino delgado inalterada, podendo ser completa ou parcialmente fermentada pela microbiota no intestino grosso (RODRIGUEZ et al., 2006; MUDGIL e BARAK, 2013). Além disso, a fibra alimentar é responsável por aumentar a saciedade após a refeição e diminuir a fome subsequente (WEICKERT; PFEIFFER, 2018). De acordo com a solubilidade em água, estes compostos podem ser classificados como solúveis ou insolúveis e cada uma destas frações exerce atividade fisiológica distinta no organismo (ESPOSITO et al., 2005; MIRA et al., 2009).

A fração solúvel da fibra é encontrada principalmente em leguminosas secas, aveia, cevada e frutas. Esta é composta por pectinas, gomas e mucilagens e algumas hemiceluloses solúveis, as quais são capazes de formar géis, aumentando a viscosidade da digesta e o tempo do trânsito intestinal (CATALANI et al., 2003). Dessa forma, a fração solúvel da fibra pode retardar ou dificultar a absorção dos carboidratos da dieta, devido aos géis formados (WEICKERT; PFEIFFER, 2018). Com esses efeitos, a fibra solúvel traz benefícios à saúde, atuando na redução do colesterol total e LDL, bem como redução da absorção de glicose pelo intestino delgado e consequente diminuição do risco de diabetes, obesidade e doenças

gastrointestinais, como o câncer de cólon (WEICKERT; PFEIFFER, 2008; VUKSAN et al., 2011). No intestino grosso, este tipo de fibra pode sofrer degradação ou fermentação pelas enzimas do trato gastrointestinal, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (ácidos butírico, acético e propiônico) (CATALANI et al, 2003). Esta fração de fibra apresenta maior atividade antioxidante do que a fração insolúvel (ESPOSITO et al, 2005). A fração insolúvel é encontrada em farelos, vegetais folhosos e grãos. Estas fontes são formadas por compostos insolúveis em água, presentes principalmente na parede celular das células vegetais, como as hemiceluloses insolúveis, celulosas e lignina (CAVALCANTI, 1997; ELLEUCH et al., 2011). Estes compostos são responsáveis pelo aumento do volume e peso fecal, pelo efeito da capacidade de retenção de água, contribuindo para um trânsito intestinal mais rápido (CATALANI, 2003). Esta fração de fibra sofre pouca ou nenhuma fermentação pela microbiota intestinal, mas promove o desenvolvimento da mucosa do íleo e do cólon (LÓPEZ et al., 1997; TUNGLAND; MEYER, 2002).

As frações de fibra alimentar solúvel e insolúvel apresentam características tecnológicas distintas. Estas características são importantes, pois definem a aplicabilidade de ingredientes ricos em fibras, formando produtos com boas características sensoriais. As propriedades de hidratação da fibra alimentar são dependentes da estrutura química do polissacarídeo, porosidade, tamanho de partícula, forma iônica, pH, entre outros. As propriedades de hidratação definem os níveis de fibra aconselháveis para inclusão em alimentos, sem afetar a textura desejável. A capacidade de retenção de óleo, também influenciada pelo tamanho de partícula e origem da fibra, é uma propriedade explorada para aumentar a retenção da gordura em produtos com elevado teor lipídico e emulsões, como os derivados cárneos (THEBAUDIN et al., 1997; ELLEUCH et al., 2011). A capacidade de ligação a cátions está relacionada à disponibilidade de minerais, pois esta avalia a habilidade da matriz fibrosa em ligar e reter íons na sua superfície (DAOU; ZHANG, 2012). Fibras com elevada capacidade de ligação catiônica podem prender, desestabilizar e desintegrar a emulsão lipídica e assim reduzir a difusão e absorção de lipídios, bem como de colesterol (CHAU et al., 2007). Desta forma, modificações físicas em resíduos agroindustriais vêm sendo estudadas. Estes mostram alterações na composição da fibra alimentar e melhorias nas propriedades tecnológicas dos subprodutos, tornando o uso mais viável em alimentos, e aproveitando os compostos que são de grande interesse para a manutenção da saúde, os quais tem origem do aproveitamento de resíduos (CHAU et al., 2006; ZHU et al., 2014b; 2015).

1.7 FRACIONAMENTO GRANULOMÉTRICO

Fracionamento granulométrico consiste na separação dos grânulos constituintes de uma amostra em pó úmida ou seca por tamanho geométrico, utilizando peneiras ou tamises com tamanho de malha conhecido. A separação de uma matriz em diferentes tamanhos de partícula causa modificações nas propriedades e características inerentes à amostra separada e, assim, novos produtos são obtidos (AHMED et al., 2016).

Geralmente, a separação granulométrica é utilizada para melhorar a uniformidade da amostra pulverizada. Matrizes vegetais apresentam diferentes tecidos em sua composição e, muitas vezes, tecidos mais rígidos são resistentes à quebra, deixando o pó com tamanhos de grânulos diferentes em toda sua composição. Desta forma, a minimização deste efeito da moagem e homogeneização do produto formado é realizada pelo fracionamento granulométrico (BECKER et al., 2017).

Com este fracionamento, a composição dos novos produtos pulverizados obtidos é modificada. Farinhas com diferentes granulometrias apresentaram diferenças no teor de carotenoides e foram observadas influências nos parâmetros de cor avaliados nas amostras (HIDALGO et al., 2014). Diferentes frações granulométricas de lentilhas vermelhas apresentaram modificações na composição centesimal, propriedades reológicas, térmicas e de pasta das farinhas obtidas (AHMED et al., 2017). Além disso, moagem seguida de separação granulométrica de feijão-caupi foram eficientes para formar farinhas com diferenças no teor de amido e com modificações nas propriedades térmicas e funcionais, como absorção de água, perda de sólidos e solubilidade proteica (KERR et al., 2000). Os teores das frações de fibra alimentar (solúvel e insolúvel) são concentrados no fracionamento a seco de aveia desengordurada, quando avaliadas algumas granulometrias, principalmente em torno de 300, 212 e 150 μm (DANIEL et al., 2006).

O teor de polifenóis também é influenciado pelo tamanho de partícula. Em estudo realizado com pós preparados de *H. pilosella*, o tamanho de partícula beneficiou a extração dos polifenóis e conseqüentemente aumentou a atividade antioxidante. Para esta fonte vegetal, os autores observaram que o peneiramento promoveu uma discriminação dos compostos bioativos, sendo estes concentrados em uma faixa de tamanho de partícula, como frações entre 180- 315 μm e 315– 500 μm (BECKER et al., 2017). A granulometria que apresenta maior teor de polifenóis varia conforme a espécie vegetal, devido à superfície de contato dos grânulos. Os compostos se distribuem conforme o tamanho de partícula, muitas vezes causando a

concentração destes em algumas frações (DELI et al., 2019). Por isso, separação granulométrica é uma alternativa viável para concentração de compostos de interesse de acordo com a granulometria, além de ser uma tecnologia limpa e que envolve poucos custos.

1.8 MICRONIZAÇÃO

Micronização é um método de moagem ultrafina, que acarreta na redução do tamanho de partícula para as grandezas micro e nano, sendo denominado de micronizado o material que contenha tamanho de partícula inferior a 100 μm (ZHAO et al., 2009). Existem diversos tipos de moinhos utilizados para a redução do tamanho de partículas de fármacos, alimentos e resíduos agroindustriais (RAO; TATTIYAKUL, 1999; CHAU et al., 2007). Estes equipamentos baseiam-se em diferentes princípios, como utilização de jato de ar, homogeneizadores envolvendo alta pressão ou moinhos de bolas (RASENACK e MÜLLER, 2004).

Um dos principais métodos de redução do tamanho de partículas é a moagem com bolas. Este princípio consiste em um recipiente fechado, formado por determinado material, contendo uma quantidade de amostra em contato com as bolas. Ao ser colocado no equipamento (moinho), o recipiente gira em torno de seu eixo e um disco gira na direção oposta, gerando força centrífuga. Esta força impulsiona o movimento das bolas, ocasionando, através das colisões, o atrito entre elas mesmas e com as paredes do frasco moedor. Desta forma, o atrito e o impacto da amostra com as bolas faz com que ocorra redução do tamanho das partículas (LOH et al., 2015; RAMACHANDRAIAH e CHIN, 2016). A eficácia para obtenção de menores tamanhos de partícula está associada às programações de tempo e frequência de rotação do frasco contendo amostra, sendo que geralmente maiores tempos acarretam em menores tamanhos de partícula, para moagem por bolas devido ao maior número de colisões e atrito (CHAU et al., 2007). A principal vantagem da utilização do moinho de bolas é o baixo custo do processo e a preservação do meio ambiente, devido à pouca ou nenhuma geração de resíduos (HE et al., 2014).

Outro método de moagem ultrafina é o que utiliza jato de ar. Este consiste na passagem de jatos de ar pressurizados dentro do recipiente contendo amostras e estes jatos fazem com que as partículas colidam entre si e/ou entrem em colapso com as superfícies sólidas, rompendo-se em tamanhos menores. As principais variáveis que podem ser alteradas para otimização da redução do tamanho de partícula são a taxa de alimentação de ar no frasco e a altura do frasco.

Este método também é eficaz para reduzir os tamanhos das partículas às grandezas de 1-10 μm (TUUNILA e NYSTRÖM, 1998; DRAKOS et al., 2017).

Os diferentes tipos de micronização em alimentos e resíduos agroindustriais acarretam em alterações na estrutura química da matéria prima, modificações na área de superficial, bem como nas propriedades físico-químicas e funcionais dos pós gerados (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005; GONG et al., 2007). Além disso, o processo de moagem ultrafina traz melhorias a outras propriedades importantes aos alimentos como aumento da solubilidade, aumento da dispersão do pó, melhoria na absorção, maior reatividade química e fluidez (WU et al., 2012; ZHU et al., 2015).

A micronização causa uma redistribuição nas frações de fibra insolúvel, tornando-as mais solúveis. Isso é devido ao aumento da área superficial, da porosidade e da atração capilar da fibra, além da solubilização de algumas proteínas e substâncias pécticas constituintes da parede celular (CHAU et al., 2007; WANG et al., 2009; HUANG et al., 2010). Além disso, este método tem potencial de melhorar a capacidade antioxidante, por exemplo, de casca de trigo mourisco e cevada descascada. Além disso, a micronização é capaz de aumentar a quantidade de compostos fenólicos totais da amostra, por alterar ou danificar a matriz fibrosa, levando à exposição ou liberação de alguns compostos que estavam fortemente ligados (ZHU et al., 2014b; 2015). A capacidade ligação da molécula de glicose pela estrutura da fibra alimentar também é aumentada pelo processo de micronização. Isso está associado com a redução da capacidade da fibra em se ligar às moléculas de água, devido a retenção da molécula da glicose nos sítios de ligação presentes na fração fibrosa, levando à diminuição da difusão das moléculas de glicose no meio reacional (CHAU et al., 2006).

O valor biológico de produtos que sofreram o processo de micronização também é melhorado. Em estudo realizado com hamsters, fibra de carambola micronizada aumentou a excreção e umidade das fezes, em comparação com a fibra não micronizada. Além disso, houve redução da concentração de amônia no ceco e queda da atividade de enzimas bacterianas colônicas (HUANG et al., 2008). Outro estudo realizado com casca de bucha vegetal (*Luffa cylindrical*) mostrou que a micronização aumentou a extração de compostos funcionais. Este efeito promoveu atividade anti-inflamatória de células do exsudato peritoneal, devido à inibição da IL-1 β , do TNF- α e da prostaglandina E₂ (CHOU et al., 2016). Poucos estudos avaliaram o efeito da micronização sobre a digestibilidade de resíduos agroindustriais e alimentos. Dessa forma, estudar o processo de digestibilidade *in vitro* e fermentação pela microbiota intestinal humana de diferentes frações gravimétricas (micronizadas ou não) do bagaço de oliva se faz

necessário, para observar em qual etapa do processo digestivo os principais compostos são aproveitados e se a micronização melhora o aproveitamento destes pelo organismo.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos do fracionamento granulométrico e da micronização do bagaço de oliva como estratégia para melhorar as propriedades funcionais e tecnológicas da fibra alimentar e a bioacessibilidade de polifenóis.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o efeito da separação granulométrica e micronização sobre o perfil de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do bagaço de oliva.
- Investigar o efeito da separação granulométrica e micronização sobre a composição físico-química e propriedades funcionais e tecnológicas do bagaço de oliva *in vitro*.
- Avaliar o efeito da separação granulométrica e micronização do bagaço de oliva sobre a bioacessibilidade dos compostos fenólicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo consistiu de três etapas, de acordo com os objetivos específicos demonstrados anteriormente. A primeira etapa consistiu na separação granulométrica do bagaço de oliva utilizando tamises de 2 mm, seguida de micronização (moinho de bolas) das frações peneiradas, utilizando tempos reduzidos de moagem (minutos). Além disso, nesta etapa foi realizada a otimização das condições de micronização das frações granulométricas, visando o aumento do conteúdo de polifenóis solúveis, e foi avaliada a composição físico-química e atividade antioxidante dos produtos formados. A partir dos dados obtidos neste estudo, gerou-se o Manuscrito 1, intitulado: “Micronização e fracionamento granulométrico melhoram o teor de polifenóis e capacidade antioxidante do bagaço de oliva”.

A segunda etapa consistiu na separação granulométrica do bagaço de oliva utilizando tamises de 2 mm, seguida de micronização (moinho de bolas) das frações peneiradas, utilizando tempos prolongados de moagem (horas). Nesta etapa também foi realizada a otimização das condições de micronização das frações granulométricas, visando o aumento da fração de fibra solúvel, monitorando-se a redução da relação IDF/SDF (fibra insolúvel/ fibra solúvel). Posteriormente à obtenção das condições ótimas de moagem, foram realizadas análises de composição da fibra (celulose, hemicelulose, lignina e açúcares neutros), além das propriedades tecnológicas e funcionais dos novos produtos. A partir dos dados obtidos neste estudo, gerou-se o Manuscrito 2, intitulado: “Fracionamento granulométrico e micronização: um processo para aumentar o teor de fibra alimentar solúvel e melhorar as propriedades funcionais e tecnológicas do bagaço de oliva”.

A terceira etapa consistiu em avaliar a digestibilidade *in vitro* das amostras, verificando impacto do tratamento físico (fracionamento granulométrico e micronização) sobre a bioacessibilidade dos compostos fenólicos em diferentes etapas da digestão (fase oral, gástrica, absorvida e não absorvida no duodeno). Os resultados obtidos neste estudo originaram o manuscrito intitulado: “Micronização aumenta a bioacessibilidade de polifenóis do bagaço de oliva granulometricamente separado.”

3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.1.1 Obtenção do bagaço de oliva

Bagaço de oliva (OP), cv. 'Arbequina', foi obtido de uma empresa extratora de azeite de oliva, localizada na cidade de Formigueiro, RS, Brasil (29 ° 59'01 " S; 53 ° 21 ' 50 " W). O azeite de oliva foi extraído pelo método de centrifugação bifásica e o resíduo OP obtido foi imediatamente armazenado a -18 ° C para continuidade do estudo e realização das análises.

3.1.2 Fracionamento granulométrico

Bagaço de oliva úmido bruto foi separado em uma peneira com malha de 2 mm. A fração retida na peneira (partículas > 2 mm) foi denominada Fração 1 (F1). A fração que passou pela peneira (partículas <2 mm) foi centrifugada (1774 x g / 10 min) para remover o conteúdo líquido excessivo. Então, o sedimento foi chamado de Fração 2 (F2). A fração líquida presente no sobrenadante será explorada em outros estudos. As frações F1 e F2 foram liofilizadas (TERRONI, modelo LS 3000, Brasil) e trituradas em moinho de martelo convencional (Marconi®, Brasil). Para aumentar a estabilidade das amostras, F1 e F2 foram desengorduradas com n-hexano (Goulart et al., 2013). O solvente orgânico foi filtrado e destilado para ser reutilizado. O n-hexano retido nas amostras F1 e F2 foi evaporado à temperatura ambiente para evitar a degradação térmica dos compostos de interesse.

3.1.3 Micronização das frações do bagaço de oliva

Para o primeiro estudo, as frações F1 e F2 desengorduradas foram pulverizadas em um moinho planetário de bolas de alto impacto (Retsch Co., Alemanha, modelo PM100) usando um recipiente de aço inoxidável (250 mL) com seis esferas de aço inoxidável (30mm diâmetro cada). A quantidade de amostra para cada ciclo de moagem (15 g) foi baseada na recomendação do fabricante e em testes piloto. Um planejamento fatorial 2² foi configurado para escolher as melhores condições de moagem e aprimorar o conteúdo de polifenóis extraíveis nas amostras F1 e F2. Um planejamento composto central foi usado para estimar a melhor condição de moagem para melhorar a extração de polifenóis livres nas frações do bagaço de oliva. A resposta, ou seja, o teor de compostos fenólicos totais foi avaliada pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2003). As variáveis estudadas no delineamento experimental para micronização foram velocidade de rotação (300, 400 e 500 rpm) e tempo de moagem (5, 15 e 25 min). O ponto central do projeto foi executado em triplicata, resultando no total de 11 experimentos para cada fração. A melhor condição de micronização para aumentar o valor de polifenóis extraíveis foi de 500 rpm/24,8 min para F1 e 500 rpm/ 16 min para F2 e obteve-se

duas novas amostras: F1 após a moagem (F1AG) e F2 após a moagem (F2AG). Assim, a caracterização físico-química deste estudo foi realizada em quatro amostras: F1, F2, F1AG e F2AG.

Para preparar os pós micronizados do segundo estudo, frações F1 e F2 desengorduradas foram submetidas a um moinho planetário de bolas (Retsch Co., Alemanha, modelo PM100) utilizando um recipiente de aço inoxidável de capacidade de 250 mL e seis esferas de aço inoxidável de 30 mm de diâmetro. Um lote de amostras de 15 g foi micronizado em cada execução, seguindo a recomendação do fabricante e os testes-piloto. A cada 10 min de moagem, o equipamento foi pausado 2 min para evitar o aumento da temperatura no interior frasco. Um palnejamento experimental foi usado para otimizar as condições de moagem e produzir a menor relação IDF/SDF (fibra solúvel/fibra insolúvel). Para que esta taxa seja diminuída, será selecionada a condição que apresentar maior teor de fibra solúvel. O teor de fibra alimentar foi avaliado pelo método enzimático-gravimétrico descrito por AOAC (1995) (número 991.43). Para este delineamento experimental, as variáveis estudadas foram velocidade de rotação (300, 400 e 500 rpm) e tempo de moagem (3, 4 e 5 h). A menor relação IDF/SDF foi obtida em 300 rpm/ 5 h tanto para F1 quanto F2 (Material Suplementar do Manuscrito 2). Então, duas novas amostras foram obtidas após a moagem nesta condição: F1AG e F2AG. Assim, cinco amostras foram analisadas neste estudo: OP (bagaço de oliva sem separação granulométrica), F1, F2, F1AG e F2AG.

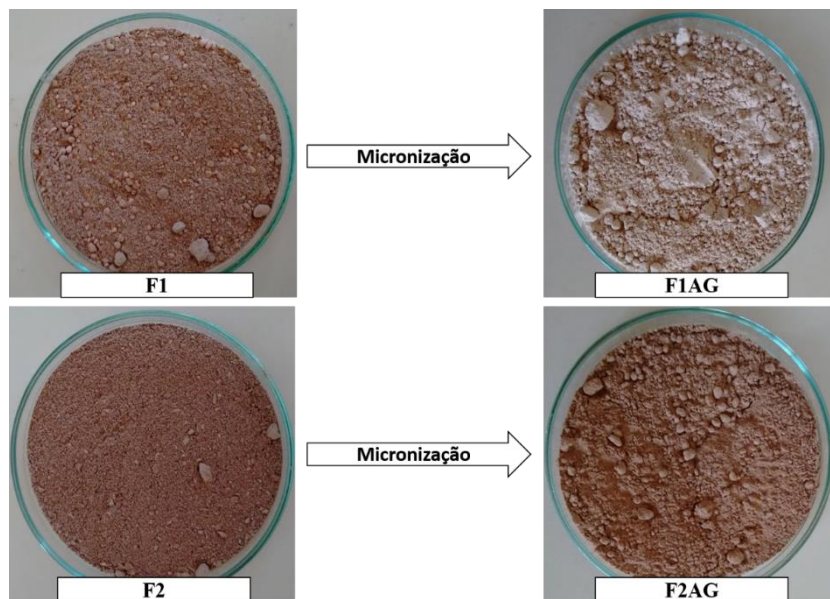


Figura 3- Amostras em pó obtidas após fracionamento granulométrico (F1 e F2) e micronização (F1AG e F2AG).

Fonte: autoria pessoal.

3.2 ETAPA 1 - PERFIL DE COMPOSTOS FENÓLICOS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO DO BAGAÇO DE OLIVA (F1, F2, F1AG E F2AG)

3.2.1 Análises dos compostos fenólicos extraíveis e não extraíveis

Para obter o extrato de polifenóis extraíveis (EPP), as amostras foram agitadas durante 1 hora com uma solução de metanol e água, protegidas da luz (50:50, v/v; pH 2). Após agitação, a mistura foi centrifugada a 1774 x g, 10 min e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, foi adicionada ao resíduo sólido uma solução de acetona e água (70:30, v/v) e novamente a mistura foi agitada por 1 hora e centrifugada a 1774 x g, 10 min também com proteção da luz. Os sobrenadantes metanólicos e acetônicos foram combinados para produzir o extrato de EPP (RUFINO et al., 2011). O rendimento do extrato de EPP foi de 40 mL por g de amostra. Para obter o extrato de taninos hidrolisáveis (HT), o resíduo sólido da extração de EPP foi incubado a 85 °C com metanol e ácido sulfúrico concentrado durante 20 h. A mistura foi centrifugada (1774 x g, 10 min), o resíduo sólido foi lavado duas vezes com água e todos os sobrenadantes foram combinados para produzir o extrato de HT (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2008a). Os taninos condensados (CT) foram liberados da matriz por incubação do resíduo da extração de EPP com solução de n-butanol e HCl (95:5, v/v) contendo FeCl₃, a 100 ° C durante 1 hora. Após a incubação, a mistura foi centrifugada (1774 × g, 10 min) para produzir o extrato CT (ZURITA et al., 2012). O teor de polifenóis nos extratos de EPP e HT foi medido utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (WATERHOUSE, 2003) e uma curva de calibração do ácido gálico foi conduzida junto com o ensaio. A absorbância dos extratos de CT foi medida em 450 e 555 nm e uma curva padrão de calibração obtida para alfarroba ($y = 0,0096x - 0,0005$) foi usada para determinar o conteúdo da CT (ZURITA et al., 2012).

3.2.2 Análise do perfil de compostos fenólicos (HPLC)

As amostras F1, F2, F1AG e F2AG foram extraídas com solução aquosa de metanol (75:25 v/v) como descrito por Lozano-Sánchez et al. (2011) para obter o extrato para análise de compostos fenólicos. O rendimento de extração foi de 4 mL por g de amostra. Os extratos foram filtrados (0,22 µm, PTFE) antes da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os compostos fenólicos foram quantificados em um sistema de HPLC (Shimadzu, Japão) equipado com bomba quaternária, desgaseificador, módulo de comunicação e coluna de forno.

O sistema foi acoplado a uma coluna de fase reversa Phenomenex Kinetex 5 μ EVO C18 100A (5 μ m; 4,6 \times 250 mm). A fase móvel foi um gradiente utilizando água acidificada (0,25% ácido acético, v / v) (fase móvel A) e metanol (fase móvel B). A eluição do gradiente foi ajustada como segue: 5% de B de 0 a 7 min; 35% B de 7 a 12 min; 45% B de 12 a 17 min; 50% de 17 a 22 min; 60% de 22 a 25 min; 95% de B de 25 a 27 min; e 5% de B de 27 a 37 min. A taxa de fluxo dos solventes foi de 0,6 mL/ min e o tempo total da corrida foi de 37 min a 25 °C. Um detector de fluorescência (RF) foi usado para detectar hidroxitirosol, oleuropeína e pinosinol (excitação a 280 nm, emissão a 339 nm). O detector de arranjo de diodos (DAD) foi usado para detectar luteolina e apigenina a 340 nm. O método utilizado para a quantificação dos polifenóis foi validado após a Conferência Internacional sobre Diretrizes de Harmonização (ICH, 2005).

3.2.3 Análise da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada nos extratos de EPP utilizando os ensaios DPPH, ABTS e ORAC. A remoção do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) foi monitorada (Brand-Williams et al., 1995) com trolox como padrão para a calibração curva. Os resultados foram expressos como a concentração da amostra (μ g de matéria seca/ mL) necessária para diminuir em 50% (EC_{50}) a absorção do DPPH.

O método ABTS é baseado na remoção do radical ABTS^{*} (2,2'-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), que é gerado pela oxidação de ABTS usando uma solução de persulfato. Os resultados foram expressos como EC_{50} para remoção de ABTS (Re et al., 1999).

ORAC mede a capacidade de eliminação de radicais peroxil de extratos antioxidantes como sua capacidade de inibir a perda de fluorescência da sonda causada pelo iniciado azo-radical AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-aminopropano)) (Ou et al., 2001). Os resultados foram expressos em μ mol equivalentes de Trolox por grama de amostra em base seca (μ mol TE/ g de matéria seca).

3.2.4 Tamanho de partícula e microscopia eletrônica de varredura

O tamanho de partícula foi medido utilizando um analisador de tamanho de partícula com difração a laser equipado com uma unidade de controle de sonicação (Beckman Coulter, modelo LS 13 230, Califórnia, EUA). As amostras foram adicionadas até atingir o ponto ótimo de obscuração e então as partículas do pó foram dispersas através de um tratamento de ultrassom por 1 minuto. O procedimento foi realizado em triplicata.

A microscopia eletrônica de varredura (SEM) foi realizada em um equipamento JEOL (modelo 6510 L V). As amostras foram metalizadas com uma fina camada de ouro e a micrografia foi obtida através de um feixe de elétrons de 10 kV. A morfologia das amostras foi avaliada em um estereomicroscópio (Karl Zeiss, modelo Stemi 508) acoplado ao software Zen 2 Blue Edition.

3.2.5 Composição físico-química das amostras

As amostras foram avaliadas para determinar as cinzas, proteína bruta (N x 6,25) e teor de fibra alimentar total (TDF), insolúvel (IDF) e solúvel (SDF) pelos métodos AOAC (1995). A gordura foi avaliada pela metodologia de Bligh e Dyer (1959). Celulose, hemicelulose e lignina foram avaliadas pelo método de Goering e Van Soest (1970). Os resultados foram expressos em grama do componente/ 100 g de amostra.

3.3 ETAPA 2 - COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E PROPRIEDADES FUNCIONAIS (TECNOLÓGICAS) DO BAGAÇO DE OLIVA (F1, F2, F1AG E F2AG)

3.3.1 Composição da fibra alimentar

As amostras foram avaliadas para determinar a composição da fração da fibra alimentar, ou seja, fibra alimentar total (TDF), fibra alimentar insolúvel (IDF), fibra alimentar solúvel (SDF), lignina, celulose e hemicelulose. Os teores de TDF, IDF e SDF foram obtidos pelo método enzimático-gravimétrico AOAC (número 991.43) (AOAC, 1995). O teor de celulose, hemicelulose e lignina foi avaliado conforme descrito por Goering e Van Soest (1970), conforme a solubilidade das amostras fibrosas em em detergente neutro e detergente ácido. Após o tratamento das amostras com detergente ácido, a lignina foi quantificada através de tratamento com H₂SO₄ a 72% (v/ v).

A composição em monossacarídeos nas frações do bagaço de oliva (glucose, xilose, arabinose, manose e galactose) foi determinada de acordo com o modo de Sluiter et al.(2008). Resumidamente, as amostras (0,3 g) foram hidrolisadas com H₂SO₄ a 72% (p/ v) a 30° C durante 60 min. Posteriormente, 84 mL de água destilada foram adicionados e as amostras foram hidrolisadas a 121 °C durante 60 min, e depois filtradas a vácuo. O filtrado resultante foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção amperométrica pulsada (HPLC-PAD) para análise de monossacarídeos liberados por cromatografia de troca aniônica. A separação foi realizada utilizando-se instrumento Dionex-DX500 (Sunnyvale, CA, EUA),

coluna CarboPac PA1 (4 mm x 250 mm) e coluna guarda CarboPac PA1 (4 mm x 50 mm), com gradiente linear de eluição com fase móvel A (NaOH 50 mM), fase móvel B (NaOAc 500 mM; NaOH 50 mM) e fase móvel C (H₂O). A concentração de cada monossacarídeo foi calculada a partir de curvas de calibração utilizando padrões adquiridos da Sigma-Aldrich. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de monossacarídeos nas amostras (p/p).

3.3.2 Tamanho de partícula

O tamanho de partícula foi avaliado usando um analisador de tamanho de partícula de difração de laser equipado com uma unidade de controle de sonicação (Beckman Coulter, modelo LS 13 230, Califórnia, EUA). As amostras foram adicionadas ao equipamento até que uma obscuridade ideal fosse alcançada no software. Posteriormente, os pós foram dispersos em meio aquoso e submetidos a um tratamento com ultra-som por 1 min dentro do equipamento antes da análise.

3.3.3 Propriedades funcionais e tecnológicas

A capacidade de retenção de água (WHC) (FEMENIA et al., 1997) e a capacidade de retenção de óleo (OHC) foram avaliadas pela exposição da amostra ao óleo de soja (densidade de 0,976 g mL⁻¹) ou água destilada por 24 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (2.000 x g, 15 min) e o sobrenadante (água ou óleo) foi descartado. As amostras foram processadas em triplicata e os resultados foram expressos como a quantidade de água ou óleo retidos (g g⁻¹ da amostra). A solubilidade foi avaliada por exposição da amostra (0,3 g) a água destilada, seguido por 1 h de agitação (CHAU et al., 2007). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas para separar frações sólidas e líquidas. O sobrenadante foi coletado em um frasco previamente pesado que foi então liofilizado e pesado novamente. Os resultados foram expressos como a porcentagem de amostra solúvel em água.

A densidade aparente foi medida seguindo a metodologia de Chau et al. (2007). As amostras em pó foram adicionadas em uma proveta de 10 mL previamente pesada. A proveta com amostra foi batida suavemente várias vezes para acomodação da amostra e diminuição do espaço intersticial, até que não fosse mais verificada diminuição do volume da amostra. Então, a proveta foi pesada novamente. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos como g de amostra a cada mL preenchido no frasco.

A capacidade de ligação de cátions (CEC) foi avaliada pela metodologia de McBurney (1983). As amostras foram incubadas em uma solução de CuSO_4 1 M por 1 h. Em seguida, a solução foi filtrada e o líquido filtrado foi descartado. Após, a amostra foi lavada três vezes com solução de HCl: propanol. A fração líquida resultante foi coletada em um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com a mesma solução. Uma alíquota de 5 mL desta solução foi retirada, o pH foi ajustado com uma solução de NH_4OH a 2 M e o líquido foi transferido para um balão volumétrico de 50 mL. A solução de Cuprizon foi adicionada e o volume foi completado com água destilada. Após 30 min, a absorbância foi verificada a 590 nm. O teor de cobre foi quantificado usando uma curva de calibração de 5 pontos de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. A análise foi realizada em triplicata e os resultados foram expressos em mg de Cu ligados por g de matéria seca.

3.3.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A análise por espectroscopia no infravermelho foi realizada usando um Perkin Elmer (modelo Spectrum Two) com refletância atenuada universal (UATR) com um cristal de diamante, disponível no Laboratório de Estudos Avançados de Materiais, localizado na Universidade Feevale. A análise foi feita considerando uma faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} . A resolução foi de 32 cm^{-1} e quatro varreduras foram realizadas para coletar cada espectro. As amostras não foram tratadas antes da análise.

Para análise de microscopia eletrônica de varredura (SEM), um equipamento JEOL (modelo 6510LV) foi utilizado para verificar o efeito da micronização na morfologia dos grânulos. As amostras foram tratadas com uma camada de ouro e as micrografias foram obtidas usando um feixe de elétrons de 10 kV. Um estereomicroscópio Karl Zeiss (modelo Stemi 508) acoplado ao software Zen 2 Blue Edition foi utilizado para avaliar a morfologia dos grânulos.

3.4 ETAPA 3 - BIOACESSIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DO BAGAÇO DE OLIVA (F1, F2, F1AG E F2AG)

3.4.1 Método de digestão estática *in vitro*

A digestão gastrointestinal estática simulada *in vitro* foi realizada conforme descrito por Minekus et al. (2014). O experimento sequencialmente simula todas as fases da digestão,

começando pela fase oral, seguida pelas fases gástrica e intestinal. Após a digestão intestinal, as amostras foram centrifugadas para separar a fração absorvível (AF), que compreende a fração solúvel disponível para absorção (bioacessível) e a fração não absorvível (NAF), que compreende a fração insolúvel, a qual não estará disponível para absorção e chegará intacta ao intestino grosso. Três séries independentes foram realizadas para cada amostra.

Para a digestão salivar (S), amostras de 5g (F1, F2, F1AG e F2AG) foram incubadas em 3,5 mL de uma solução salivar simulada (pH = 7), contendo 75 U/ mL de α -amilase (Sigma Aldrich, Brasil) e agitadas a 37°C por 2 min. Posteriormente, o pH do conteúdo digerido foi ajustado para aproximadamente 3 (usando HCl 1 M) e a fase gástrica (G) foi simulada pela adição de 7,5 mL de fluido gástrico simulado e pepsina (2500 U / mL) para um volume final de 20 mL, seguido de incubação a 37 °C sob agitação por 2 h. Após, para simular a etapa intestinal, o pH da mistura foi ajustado para pH 7, usando NaOH 1M, seguido pela adição de 11 mL de fluido intestinal simulado, 800 U / mL de solução de pancreatina e solução de sais biliares. O meio de incubação foi ajustado para 50 mL e as amostras incubadas a 37 °C por 2 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (1700 \times g, 10 min) para separar as frações de sobrenadante (AF) e resíduo sólido (NAF). As amostras foram armazenadas em nitrogênio líquido antes da análise de compostos fenólicos e capacidade antioxidante.

3.4.2 Análise de UHPLC-MS dos compostos fenólicos e outros relacionados

Os compostos fenólicos e outros compostos relacionados foram extraídos das frações do bagaço de oliva não digeridas e de amostras de todas as fases de digestão, utilizando uma solução de metanol:água (75:25 v / v), como descrito por Lozano-Sanchez et al. (2011). As amostras foram filtradas em filtros de PTFE (0,22 μ m) antes da injeção no sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC).

Os compostos fenólicos foram quantificados usando um Espectrômetro de Massas Shimadzu UHPLC triplo-quadrupolo (LCMS-8045; Japão). O UHPLC foi equipado com uma bomba binária, degaseificador, módulo de comunicação, forno para coluna e um injetor automático. As amostras foram injetadas (10 μ L) em uma coluna de fase reversa Shim-pack C-18 XR-ODS (2,2 μ m; 30 x 2 mm) a 25 °C. As fases móveis foram água acidificada com 0,25% de ácido acético (fase móvel A) e metanol (fase móvel B) e o fluxo foi mantido a 0,2 mL / min. O gradiente de eluição foi ajustado como se segue: 5% de B de 0 a 1 min; 35% de B de 1 a 2 min; 60% de B de 2 a 4 min; 95% de B de 4 a 5 min; 60% de B de 5 a 6 min; 20% de B para 6 a 6,5 min; e 5% de B de 6,5 a 7 min. O espectrômetro de massas triplo-quadrupolo foi utilizado

para quantificar os compostos fenólicos no modo de espectro MRM. O equipamento foi operado com uma Fonte de Ionização por Eletropulverização (ESI), com as seguintes condições: temperatura de interface de 300 °C, vazão de gás de aquecimento de 10 L/ min, vazão de gás de nebulização de 3 L/ min, vazão de gás de 10 L/ min tensão de interface de 3000 V.

As curvas de calibração foram construídas utilizando padrões comerciais de hidroxitirosol, oleuropeína, luteolina, apigenina e ácido cafeico (Sigma Aldrich, Brasil). Estes compostos foram quantificados nas amostras e os resultados foram expressos em mg de composto fenólico por 5 g de amostra. Os secoiridóides, tais como 3,4-DHPEA-EDA (descarboximetil oleuropeína aglicona) foram quantificados como equivalentes de oleuropeína.

3.4.3 Índices de bioacessibilidade, recuperação e índice de digesta intestinal residual

A bioacessibilidade foi obtida como a quantidade de compostos fenólicos nas amostras de fração absorvível (AF) em relação à quantidade de compostos fenólicos encontrados nas amostras não digeridas (U) multiplicadas por 100, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Bioacessibilidade} = \frac{\text{Polifenóis da fração absorvível}}{\text{Polifenóis da fração não digerida (U)}} \times 100$$

O índice de recuperação foi obtido como a porcentagem de compostos fenólicos encontrados no conteúdo total digerido (frações absorvíveis (AF) + não absorvíveis (NAF)) em relação às amostras não digeridas, de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice de recuperação} = \frac{(\text{AF} + \text{NAF})}{\text{Polifenóis da fração não digerida}} \times 100$$

O índice de digesta intestinal residual (RID) representa a quantidade de compostos fenólicos que não estarão disponíveis para absorção e atingirão o intestino grosso. O RID foi calculado como a porcentagem de compostos fenólicos na fração não absorvível (NAF) em relação às amostras não digeridas (U):

$$\text{Índice de digesta intestinal residual} = \frac{\text{NAF}}{\text{Polifenóis da fração não digerida}} \times 100$$

3.4.3 Análise da capacidade antioxidante

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) foi determinada conforme descrito por Ou et al. (2001). Este método mede a capacidade de eliminação de radicais peroxil dos extratos antioxidantes avaliados como sua capacidade de inibir a perda de fluorescência da fluoresceína causada pelo AAPH (dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)). Os resultados foram expressos como mmol equivalentes de trolox por 5 g de amostra.

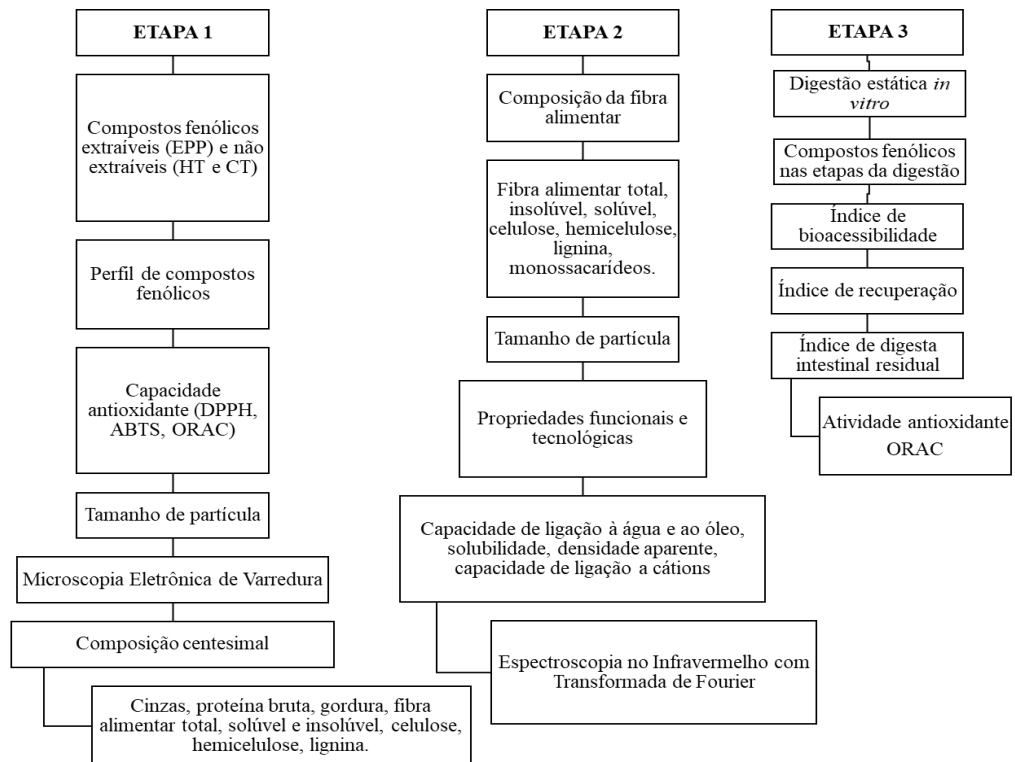


Figura 4- Fluxograma representativo das etapas e análises executadas em cada uma.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 MANUSCRITO 1:

MICRONIZATION AND GRANULOMETRIC FRACTIONATION IMPROVE
POLYPHENOL CONTENT AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF OLIVE POMACE

Manuscrito submetido ao periódico Industrial Crops and Products

Configurado de acordo com as normas exigidas pelo periódico

A versão publicada está disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669019303309>

Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace

Caroline Sefrin Speroni^a, Jessica Stiebe^a, Daniela Rigo Guerra^a, Ana Betine Beutinger Bender^a, Cristiano Augusto Ballus^a, Danilo Rheinheimer dos Santos^b, Fernando Dal Pont Morisso^c, Leila Picolli da Silva^d, Tatiana Emanuelli^a.

^aDepartment of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartment of Soil Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^cInstitute of Health Sciences, Feevale University, Vila Nova, 93510-330, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

^dDepartment of Animal Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding author. Tel: +55 55 3220 8596

E-mail address: tatiana.emanuelli@ufsm.br

Abstract

This study was aimed to evaluate the effect of micronization of granulometrically fractionated olive pomace (OP) on the content of extractable polyphenols (EPP), non-extractable polyphenols (NEPP) and its antioxidant capacity. Crude OP was separated in 2-mm sieve, resulting in two fractions: F1 (> 2 mm) and F2 (< 2 mm). F2 had higher content of ash, fat, soluble dietary fiber, EPP, hydrolysable tannins (HT) and condensed tannins (CT) than F1. F1 and F2 fractions were defatted and submitted to a micronization process using a factorial design 2^2 (variables: rotational speed and milling time) with EPP as response. The optimal micronizing conditions, 500 rpm/24.8 min for the F1 and 500 rpm/16 min for the F2, reduced particle size to ~30 μm . Micronization increased the content of EPP and HT in F1 and F2. Granulometric fractionation and micronization were effective to increase EPP content and antioxidant capacity of OP.

Keywords: agroindustrial waste; extractable polyphenols; non-extractable polyphenols; superfine grinding.

1 Introduction

Olive oil industry generates large amounts of olive pomace (OP) that contains high moisture content, pulp and stone fragments (Dermeche et al., 2013). OP disposal raises environmental concern as it has high biochemical oxygen demand (Roselló-Soto et al., 2015). Many studies have been conducted to reduce the environmental impact by finding an applicability for OP, including its use as an ingredient for functional foods intended for human and livestock nutrition (Conterno et al., 2019; Nasopoulou et al., 2011).

OP is rich in bioactive compounds, especially polyphenols (PP) of the phenolic alcohol group and dietary fiber (DF) (Dermeche et al., 2013). However, the major DF component in OP is lignin that has low biological value for human or animal nutrition (Bunzel et al., 2011; Souza et al., 2018). PP from vegetable sources can be divided into the extractable polyphenols (EPP) and the non-extractable polyphenols (NEPP) (Goñi et al., 2009). EPP are recognized to exert beneficial health effects by reducing the risk of cardiovascular disease, cancer and neurodegenerative disorders (Vauzour et al., 2010). NEPP are not soluble in the aqueous and organic solvents that are used for PP extraction and therefore are usually ignored in food composition studies. However, NEPP are the major amount of PP in diet and there is growing evidence that they are relevant dietary antioxidants that promote gastrointestinal health (Pérez-Jiménez et al., 2013). These compounds are associated to dietary fiber and comprise hydrolyzable tannins (HT) and condensed tannins (CT) (Arranz et al., 2009). NEPP, which are not absorbed in the stomach or small intestine, will reach the colon where they are metabolized by the gut microbiota (González-Sarrías et al., 2017; Pérez-Jiménez et al., 2013). The metabolites formed may have greater absorption rates than their parent compounds and may exert local antioxidant activity promoting gastrointestinal health (González-Sarrías et al., 2017; Pérez-Jiménez et al., 2013). However, OP studies have focused only in the EPP fraction, whereas the NEPP fraction has been neglected.

OP has been already investigated for agroindustrial application, use in animal feed, production of bioactive compounds, bioenergy and biofuels (Dermeche et al., 2013; Nasopoulou & Zabetakis, 2013). However, the disposal of OP remains a concern as many strategies for OP usage generate additional wastes or they are not economically viable (Guermazi et al., 2017; Pérez-Jiménez et al., 2015). Micronization or superfine grinding may be an alternative for the modification of agroindustrial wastes such as OP, aiming the integral usage of this residue. This is a particle size reduction method that can be considered eco-friendly because it generates little or no residues (He et al., 2014). Micronization can be achieved by

planetary ball milling that reduces particle size by generating friction (Ramachandriah & Chin, 2016); the time and rotational speed being key factors for obtaining microparticles (Chau et al., 2007). Micronization has been demonstrated to increase the extractability and antioxidant properties of bioactive compounds in agricultural wastes and food matrix such as cereals, fruits, vegetables and mushrooms (Liang et al., 2016; Ma et al., 2016; Wang et al., 2016; Drakos et al., 2017) but have not been applied to OP.

Micronization has been shown to release compounds that are strongly bound to the food matrix (Zhu et al., 2014a) therefore increasing the amount and antioxidant activity of EPP and modifying the dietary fiber fraction (Liang et al., 2016; Ma et al., 2016; Zhu et al., 2014a). However, the impact of micronization on the NEPP fraction has not been investigated. This study was aimed to evaluate the effect of micronization of granulometric fractions of OP on the content of EPP and NEPP and its antioxidant activity. Results will provide the basis for applying micronization as a tool to generate a functional feedstock from OP residue.

2 Material and Methods

2.1 Materials

OP, cv. 'Arbequina', was obtained from a mill located in the city of Formigueiro, RS, Brazil (29°59'01"S; 53°21'50"W). Olive oil was extracted by the biphasic centrifugation method and the OP residue obtained was immediately stored at -18°C for further assays.

2.2 Granulometric fractionation of OP

Crude wet OP was separated in a 2-mm sieve. The fraction retained in the sieve (particles > 2mm) was called Fraction 1 (F1). The fraction that passed through the sieve (particles < 2 mm) was centrifuged (1,774 x g/10 min) to remove excessive liquid content. Then, the sediment was called Fraction 2 (F2). The liquid supernatant fraction will be explored in another study. F1 and F2 fractions were freeze-dried (TERRONI, LS 3000 model, Brazil) and ground in a conventional laboratory mill (Marconi®, Brazil). To increase the stability of samples, F1 and F2 were defatted with n-hexane (Goulart et al., 2013). Organic solvent was filtered and distilled to be reused. The n-hexane trapped in F1 and F2 samples was evaporated at room temperature to avoid thermal degradation of compounds.

2.3 Obtaining the micronized fractions of OP

To obtain the micronized fractions of olive pomace, the defatted F1 and F2 fractions were pulverized in a high impact planetary ball mill (Retsch Co., Germany, PM100 model) using a stainless steel container (250 mL) with six stainless steel balls (30 mm diameter each). The amount of sample for each milling run (15 g) was based on the manufacturer's recommendation and on pilot tests.

A factorial design 2^2 was set up to choose the best grinding conditions to enhance the EPP content for F1 and F2. A central composite design was used to estimate the best milling condition for improving the extraction of EPP. The response of EPP was assessed by method of Folin-Ciocalteu reagent (Waterhouse, 2003). The variables studied in the experimental design for micronization were rotational speed (300, 400 and 500 rpm) and milling time (5, 15 and 25 min). The central point of design was run in triplicate yielding the total of 11 experiments for each fraction. The best micronizing condition for increasing EPP value was established for F1 and F2 and used to obtain two new samples: F1 after grinding (F1AG) and F2 after grinding (F2AG). Thus, the physicochemical characterization of this study was conducted in four samples: F1, F2, F1AG and F2AG.

2.4 Particle size analysis and scanning electron microscopy (SEM)

Particle size was measured with a laser diffraction particle size analyzer equipped with a sonication control unit (Beckman Coulter, LS 13 230 model, California, USA). Samples were added until reaching the optimal point of obscuration and thereafter, sample particles were dispersed by an ultrasound treatment. The procedure was performed in triplicate.

Scanning electron microscopy (SEM) was performed in a JEOL equipment (model 6510LV). Samples were metallized with a thin layer of gold and the micrography was obtained through electron beam of 10 kV. The morphology of samples was evaluated in a stereomicroscope (Karl Zeiss, Stemi 508 model) coupled to Zen 2 Blue Edition software.

2.5 Extractable (EPP) and non-extractable (NEPP) polyphenol analysis

To obtain the EPP extract, samples were shaken for 1 h with a methanol:water solution (50:50, v/v; pH 2) and then shaken for 1 h with acetone:water solution (70:30, v/v). The

methanolic and acetonitrilic supernatants were combined to yield the EPP extract (Rufino et al., 2011). The yield of EPP extract was 40 mL per g of sample.

To obtain the HT extract the residue of EPP extraction was incubated at 85°C with methanol and sulfuric acid for 20 h. The mixture was centrifuged (1,774 \times g, 10 min), the solid residue was washed two times with water and all supernatants were combined to yield the HT extract (Pérez-Jiménez et al., 2008a). CT were released from the matrix by incubating the residue of the EPP extraction with n-butanol:HCl (95:5, v/v) containing FeCl₃, at 100°C for 1 h. After incubation, the mixture was centrifuged (1,774 \times g, 10 min) to yield the CT extract (Zurita et al., 2012).

The content of polyphenols in the EPP and HT extracts were measured using Folin-Ciocalteu reagent (Waterhouse, 2003) and a calibration curve of gallic acid.

The absorbance of CT extracts were measured at 450 and 555 nm and a calibration curve obtained by carob-pod ($y = 0.0096x - 0.0005$) was used to determine the content of CT (Zurita et al., 2012).

2.6 Phenolic profile analysis

Samples F1, F2, F1AG and F2AG (see sections 2.2 and 2.3) were extracted with aqueous methanol solution (75:25 v/v) as described by Lozano-Sánchez et al. (2011) to obtain the extract for phenolic compound analysis. The extraction yield was 4 mL/g of sample. The extracts were filtered (0.22 μ m, PTFE) before high performance liquid chromatography (HPLC) analysis.

Phenolic compounds were quantified in a HPLC system (Shimadzu, Japan) equipped with quaternary pump, degasser, communication module and oven column. The system was coupled to a reverse phase column Phenomenex Kinetex 5 μ EVO C18 100A (5 μ m; 4.6 \times 250 mm). The mobile phase was a gradient method with water (0.25% acetic acid, v/v) (mobile phase A) and methanol (mobile phase B). The gradient elution was set as follows: 5% B from 0 to 7 min; 35% B from 7 to 12 min; 45% B from 12 to 17 min; 50% from 17 to 22 min; 60% B from 22 to 25 min; 95% B from 25 to 27 min; and 5% B from 27 to 37 min. The flow rate of solvents was 0.6 mL/min and the running time was 37 min at 25°C. A fluorescence detector was used to detect hydroxytyrosol, oleuropein and pinoresinol (excitation at 280 nm, emission at 339 nm). Photodiode array detector was used to detect luteolin and apigenin at 340 nm. The method used for the quantification of polyphenols was validated following the International Conference on Harmonization Guidelines (ICH, 2005) and data are shown in Table 1. Seven-

point standard curves were constructed for hydroxytyrosol, oleuropein, luteolin, apigenin and pinoresinol (Sigma-Aldrich, 99% purity).

Table 1. Validation data for the method of analysis and accuracy test of phenolic compounds by HPLC analysis in olive pomace fractions.

Phenolic compound	λ (nm)	RT (min) (n=3)	Linear range (mg L ⁻¹)	Regression equation	R ²	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	Repeatability (intra-day precision) CV (%)	Intermediate inter-day precision CV (%)
Hydroxytyrosol	*	12.12	2 – 14	y=2e-07x+0.45	0.993	0.2	0.5	3.23	3.79
Pinoresinol	*	24.71	0.2 – 3.8	y=8e-08x+0.01	0.997	0.9	1.9	2.19	3.42
Luteolin	340	29.57	3 – 27	y=7e-06x+0.61	0.991	1.1	2.2	4.16	4.97
Oleuropein	*	22.93	0.7 – 4.9	y=1e-06x-0.01	0.992	0.7	1.4	2.63	3.70
Apigenin	340	31.41	2 – 14	y=5e-06x+0.23	0.998	5.8	11.6	3.49	4.05
Accuracy									
Phenolic compounds	Average recovery level (%)**		low	Average recovery medium level (%)***		Average recovery high level (%)****			
Luteolin	89.1			104.4		112.8			
Apigenin	102.1			97.6		92.9			

*Compounds monitored by fluorescence detector (excitation at 280 nm and emission at 339 nm). ** The low level was fortified with 80% of the polyphenols present in the sample; *** The medium level was fortified with 100% of the polyphenols present in the sample; **** The high level was fortified with 120% of the polyphenols present in the sample.

2.7 Antioxidant capacity analysis

The antioxidant capacity was evaluated in the EPP extracts using the DPPH, ABTS and ORAC assays. The scavenging of DPPH radical (2,2-difenil-1-picrilidrazil) was monitored as previously described (Brand-Williams et al.,1995) with trolox as standard for the calibration curve. Results were expressed as the concentration of sample (μg of dry matter mL^{-1}) required to decrease by 50% (EC_{50}) the DPPH absorption.

The ABTS method is based in the removal of the $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), which is generated by the oxidation of ABTS using a persulfate solution. Results were expressed as the EC_{50} for ABTS removal (Re et al., 1999).

ORAC measures the peroxy radical scavenging capacity of antioxidant extracts as their capacity to inhibit the loss of probe fluorescence caused by AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride), the azo-radical initiator (Ou et al., 2001). Results were expressed in μmol equivalents of Trolox per g of sample in dry matter basis ($\mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ dm}$).

2.8 Proximate composition of OP fractions

Samples were evaluated to determine ash, crude protein ($\text{N} \times 6.25$) and total (TDF), insoluble (IDF) and soluble (SDF) dietary fiber content by AOAC (1995) methods. Fat was evaluated by the methodology of Bligh and Dyer (1959). Cellulose, hemicellulose and lignin were evaluated by the method of Goering and Van Soest (1970).

2.9 Statistical analysis

For validation of experimental design, data were submitted to analysis of variance (ANOVA) at 95% confidence level. The optimal milling condition (EPP response) was determined as previously described (Derringer & Suich, 1980). After obtaining the best milling condition, the new condition was tested in triplicate. Data obtained by experimental design were treated using the Design Expert 6.0.10 software.

Data on the physicochemical composition, polyphenols content and antioxidant capacity of samples (F1, F2, F1AG and F2AG) were analyzed by two-way ANOVA ($p < 0.05$). Post-hoc comparison of means was made using the Tukey's test. Data obtained for F1, F2, F1AG and F2AG were from 4 independent replicates of each type of sample.

3 Results and discussion

3.1 Experimental design for micronization

The responses of EPP content observed in the central composite design experiment are shown in Table 2. The content of EPP of F1 after grinding reached the highest value in experiments number 4 and 9 (1.70 and 1.68 g GAE 100 g⁻¹ of dm, respectively), where samples were micronized at 500 rpm for 25 min and at 541.4 rpm for 15 min, respectively.

Table 2. Experimental design for optimization of micronizing conditions with variables tested and obtained response (extractable polyphenols content, EPP).

	Variables			Response	
	Rotational speed (rpm)	Milling time (min)		EPP (g GAE 100 g ⁻¹ dm) ^b	
	(χ_1) ^a	(χ_2) ^a		After Grinding	
				F1	F2
1	-1	-1		1.32 ± 0.02	1.90 ± 0.04
2	1	-1		1.60 ± 0.03	2.05 ± 0.05
3	-1	1		1.41 ± 0.02	2.09 ± 0.00
4	1	1		1.70 ± 0.02	2.26 ± 0.01
5	0	0		1.56 ± 0.00	2.28 ± 0.10
6	0	0		1.50 ± 0.00	2.23 ± 0.03
7	0	0		1.52 ± 0.01	2.03 ± 0.01
8	-1.414	0		1.43 ± 0.10	2.07 ± 0.20
9	1.414	0		1.68 ± 0.01	2.51 ± 0.00
10	0	-1.414		1.33 ± 0.01	2.04 ± 0.09
11	0	1.414		1.58 ± 0.01	1.84 ± 0.08

^aCodified values: $\chi_1 = ([\text{rpm}] - 400)/100$; $\chi_2 = ([\text{time}] - 15)/10$; ^bResponses are mean ± standard deviation, in duplicate. GAE: equivalents of gallic acid; dm: dry matter; F1: Fraction 1 (particles > 2 mm) after superfine grinding; F2: Fraction 2 (particles < 2 mm) after superfine grinding.

For F2 after grinding, the highest values of EPP were found in experiments number 9 and 5 (2.51 and 2.28 g GAE 100 g⁻¹ of dm, respectively), where samples were micronized at 541.4 rpm for 15 min and at 400 rpm for 15 min, respectively. A quadratic regression model was selected for both samples (Table 3). The analysis of variance (95% of confidence) was significant but the model presented lack of fit for F1AG and F2AG (Table 3). Similar rotational speed (400 rpm) has been shown to be effective for increasing EPP content of mushroom (Wang et al., 2016) and celery stalk dried at 100°C (Ramachandriah & Chin, 2017) but the micronizing times used in these studies were much higher (1 to 24 h).

Table 3. ANOVA results of EPP response (g GAE 100 g⁻¹ of dm) for F1 and F2 after grinding (micronization).

Sample	Indicated model	Significant coefficients \pm standard error				Regression significance (p < 0.05)	Model fit > (p > 0.05)
		Intercept	A (rotational speed)	B (time)	B ²		
F1AG	Quadratic	1487.9 \pm 18.8	112.4 \pm 11.5	63.5 \pm 11.5	-34.0 \pm 13.7	< 0.0001	0.017
F2AG	Quadratic	2052.1 \pm 51.5	110.3 \pm 31.6	\pm -	-121.6 \pm 37.6	0.0038	0.020

F1AG: Fraction 1 (particles > 2 mm) after superfine grinding; F2AG: Fraction 2 (particles < 2 mm) after superfine grinding; GAE: gallic acid equivalent.

As the models presented lack of fit, the Derringer and Suich test was used to estimate the best milling condition (rotational speed and time) to maximize EPP extraction from the equations obtained for the quadratic regressions. The best condition for micronization of F1 was rotation at 500 rpm for 24.8 min, whereas for F2 the best micronizing condition was rotation at 500 rpm for 16 min (Table 4). To validate the best conditions for superfine grinding, the observed content of EPP was compared to the predicted value (Table 4). For F1AG, the predicted content of polyphenols was 1.65 g GAE 100 g⁻¹ and did not differ from the observed response (1.69 g GAE 100 g⁻¹). Similar results were obtained for the F2AG, as the predicted content of polyphenols after micronization was 2.12 g GAE 100 g⁻¹ and did not differ from the observed response (2.57 g GAE 100 g⁻¹). The micronized fractions obtained using these optimal conditions for increasing the content of EPP were chosen for further characterization of their polyphenol profile, morphological and antioxidant properties.

Table 4. Predicted and experimental values for EPP (g GAE 100 g⁻¹ of dry matter) observed after micronization

Variables and response	Desirability criteria for variable and responses	Predicted values (decoded)			Predicted responses (mean \pm SD, n=3)	Observed responses (mean \pm SD, n=3)
		Goal	Lower Limit	Upper Limit		
F1AG						
Rotational Speed (rpm)	Is in range	-1	1	1 (500)		
Time (min)	Is in range	-1	1	0.98 (24.8 min)		

Table 4 (continued)

EPP (g GAE 100 g⁻¹ dm)	Is maximum	1.28	1.67	-	1.65	1.69 ± 0.12
F2AG						
Rotational Speed (rpm)	Is in range	-1	1	1 (500)		
Time (min)	Is in range	-1	1	0.08 (15.8~16 min)		
<i>Response</i>						
EPP (g GAE 100 g⁻¹ dm)	Is maximum	1.68	2.36	-	2.21	2.57 ± 0.18

F1AG: Fraction 1 (particles > 2 mm) after superfine grinding (500 rpm/24.8 min); F2AG: Fraction 2 particles < 2 mm) after superfine grinding (500 rpm/16 min). EPP: extractable polyphenols; GAE: equivalents of gallic acid. Observed responses are mean ± standard deviation (n= 3).

3.2 Particle size analysis and scanning electronic microscopy (SEM)

The particle size distributions of OP fractions granulometrically separated and then submitted to micronization at the optimized conditions are shown in Figure 1. Granulometric fractionation resulted in two fractions that had different particle size distribution (Figure 1A). The average particle size of F1 ($317.2 \pm 15.2 \mu\text{m}$) was higher than F2 ($265.0 \pm 8.0 \mu\text{m}$). Micronization (Figure 1B) was effective to reduce the particle size of granulometric fractions of OP. The average particle size of F1 fraction was reduced by ~10 times after micronization ($31.1 \pm 0.6 \mu\text{m}$). Micronization was also effective to reduce the particle size of the OP fraction that had initial particle size lower than 2 mm (F2), which had its average particle size decreased by ~9 times ($30.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$). Thus, micronization reduced the average size of OP fractions and standardized the particle size to the nearest bands as no difference was observed in the particle size between F1AG (size ranged from 0.375 to 309.6 μm) and F2AG (size ranged from 0.07 to 309.6 μm).

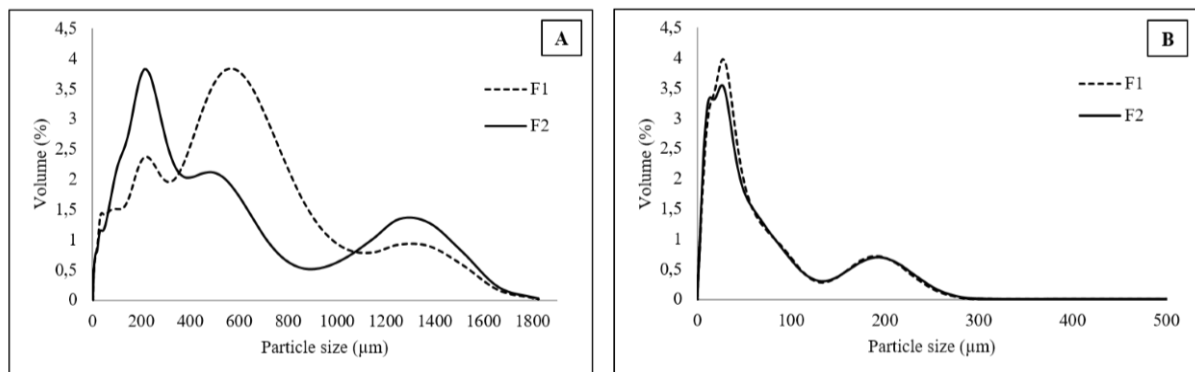


Figure 1. Effect of micronization on the particle size reduction of granulometrical fractions of olive pomace.

A: Fraction 1 (particles > 2 mm) and Fraction 2 (particles < 2 mm) before superfine grinding. B Fraction 1 and Fraction 2 after superfine grinding. Results were obtained in triplicate.

The particle size of DF extracted from carrot was reduced to the range of 10-302 μm by 16 h of micronization (Ma et al., 2016). Celery stalk (*Apium graveolens*) micronized during 24 h had particle size in the low μm range (Ramachandriah & Chin, 2017), close to those that we obtained for OP fractions. In our study, we have chosen to explore short milling times to avoid thermal degradation of polyphenols due to heating during prolonged friction in the ball milling. Moreover, reduced grinding times save energy and reduce production costs. F1 required longer milling time than F2 to achieve optimal polyphenol increase (Table 4). This probably occurred because F1 was mostly composed by olive stones that are firmer than particles found in the F2 fraction. Anyway, we succeeded to reduce the particle size of both OP fractions to the low micrometer range using very short milling times compared to the previous studies in other matrices, such as water caltrop pericarp and persimmon by-products, that used milling times ranging from 5 to 24 h (Ramachandriah & Chin, 2016; Wang et al., 2009).

Granulometric fractionation was effective to yield two products with distinctive morphologies, namely F1 and F2 (Figure 2, A and B). Micronization modified the morphological structure of F1 granules (Figure 2C). The superfine grinding was important to standardize the particle size and morphological appearance of F1. F2 had higher uniformity of granules than F1. The strong mechanical force in grinding process may contribute to microstructures in the food matrix (Zhao et al., 2018). F1 was submitted to higher mechanical strength due to longer milling time and lower uniformity in the initial sample.

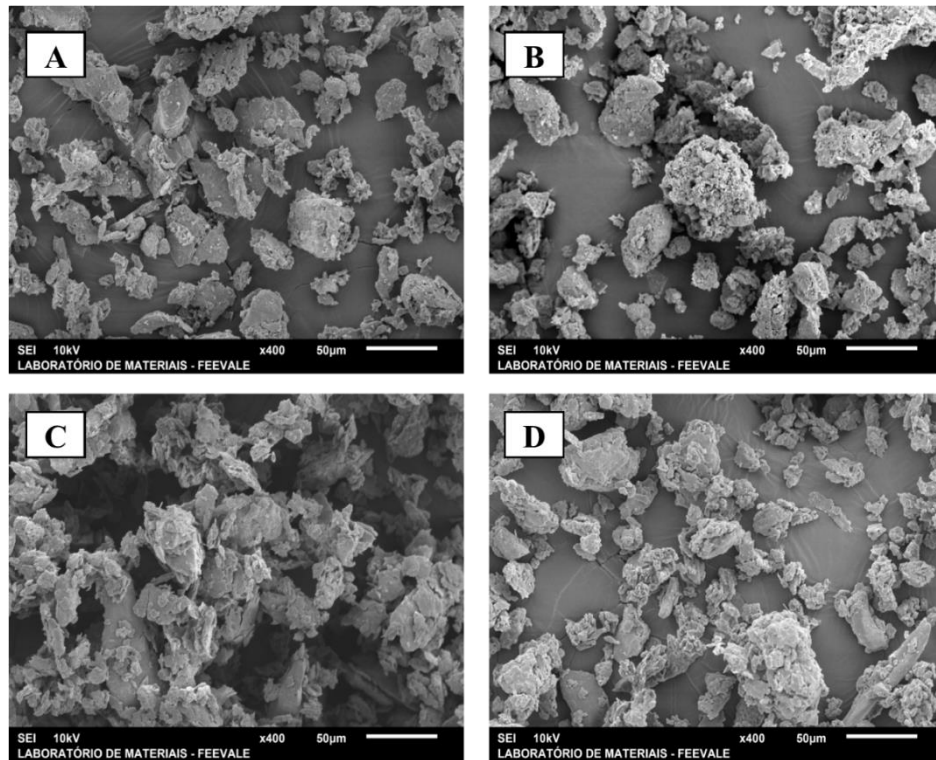


Figure 2. SEM images of granulometric and micronized fractions of olive pomace.

A: Fraction 1 (particles > 2 mm) before superfine grinding; B: Fraction 2 (particles < 2 mm) before superfine grinding; C: Fraction 1 after superfine grinding; D: Fraction 2 after superfine grinding.

3.3 Polyphenols

EPP from OP have high antioxidant potential and have been shown to inhibit lipid peroxidation and modulate the response of endothelial and hepatic cells to oxidative stress (Aliakbarian et al., 2012; Vergani et al., 2016). However, most studies consider only the EPP as antioxidant compounds and ignore the NEPP fraction (Pérez-Jiménez & Torres, 2011). NEPP are the major dietary source of polyphenols and have been shown to improve the antioxidant status in the colon promoting intestinal health (Pérez-Jiménez et al., 2013).

F2 that is composed by OP particles < 2 mm had higher EPP, HT and CT content than F1 that is composed by OP particles > 2 mm ($p < 0.05$; Table 4). Both F1 and F2 fractions had greater amount of NEPP (CT and HT) than EPP. While F2 had similar amounts of HT and CT, the F1 fraction was mostly composed by HT. Granulometric fractionation promoted an increase in the content of EPP in the F2 fraction compared to the F1 fraction ($p < 0.05$; Table 5). Micronization also promoted an increase in the EPP extraction ($p < 0.05$; Table 5). However, there was no interaction between granulometric fractionation and micronization. The EPP content found for all OP fractions was higher than values reported for fruits known as

antioxidant sources, such as açai pulp and apple (Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2015; Rufino et al., 2011). The EPP content of F2AG was similar to *Hibiscus sabdariffa L.* flower (Sáyago-Ayerdi et al., 2007). This effect is related to superfine grinding that modifies the structure of sample, mainly the DF, and release or expose the polyphenols linked to the fiber matrix (Zhu et al., 2014a). Thus, superfine grinding can contribute to produce EPP, increasing the bioaccessibility of these compounds (Rosa et al., 2013). IDF extracted from wheat bran and buckwheat hulls also exhibited increased EPP content after micronization (Zhu et al., 2010; Zhu et al., 2014b).

Table 5. Effect of granulometric fractionation and micronization on the extractable polyphenols (EPP), hydrolysable tannins (HT) and condensed tannins (CT) and phenolic profile in OP fractions.

	Granulometric fractionation	Micronization		Mean ± SEM
		Before grinding	After grinding	
EPP (g GAE 100 g⁻¹ dm)	F1	1.3 ± 0.0	1.7 ± 0.0	1.5 ± 0.1 ^b
	F2	2.2 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.1 ^a
	Mean ± SEM (n=8)	1.7 ± 0.2 ^B	2.0 ± 0.2 ^A	
HT (g GAE 100 g⁻¹ dm)	F1	4.7 ± 0.0 ^{b,B}	6.4 ± 0.1 ^{b,A}	5.5 ± 0.3
	F2	6.2 ± 0.2 ^{a,B}	6.9 ± 0.0 ^{a,A}	6.6 ± 0.2
	Mean ± SEM (n=8)	5.4 ± 0.3	6.7 ± 0.1	
CT (g CT 100 g⁻¹)	F1	2.8 ± 0.0 ^{b,A}	3.2 ± 0.0 ^{b,A}	3.0 ± 0.1
	F2	6.9 ± 0.2 ^{a,A}	6.3 ± 0.1 ^{a,B}	6.6 ± 0.2
	Mean ± SEM (n=8)	4.9 ± 0.8	4.8 ± 0.6	
<i>Phenolic Profile</i>				
Hydroxytyrosol (mg kg⁻¹ dm)	F1	212.5 ± 0.2 ^{b,B}	297.9 ± 16.7 ^{a,A}	255.2 ± 20.5
	F2	367.4 ± 19.7 ^{a,A}	118.2 ± 4.7 ^{b,B}	242.8 ± 56.5
	Mean ± SEM (n=6)	290.0 ± 35.8	208.1 ± 40.9	
Pinoresinol (mg kg⁻¹ dm)	F1	36.5 ± 1.2 ^{a,A}	9.9 ± 0.6 ^{b,B}	23.2 ± 6.0
	F2	27.1 ± 0.8 ^{b,A}	18.7 ± 0.5 ^{a,B}	22.9 ± 1.9
	Mean ± SEM (n=6)	31.8 ± 2.2	14.3 ± 2.0	
Luteolin (mg kg⁻¹ dm)	F1	37.2 ± 0.2 ^{b,A}	25.0 ± 0.5 ^{a,B}	31.1 ± 2.7
	F2	63.7 ± 2.0 ^{a,A}	23.7 ± 0.8 ^{a,B}	43.7 ± 9.0
	Mean ± SEM (n=8)	50.4 ± 6.0	24.4 ± 0.5	

Table 5 (continued)				
	Granulometric fractionation	Micronization		Mean \pm SEM
		Before grinding	After grinding	
Oleuropein (mg kg⁻¹ dm)	F1	nd	Nd	
	F2	nd	nd	
	Mean \pm SEM (n=8)			
Apigenin (mg kg⁻¹ dm)	F1	nd	Nd	
	F2	nd	Nd	
	Mean \pm SEM (n=8)			
<i>Effects</i>	ANOVA results (<i>p</i> -value)			
	Granulometric fractionation	Micronization	Granulometric fractionation x Micronization	
EPP	0.000	0.000	0.193	
HT	0.000	0.000	0.000	
CT	0.000	0.312	0.000	
Hydroxytyrosol	0.372	0.000	0.000	
Pinoresinol	0.727	0.000	0.000	
Luteolin	0.000	0.000	0.000	

Lower case indicate differences between granulometric frations and upper case letters indicate differences in the micronization process. F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm). EPP: extractable polyphenols; GAE: equivalents of gallic acid; HT: hydrolyzable tannins; CT: condensed tannins; Results are mean \pm standard error of mean (n= 4). LD: limit of detection; LQ: limit of quantification; nd: not detected.

HT and CT represent NEPP that are bound to the fiber fraction and are not solubilized during the conventional extraction procedures. Although the acid treatment used to obtain HT and CT extracts for polyphenol analysis promotes the depolymerization of these compounds, it allows the quantification of the whole amount of polyphenol monomers that could be released upon fermentation during human digestion. Molina et al. (2019) have recently demonstrated that tannins may be transformed by gut microbiota and concluded that these compounds are metabolized in the intestine and are important substrates for microbial fermentation and production of short-chain fatty acids (SCFA). Therefore, SCFA, which have been largely implicated in the beneficial health effects of soluble fiber, are emerging as metabolites of tannins and may contribute to their health benefits. For this reason, the analysis of HT extract would provide data on the total amount of polyphenols available for microbial fermentation in the gut.

There was a significant interaction of granulometric fractionation and micronization on the HT content of OP ($p < 0.05$). Micronization increased the content of HT in F1 ($p < 0.05$) but not in F2 ($p > 0.05$) compared to their parent fractions before grinding (Table 5). The increase of these compounds was likely due to the size reduction of F1 particles that were larger than F2 particles before grinding (Figure 1). F1 was mainly composed by stone fragments, which are difficult to break during conventional grinding. Micronization was effective to degrade cell wall structure reducing the particle size of F1. Drakos et al. (2017) studied the micronization of rye and barley flours and reported differences in the behavior during milling depending on the botanical origin of the flour, ie the composition of raw material.

Granulometric fractionation yielded two products that had different CT contents, F2 exhibiting higher CT values than F1 ($p < 0.05$; Table 5). The different composition of these two fractions is likely related to greater amount of olive pulp in the F2 fraction. Micronization caused a small reduction in the CT content of F2 ($p < 0.05$) but did not change the CT content of F1 ($p > 0.05$) (Table 5).

Granulometric separation is a simple and effective method to greatly increase the content of polyphenols (EPP, HT and CT) in the fraction that had particle size < 2 mm, whereas micronization of the granulometrically separated fractions provides further increase in the content of polyphenols. This increase was greater for the F1 fraction but F2 had the highest polyphenols content both before and after micronization, and therefore could be indicated as the richest in bioactive compounds.

3.4 Phenolic profile of OP fractions

Oleuropein and apigenin were not detected in the samples (Table 5). There was a significant interaction effect between granulometric fractionation and micronization on the content of hydroxytyrosol, pinoresinol and luteolin ($p < 0.05$). F2 had higher content of hydroxytyrosol and luteolin than F1 ($p < 0.05$). Micronization increased the content of hydroxytyrosol in F1 but reduced the content of pinoresinol and luteolin ($p < 0.05$). Hydroxytyrosol was the major soluble phenolic compound found in F1 and F2 fractions. Hydroxytyrosol has important biological effects such as cardioprotective, neuroprotective, anticarcinogenic and antibacterial activities (Hu et al., 2014). Granulometric fractionation concentrated hydroxytyrosol in the F2 fraction and therefore is an important and clean method to obtain a product enriched in health promoting compounds. Micronization was also an interesting strategy to increase the extractability of hydroxytyrosol from the F1 fraction but not for the F2 fraction.

3.5 Antioxidant capacity

In our study, the antioxidant capacity was evaluated for the EPP extract of OP fractions (Figure 3). DPPH[•] is a stable synthetic radical with an unpaired electron in a nitrogen interaction (Eklund et al., 2005). Granulometric fractionation promoted an increase in the capacity of F2 to remove the DPPH radical (lower EC₅₀ value) compared to F1 (Figure 3A, $p < 0.05$) and this result is related to the increase in the EPP content. Micronization was effective to reduce the EC₅₀ of EPP extracts from F1 and F2 fraction ($p < 0.05$; Figure 3A), indicating an improved antioxidant capacity, which is in line with the increase in the EPP content (Table 5). Thus, the reduction of particle size favors the extraction of EPP and increases the antioxidant activity of OP. Micronization has also been shown to improve the extraction of polyphenols and DPPH radical scavenging in green tea, mushroom and isolated compounds such as trans-resveratrol (Hu et al., 2012; Wang et al., 2016; Aguiar et al., 2018).

F2 fraction had lower EC₅₀ value for ABTS removal than F1 ($p < 0.05$; Figure 3B), indicating greater antioxidant capacity. Micronization further reduced the EC₅₀ of EPP extracts from F1 and F2 fractions ($p < 0.05$; Figure 3B). These data are in line with the greater polyphenol content of F2 compared to F1 and the increase of polyphenol content triggered by micronization. Micronization has been shown to increase the ABTS radical scavenging activity of DF from grape pomace (Zhu et al., 2014a) by modifying the fiber structure and releasing or exposing matrix-bound polyphenols. Then, we can infer that the granulometric separation of

OP followed by a superfine grinding can positively affect the antioxidant capacity by the method of ABTS.

Granulometric fractionation increased the peroxy radical scavenging capacity in the F2 fraction and micronization promoted further increase in the radical scavenging capacity both in F1 and F2 ($p < 0.05$; Figure 3D). The micronized F2 fraction exhibited the greatest ORAC values suggesting that this fraction has the greatest bioactive potential. The high antioxidant potential of this sample is of great interest as peroxy radical is a biologically relevant radical (Prior, 2015). Extracts of *Hibiscus sabdariffa*, which were also able to scavenge peroxy radicals, have been shown to exhibit hypolipidemic properties in hyperlipidemic mouse model (Fernández-Arroyo et al., 2011). Moreover, the high antioxidant capacity of food grade lingonberry extract in the ORAC assay have been shown to be associated to a protective effect against oxidative stress *in vivo* (Mane et al., 2011). However, ORAC activity has been scarcely evaluated in micronized products. Our results demonstrate that micronization remarkably improves peroxy radical scavenging capacity of OP fractions. ORAC values of OP fractions were higher than those obtained for grape antioxidant dietary fiber (Pérez-Jiménez et al., 2008b) but similar to the values of fresh lime waste (approximately $535 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ dw}$) and defatted açai pulp (approximately $379 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{ dw}$) (Esparza-Martinez et al., 2016; Rufino et al., 2011). Thus, micronization is an important method to increase the antioxidant capacity and may have promising health effects.

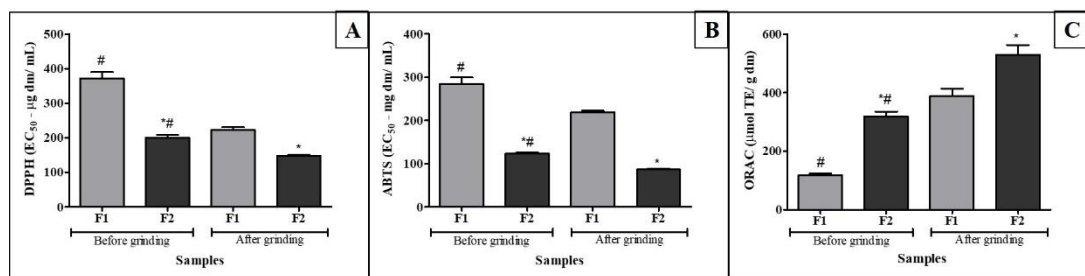


Figure 3. Antioxidant capacity in EPP extracts from OP fractions granulometrically separated and micronized. Results are mean \pm standard error of mean ($n=6$).

*Different from F1 for the same grinding stage. #Different from the respective fraction after grinding. Tukey's test ($p < 0.05$). dm: dry matter; TE: Trolox equivalent; F1: Fraction 1 (particles $> 2 \text{ mm}$); F2: Fraction 2 (particles $< 2 \text{ mm}$); A: DPPH radical scavenging; B: ABTS radical assay; C: ORAC assay.

Thus, granulometric fractionation is a simple and effective procedure to obtain OP products rich in polyphenols and with a good antioxidant capacity (such as F2). A short-time micronization was sufficient to increase the EPP content, but it was not sufficient to alter the structure of cell wall matrix or to modify NEPPs composition. The high peroxy radical

scavenging capacity of the micronized F2 fraction indicates that it is an important source of polyphenols with potential biological activity.

3.6 Proximate composition of OP fractions

In addition to the important changes in polyphenol content and antioxidant capacity, granulometric fractionation and micronization also caused changes in the proximate composition of OP. Granulometric fractionation of OP using a 2-mm sieve had a significant effect on the proximate composition (Table 6) yielding two products that had different ash, protein and fat content, being F2 the fraction bearing the highest ash, protein and fat content ($p < 0.05$). Micronization had no effect in the protein content and did not change the ash content of F2 but increased the ash content of F1 and the fat content of both fractions ($p < 0.05$). Dietary fiber (DF) is the most abundant constituent of OP. Granulometric fractionation was effective to concentrate SDF in the F2 fraction (more than 10 times), which also had reduced content of IDF and TDF (~0.9 and 0.8 times) compared to the F1 fraction ($p < 0.05$). These results are similar to those obtained for total dietary fiber of some cereal products such as oat fiber, barley bran and sesame husk (Chawla & Patil, 2010; Nandi & Ghosh, 2015). Reduced times of micronization did not modify the SDF content. However, the granulometric fractionation of OP generates a product enriched in SDF. The amount of SDF in F2 is equivalent to flaxseed (11.3%) that is considered a rich source of SDF (Nandi & Gosh, 2015). Granulometric fractionation did not change the content of cellulose or hemicellulose but micronization increased the content of cellulose in F1AG and the content of hemicellulose in both micronized fractions ($p < 0.05$, Table 6). Granulometric fractionation generated a product bearing lower lignin content, namely F2. Moreover, micronization was effective to reduce the amount of lignin in both micronized fractions. This finding is in agreement with previous data on the effect of reduced times of micronization on cereals, which was able to reduce the content of compounds with low bioaccessibility, such as lignin (Fardet et al., 2008). Thus, granulometric fractionation of OP selectively concentrates constituents of greater nutritional interest in the F2 fraction and micronization further improves its composition.

Table 6. Proximate composition (g 100 g⁻¹ of dry matter) of OP fractions obtained by granulometric fractionation

	Granulometric fractionation	Micronization		Mean ± SEM
		Before grinding	After grinding	
Ash (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	1.5 ± 0.0 ^{b,B}	2.0 ± 0.5 ^{b,A}	1.8 ± 0.1
	F2	4.1 ± 0.0 ^{a,A}	3.9 ± 0.1 ^{a,A}	4.0 ± 0.1
	Mean ± SEM (n=8)	2.8 ± 0.6	2.9 ± 0.4	
Crude Protein (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	3.8 ± 0.3	4.2 ± 0.1	4.0 ± 0.2 ^b
	F2	11.1 ± 0.5	11.9 ± 0.1	11.5 ± 0.3 ^a
	Mean ± SEM (n=8)	8.0 ± 1.7 ^A	7.5 ± 1.7 ^A	
Fat (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	2.0 ± 0.0 ^{b,B}	5.00 ± 0.1 ^{b,A}	3.5 ± 0.7
	F2	4.4 ± 0.2 ^{a,B}	6.8 ± 0.1 ^{a,A}	5.6 ± 0.6
	Mean ± SEM (n=8)	5.9 ± 0.4	3.2 ± 0.5	
Total dietary fiber (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	78.7 ± 2.4	82.9 ± 0.4	80.8 ± 1.4 ^a
	F2	74.5 ± 0.3	74.5 ± 0.8	73.5 ± 0.6 ^b
	Mean ± SEM (n=8)	75.6 ± 1.8 ^B	78.7 ± 1.9 ^A	
Insoluble Dietary Fiber (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	77.9 ± 0.9	81.8 ± 0.7	79.8 ± 1.0 ^a
	F2	62.6 ± 0.5	65.3 ± 0.9	64.0 ± 0.8 ^b
	Mean ± SEM (n=8)	73.6 ± 3.7 ^A	70.2 ± 3.5 ^B	
Soluble Dietary Fiber (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	0.9 ± 0.0	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.2 ^b
	F2	10.0 ± 0.8	12.2 ± 3.5	11.1 ± 1.7 ^a
	Mean ± SEM (n=8)	5.6 ± 2.0 ^A	6.7 ± 2.9 ^A	
Cellulose (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	1.2 ± 0.1 ^{a,B}	3.1 ± 0.5 ^{a,A}	2.1 ± 0.5
	F2	1.2 ± 0.0 ^{a,B}	1.3 ± 0.1 ^{b,B}	1.3 ± 0.1
	Mean ± SEM (n=8)	1.2 ± 0.0	2.2 ± 0.5	
Hemicellulose (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	19.6 ± 1.1	27.4 ± 1.1	23.5 ± 2.0 ^a
	F2	19.9 ± 1.1	23.2 ± 1.1	21.5 ± 0.8 ^a
	Mean ± SEM (n=8)	19.7 ± 0.5 ^B	25.3 ± 1.3 ^A	
Lignin (g 100 g ⁻¹ dm)	F1	58.9 ± 1.6 ^{a,A}	45.4 ± 0.4 ^{a,B}	52.2 ± 3.1
	F2	34.2 ± 0.5 ^{b,A}	28.12 ± 1.2 ^{b,B}	31.2 ± 1.5
	Mean ± SEM (n=8)	46.5 ± 5.6	36.8 ± 3.9	

ANOVA results (p-value)

	Granulometric fractionation	Micronization	Granulometric fractionation x Micronization
Ash	0.000	0.052	0.002
Crude Protein	0.000	0.092	0.545

Table 6 (continued)				
Fat		0.000	0.000	0.046
Total dietary fiber		0.000	0.044	0.433
Insoluble Dietary Fiber		0.000	0.003	0.471
Soluble Dietary Fiber		0.003	0.536	0.521
Cellulose		0.006	0.004	0.004
Hemicellulose		0.114	0.001	0.076
Lignin		0.000	0.000	0.000

Lower case letters indicate differences between granulometric fractions and upper case letters indicate differences in the micronization process. F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm).

4 Conclusion

We showed that a short-time micronization is an efficient technique to increase the extraction of EPP from granulometrically fractionated olive pomace. Granulometric fractionation followed by micronization generates a product of great interest that is the micronized fraction obtained from OP particles < 2 mm (F2AG). This product is rich in EPP, SDF, hydroxytyrosol and had high antioxidant capacity in several assays. More studies need to be conducted to evaluate the biological effects of OP fractions and micronized products.

Declaration of interest

None.

Acknowledgements

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) [grant number 435932/2018-7], CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) and Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul [grant number DCIT 41/2017]. We thank the support given by Núcleo de Análises e Pesquisas Orgânicas (NAPO, UFSM) and the donation of olive pomace by Olivais da Fonte company. We also thank to Gracieli Fernandes for their assistance in particle size analysis.

References

Aguiar, G. P. S., Arcari, B. D., Chaves, L. M. P. C., Dal Magro, C., Boschetto, D. L., Piato, A. L., Lanza, M., Oliveira, J. V., 2018. Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity. *Ind. Crop. Prod.* 112, 1-5.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.008>

Aliakbarian, B., Palmieri, D., Casazza, A. A., Palombo, D., & Perego, P., 2012. Antioxidant activity and biological evaluation of olive pomace extract. *Nat. Prod. Res.* 26(24), 2280-2290.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2012.660692>

AOAC. Association of Official Analytical Chemists, 1995. *Official Methods of Analysis of the AOAC International*, 16th ed., Washington: 1018p.

Arranz, S., Saura-Calixto, F., Shaha, S., & Kroon, P. A., 2009. High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *J. Agric. Food Chem.* 57(16), 7298-7303.
<https://doi.org/10.1021/jf9016652>

Bligh, E. G., Dyer, W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. and Physiol.* 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

Bunzel, A., Schussler, G., Saha, T., 2011. Chemical characterization of Klason lignin preparations from plant-based foods. *J. Agric. Food Chem.* 59, 12506-12513. <https://doi.org/10.1021/jf2031378>

Chau, C.-F., Wang, Y.-T., Wen, Y.-L., 2007. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chem.* 100(4), 1402-1408.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.034>

Chawla, R., Patil, G. R., 2010. Soluble dietary fibre. *Comp. Rev. Food Sci. F.* 9, 178-196.
<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00099.x>

Conterno, L., Martinelli, F., Tamburini, M., Fava, F., Mancini, A., Sordo, M., Pindo, M., Martens, S., Masuero, D., Vrhovsek, U., Dal Lago, C., Ferrario, G., Morandini, M., Tuohy,

K.,2017. Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Nutr.*, 1-19.

<https://doi.org/10.1007/s00394-017-1572-2>

Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., Michaud, P., 2013. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Proc. Biochem.* 48(10), 1532-1552. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>

Derringer, G., Suich, R., 1980. Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.* 12(4), 214-219. <https://doi.org/10.1080/00224065.1980.11980968>

Drakos, A., Kyriakakis, G., Evageliou, V., Protonotariou, S., Mandala, I., Ritzoulis, C., 2017. Influence of jet milling and particle size on the composition, physicochemical and mechanical properties of barley and rye flours. *Food Chem.* 215, 326-332.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.07.169>

Eklund, P. C., Langvik, O. K., Warna, J. P., Salmi, T. O., Willfor, S. M., Sjöholm, R. E., 2005. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Org. Biomol. Chem.* 3(18), 3336-3347. <https://doi.org/10.1039/b506739a>

Esparza-Martinez, F. J., Miranda-Lopez, R., Mata-Sanchez, S. M., Guzman-Maldonado, S. H., 2016. Extractable and Non-Extractable Phenolics and Antioxidant Capacity of Mandarin Waste Dried at Different Temperatures. *Plant Foods Hum. Nutr.* 71(3), 294-300.

<https://doi.org/10.1007/s11130-016-0559-0>

Fardet, A., Rock, E., Rémésy, C., 2008. Is the in vitro antioxidant potential of whole-grain cereals and cereal products well reflected in vivo? *J. Cereal Sci.* 48, 258-276.

<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.01.002>

Fernández-Arroyo, S., Rodríguez-Medina, I. C., Beltrán-Debón, R., Pasini, F., Joven, J., Micol, V., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2011. Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. *Food Res. Int.* 44(5), 1490-1495.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.040>

Goering, H. K., Van Soest, P. J., 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington, DC: USDA.

- Goñi, I., Díaz-Rubio, M. E., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., 2009. Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. *Food Res. Int.* 42(7), 840-846. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.010>
- González-Sarrías, A., Espín, J. C., Tomás-Barberán, F. A., 2017. Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects. *Trends Food Sci. Technol.* 69, 281-288. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.010>
- Goulart, F. R., Speroni, C. S., Lovatto, N. M., Loureiro, B. B., Corrêia, V., Radünz Neto, J., Silva, L. P., 2013. Activity of digestive enzymes and growth parameters of juvenile jundia (*Rhamdia quelen*) fed linseed meal in nature and demucilaged. *Semina: Ciênc. Agrár.* 34(6), 3069-3080. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6p3069>
- Guermazi, Z., Gharsallaoui, M., Perri, E., Gabsi, S., Benincasa, C., 2017. Integrated approach for the eco design of a new process through the life cycle analysis of olive oil: Total use of olive by-products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 119(9), 17000-17009. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700009>
- He, S., Qin, Y., Walid, E., Li, L., Cui, J., Ma, Y., 2014. Effect of ball-milling on the physicochemical properties of maize starch. *Biotechnol. Rep. (Amst.)* 3, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.06.004>
- Hu, J., Chen, Y., Ni, D., 2012. Effect of superfine grinding on quality and antioxidant property of fine green tea powders. *LWT - Food Sci. Technol.* 45(1), 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.002>
- Hu, T., He, X., Jiang, J., Xu, X., 2014. Hydroxytyrosol and its potential therapeutic effect. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 1449-1455. <https://doi.org/10.1021/jf405820v>
- ICH (2005). International Conference on Harmonization topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and methodology, London: EMEA.
- Liang, X., Sun, J., Ma, H., 2016. Effect of superfine grinding on physicochemical properties of apple pomace. *J. Chem. Soc. Pakistan* 38(2), 192-197.

- Lozano-Sánchez, J., Giambanelli, E., Quirantes-Piné, R., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., 2011. Wastes generated during the storage of extra virgin olive oil as a natural source of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 59, 11491-11500. <https://doi.org/10.1021/jf202596q>
- Ma, S., Ren, B., Diao, Z., Chen, Y., Qiao, Q., Liu, X., 2016. Physicochemical properties and intestinal protective effect of ultra-micro ground insoluble dietary fibre from carrot pomace. *Food Func.* 7(9), 3902-3909. <https://doi.org/10.1039/C6FO00665E>
- Mane, C., Loonis, M., Juhel, C., Dufour, C., Malien-Aubert, C., 2011. Food grade lingonberry extract: polyphenolic composition and in vivo protective effect against oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* 59(7), 3330-3339. <https://doi.org/10.1021/jf103965b>
- Molino, S.; Fernández-Miyakawa, M.; Giovando, S.; Rufián-Henares, J. A, 2019. Study of antioxidant capacity and metabolization of quebracho and chestnut tannins through in vitro gastrointestinal digestion-fermentation. *J. Funct. Foods.* 49, 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.056>
- Nandi, I., Ghosh, M., 2015. Studies on functional and antioxidant property of dietary fibre extracted from defatted sesame husk, rice bran and flaxseed. *Bioact. Carbohydr. Dietary Fibre* 5(2), 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2015.03.001>
- Nasopoulou, C., Stamatakis, G., Demopoulos, C. A., Zabetakis, I., 2011. Effects of olive pomace and olive pomace oil on growth performance, fatty acid composition and cardio protective properties of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chem.* 129(3), 1108-1113. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.086>
- Nasopoulou, C., Zabetakis, I., 2013. Agricultural and Aquacultural Potential of Olive Pomace. A Review. *J. Agric. Sci.* 5(7), 116-127. <https://doi.org/10.5539/jas.v5n7p116>
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L., 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4619-4626. <https://doi.org/10.1021/jf010586o>
- Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz- Rubio, M. E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F., 2008a. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods,

oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res. Int.* 41(3), 274-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>

Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Tabernero, M., Arranz, S., Diaz-Rubio, M. E., Garcia-Diz, L., Goni, I., Saura-Calixto, F., 2008b. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition* 24(7-8), 646-653. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.03.012>

Pérez-Jiménez, J., Torres, J. L., 2011. Analysis of nonextractable phenolic compounds in foods: the current state of the art. *J. Agric. Food Chem.* 59(24), 12713-12724. <https://doi.org/10.1021/jf203372w>

Pérez-Jiménez, J., Diaz-Rubio, M. E., Saura-Calixto, F., 2013. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health effects. *Nutr. Res. Rev.* 26(2), 118-129. <https://doi.org/10.1017/S0954422413000097>

Pérez-Jiménez, J., Diaz-Rubio, M. E., Saura-Calixto, F., 2015. Obtainment and characterization of a potential functional ingredient from olive. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66(7), 749-754. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1095863>

Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., 2015. Macromolecular antioxidants or non-extractable polyphenols in fruit and vegetables: Intake in four European countries. *Food Res. Int.* 74, 315-323. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.007>

Prior, R. L., 2015. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *J. Funct. Foods* 18, 797-810. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.12.018>

Ramachandriah, K., Chin, K. B., 2016. Evaluation of ball-milling time on the physicochemical and antioxidant properties of persimmon by-products powder. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 37, 115-124. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.005>

Ramachandraiah, K., Chin, K. B., 2017. Impact of drying and micronization on the physicochemical properties and antioxidant activities of celery stalk. *J. Sci. Food Agric.* 97(13), 4539-4547. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8321>

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26(9/10), 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rosa, N. N., Barron, C., Gaiani, C., Dufour, C., Micard, V., 2013. Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *J. Cereal Sci.* 57(1), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.10.002>
- Roselló-Soto, E., Koubaa, M., Moubarik, A., Lopes, R. P., Saraiva, J. A., Boussetta, N., Grimi, N., Barba, F. J., 2015. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. *Trends Food Sci. Technol.* 45(2), 296-310. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.003>
- Rufino, M. d. S. M., Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Alves, R. E., de Brito, E. S., Oliveira, M. S. P., Saura-Calixto, F., 2011. Açai (*Euterpe oleracea*) 'BRS Pará': A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Res. Int.* 44(7), 2100-2106. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.09.011>
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Arranz, S., Serrano, J., Goñi, I., 2007. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle Flower beverage. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7886-7890. <https://doi.org/10.1021/jf070485b>
- Souza, D., Venâncio, A., Belo, I., Salgado, J. M., 2018. Mediterranean agro-industrial wastes as valuable substrates for lignocellulolytic enzymes and protein production by solid-state fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 98, 5248-5256. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9063>
- Vauzour, D., Rodriguez-Mateos, A., Corona, G., Oruna-Concha, M. J., Spencer, J. P. E., 2010. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients* 2(11), 1106-1131. <https://doi.org/10.3390/nu2111106>
- Vergani, L., Vecchione, G., Baldini, F., Voci, A., Ferrari, P. F., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Perego, P., 2016. Antioxidant and hepatoprotective potentials of phenolic compounds from olive pomace. *Chem. Eng. Trans.* 49, 475-480. <https://doi.org/10.3303/CET1649080>

- Wang, C.-C. R., Ciou, J.-Y., Chiang, P.-Y., 2009. Effect of micronization on functional properties of the water caltrop pericarp. *Food Chem.* 113, 970-974.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.08.048>
- Wang, J., Wang, C., Li, W., Pan, Y., Yuan, G., Chen, H., 2016. Ball milling improves extractability and antioxidant properties of the active constituents of mushroom *Inonotus obliquus* powders. *Int. J. Food Sci. Technol.* 51(10), 2193-2200.
<https://doi.org/10.1111/ijfs.13180>
- Waterhouse A. L. Determination of total phenolics, 2003. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, R. E. Wrolstad, Ed., units I, pp. II.1.1–II.1.8, John Wiley & Sons, New York, NY, USA.
- Zhao, G., Zhang, R., Dong, L., Huang, F., Tang, X., Wei, Z., Zhang, M., 2018. Particle size of insoluble dietary fiber from rice bran affects its phenolic profile, bioaccessibility and functional properties. *LWT- Food Sci. Technol.* 87, 450-456.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.016>
- Zhu, F., Du, B., Li, J., 2014a. Effect of ultrafine grinding on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from wine grape pomace. *Food Sci. Technol. Int.* 20(1), 55-62.
<https://doi.org/10.1177/1082013212469619>
- Zhu, F., Du, B., Li, R., Li, J., 2014b. Effect of micronization technology on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from buckwheat hulls. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3(3), 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.12.009>
- Zhu, K., Huang, S., Peng, W., Qian, H., Zhou, H., 2010. Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber. *Food Res. Int.* 43(4), 943-948. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.01.005>
- Zurita, J., Diaz-Rubio, M. E., Saura-Calixto, F., 2012. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 63(8), 936-939.
<https://doi.org/10.3109/09637486.2012.681634>

Supplementary Material

Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace

Caroline Sefrin Speroni^a, Jessica Stiebe^a, Daniela Rigo Guerra^a, Ana Betine Beutinger Bender^a, Cristiano Augusto Ballus^a, Danilo Rheinheimer dos Santos^b, Fernando Dal Pont Morisso^c, Leila Picolli da Silva^d, Tatiana Emanuelli^a.

^aDepartment of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartment of Soil Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^cInstitute of Health Sciences, Feevale University, Vila Nova, 93510-330, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

^dDepartment of Animal Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

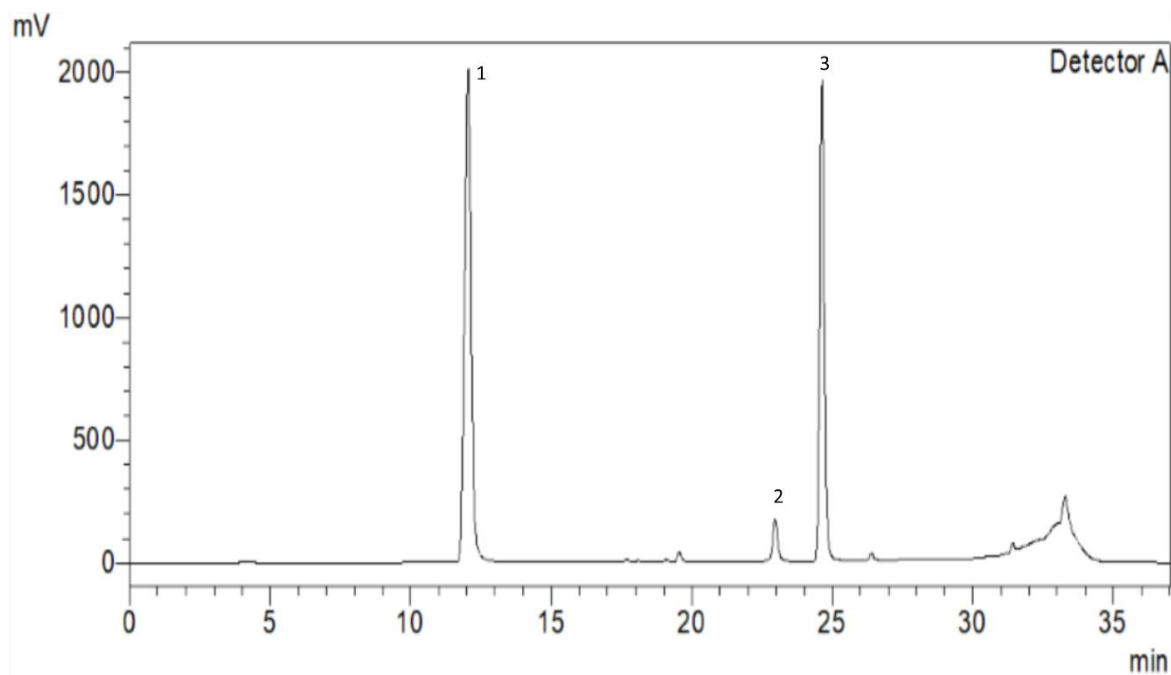


Figure S1. HPLC-RF chromatogram of polyphenol standards at 280 nm of emission and 339 nm of excitation. Hydroxytyrosol (1), Oleuropein (2) and Pinoresinol (3).

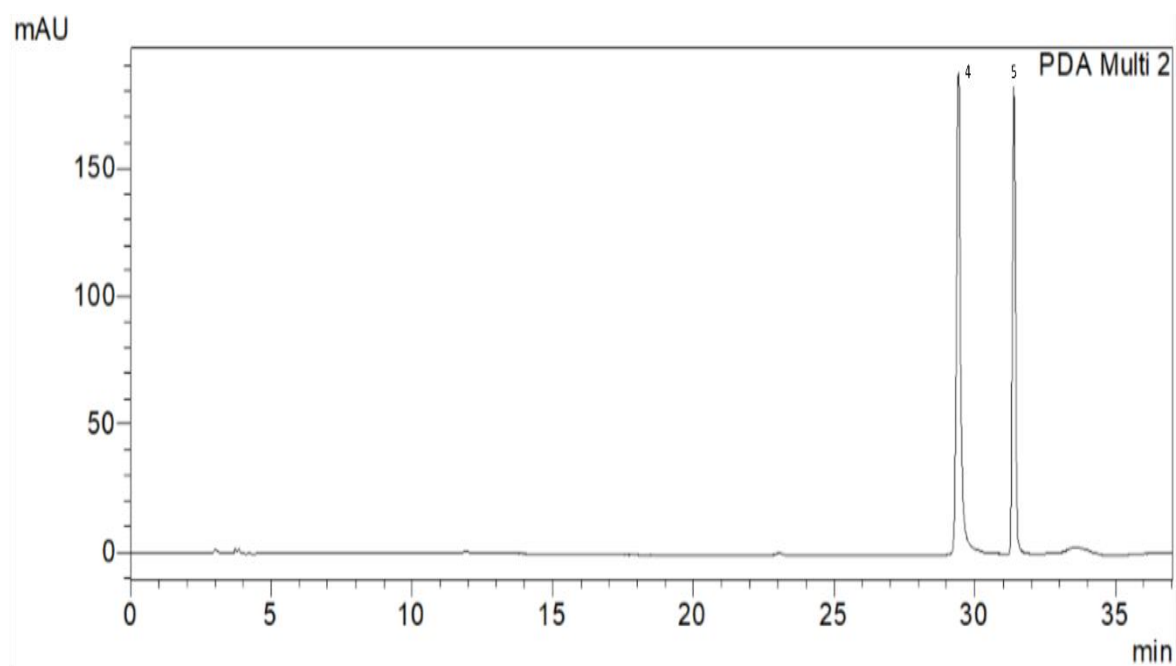


Figure S2. HPLC-PDA chromatogram of polyphenol standards at 340 nm. Luteolin (4) and Apigenin (5).

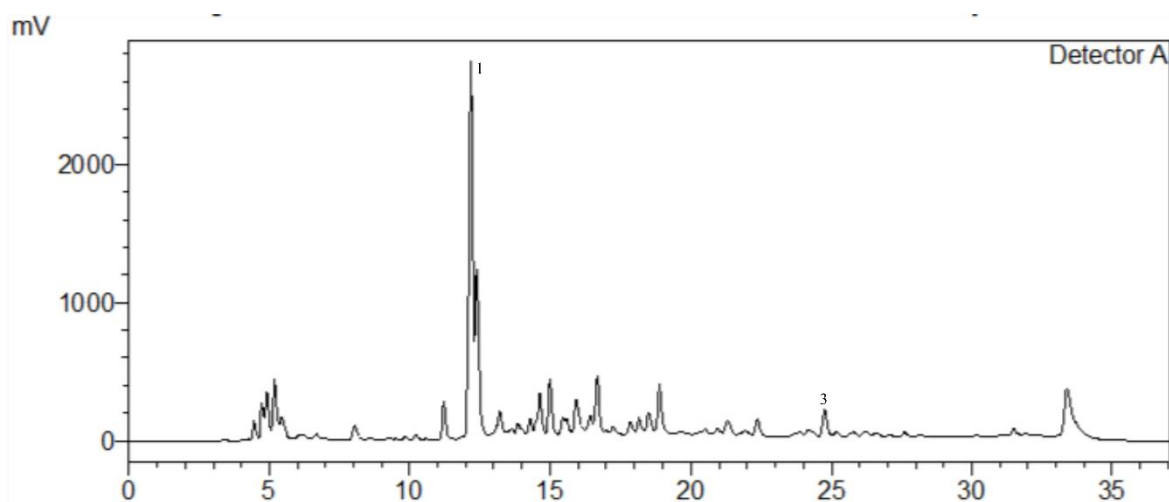


Figure S3. HPLC-RF chromatogram of phenolic compounds of F1 (280 nm of emission and 339 nm of excitation). Hydroxytyrosol (1) and Pinoresinol (3).

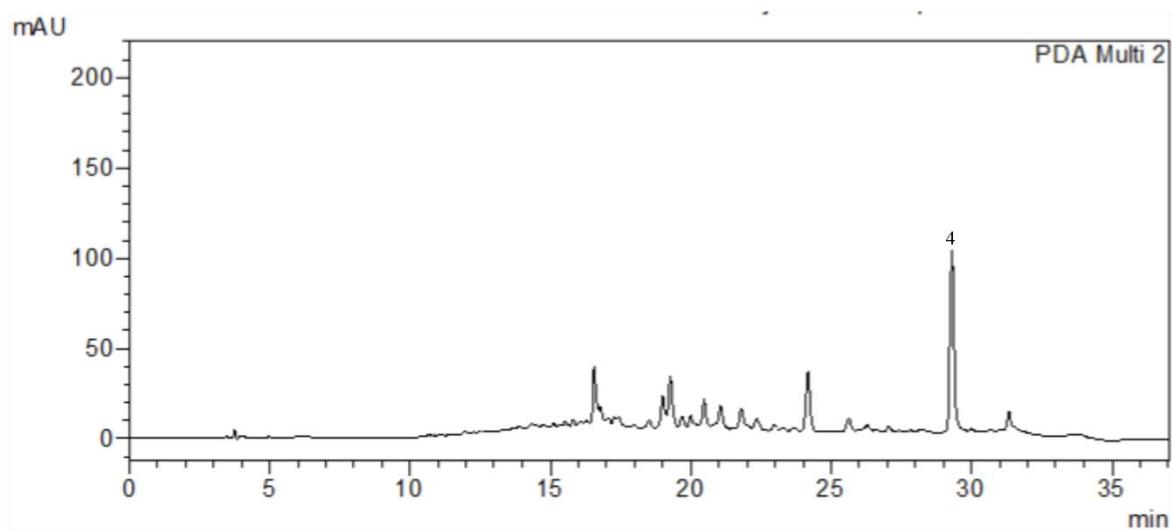


Figure S4. HPLC-PDA chromatogram of phenolic compounds of F1 (340 nm). Luteolin (4).

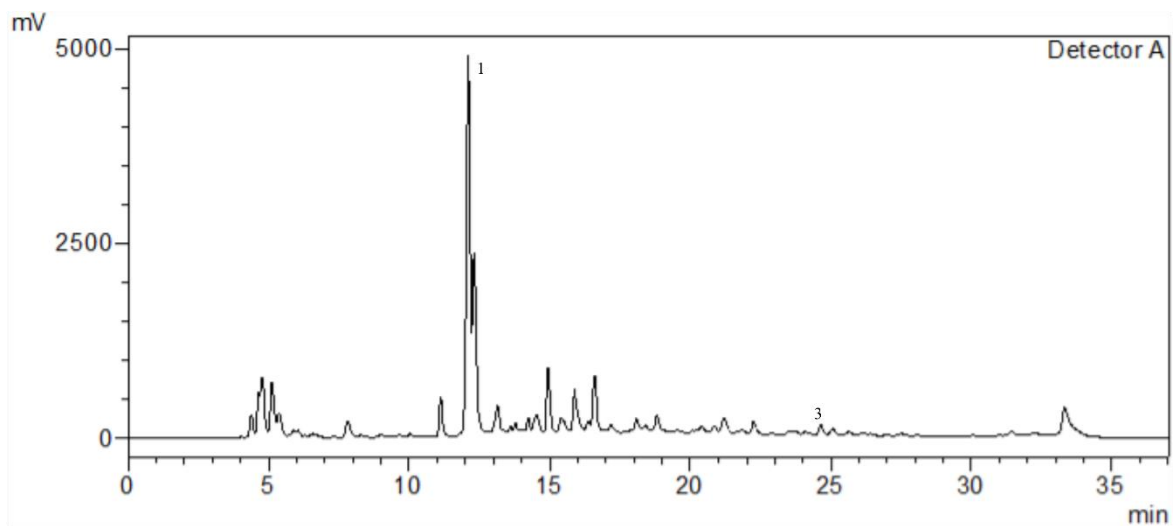


Figure S5. HPLC-RF chromatogram of phenolic compounds of F2 (280 nm of emission and 339 nm of excitation). Hydroxytyrosol (1) and Pinoresinol (3).

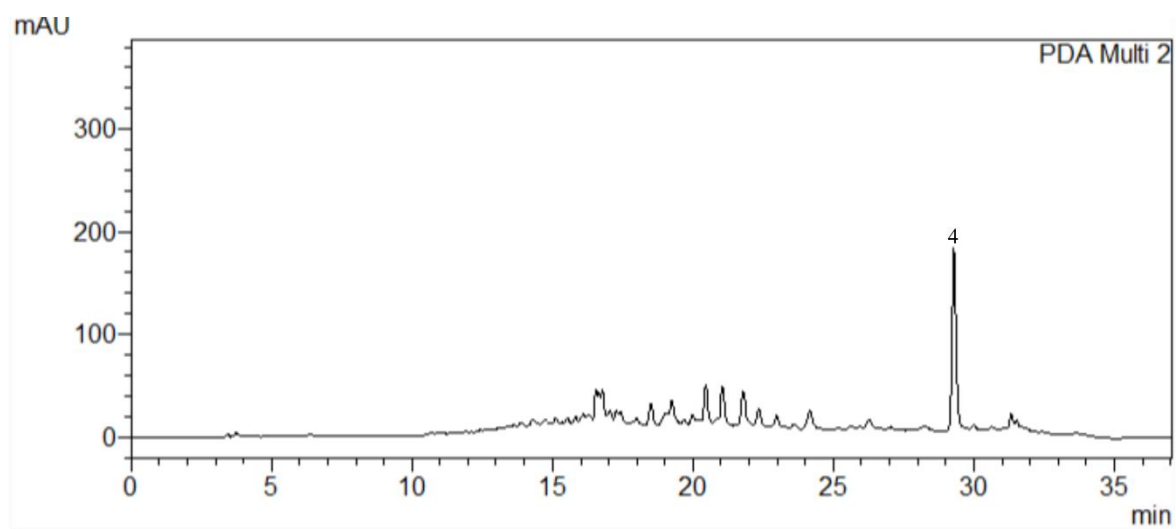


Figure S6. HPLC-PDA chromatogram of phenolic compounds of F2 (340 nm). Luteolin (4).

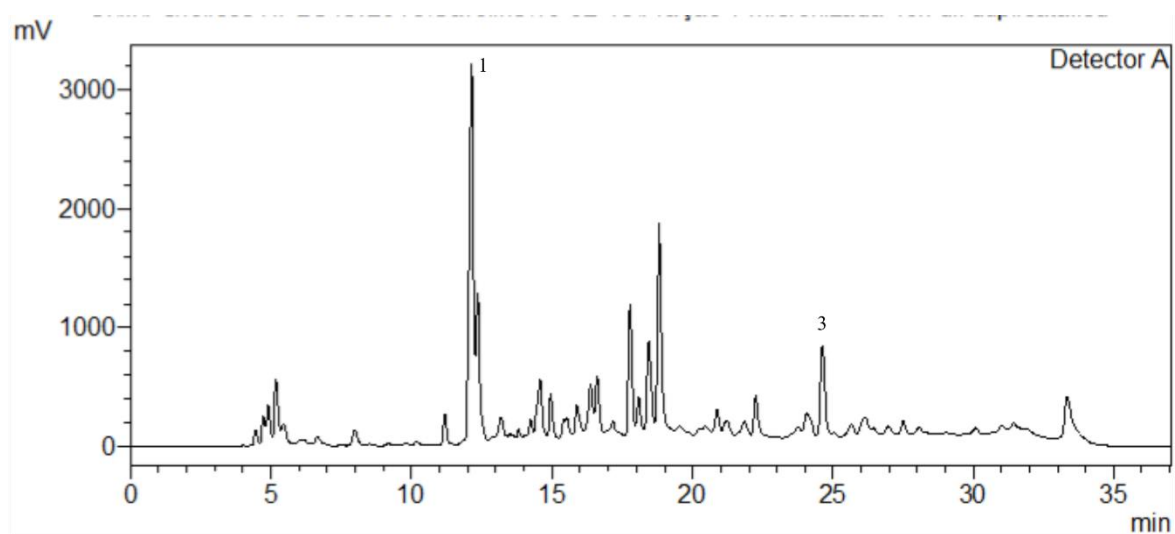


Figure S7. HPLC-RF chromatogram of phenolic compounds of F1AG (280 nm of emission and 339 nm of excitation). Hydroxytyrosol (1) and Pinoresinol (3).

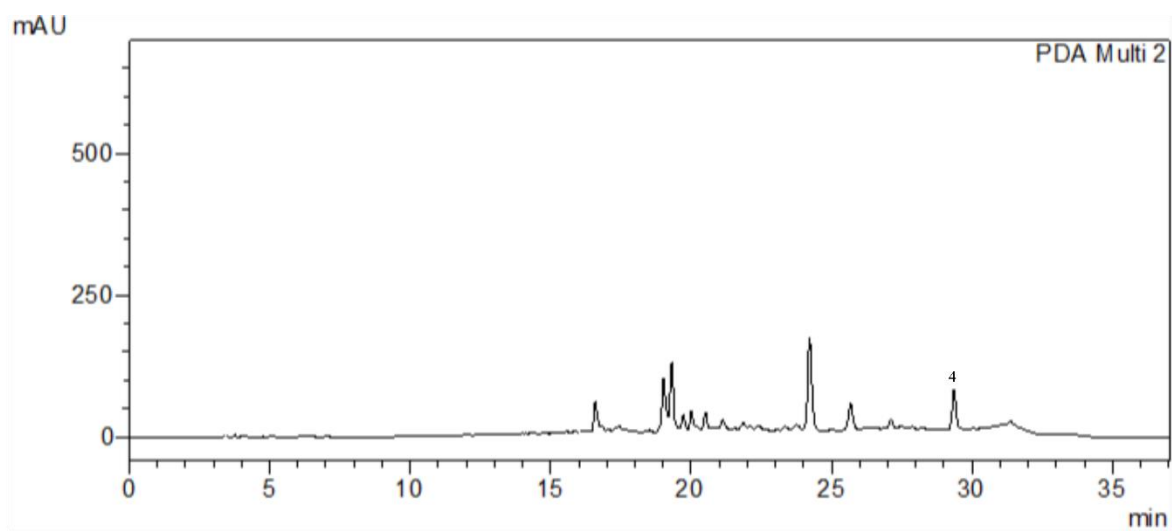


Figure S8. HPLC-PDA chromatogram of phenolic compounds of F1AG (340 nm). Luteolin (4).

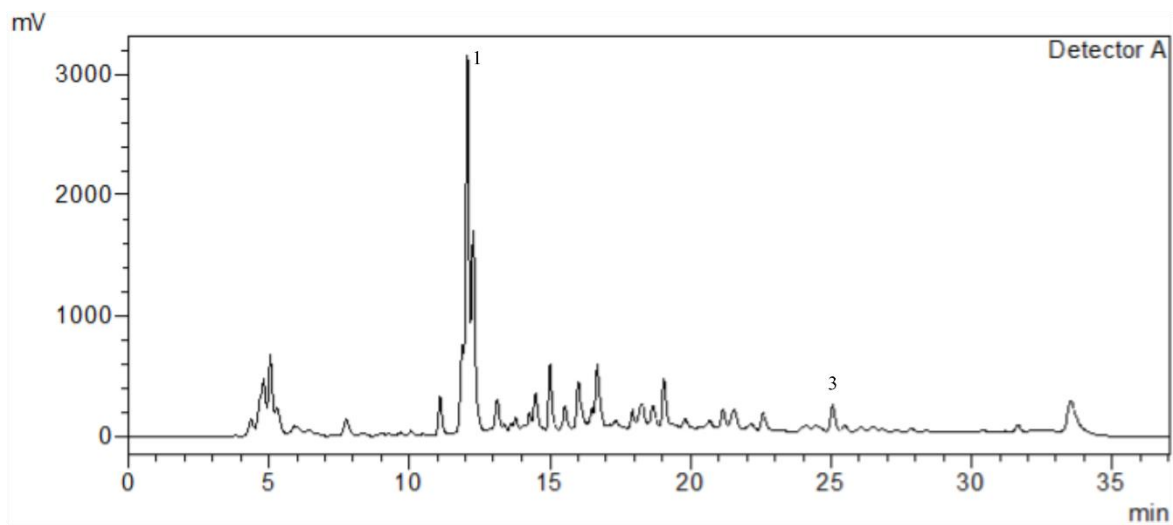


Figure S9. HPLC-RF chromatogram of phenolic compounds of F2AG (280 nm of emission and 339 nm of excitation). Hydroxytyrosol (1) and Pinoresinol (3).

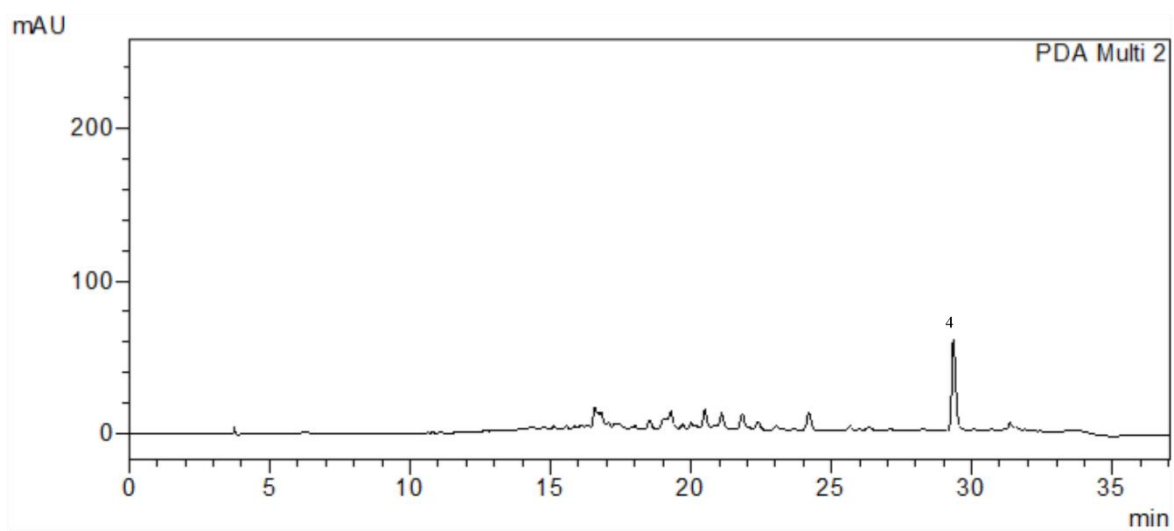


Figure S10. HPLC-PDA chromatogram of phenolic compounds of F2AG (340 nm). Luteolin (4).

4.2 MANUSCRITO 2:

GRANULOMETRIC FRACTIONATION AND MICRONIZATION: A PROCESS FOR INCREASING SOLUBLE DIETARY FIBER CONTENT AND IMPROVING TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF OLIVE POMACE

Manuscrito configurado nas normas do periódico Powder Technology

Granulometric fractionation and micronization: a process for increasing soluble dietary fiber content and improving technological and functional properties of olive pomace

Caroline Sefrin Speroni^a, Ana Betine Beutinger Bender^a, Jessica Stiebe^a, Cristiano Augusto Ballus^a, Patrícia Felix Ávila^b, Rosana Goldbeck^b, Fernando Dal Pont Morisso^c, Leila Picolli da Silva^d, Tatiana Emanuelli^a

^aDepartment of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bSchool of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Monteiro Lobato Street no 80, University City, 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

^cInstitute of Health Sciences, Feevale University, Vila Nova, 93510-330, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

^dDepartment of Animal Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding author. Tel: +55 55 3220 8596

E-mail address: tatiana.emanuelli@ufsm.br

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of micronization of granulometrically separated olive pomace fractions on dietary fiber composition, technological and functional properties. OP was separated in 2-mm sieve, resulting in: F1 (> 2 mm) and F2 (< 2 mm). F2 had higher content of soluble dietary fiber than F1 and lower lignin content. F2 had higher water and oil holding capacities, solubility and cation exchange capacity than F1. The micronization of F1 and F2 fractions using a ball milling (300 r min⁻¹/5 h) reduced the average particle size by 20 times. Micronization caused a redistribution of fiber fractions (from insoluble to soluble), decreased lignin content and changed granule morphology. FT-IR spectra showed that micronization exposed some functional groups, which explains the changes in dietary fiber composition. Thus, micronization converts OP into novel powders bearing improved technological and functional properties.

Keywords: olive oil, agroindustrial waste, ball milling, dietary fiber, Arbequina

Highlights

- Granulometric separation of OP fractions produces two novel powders with different compositions;
- Micronization increases soluble dietary fiber content of OP fractions;
- Micronization reduces lignin content of OP fractions;
- Micronization improves physicochemical properties of OP fractions;

1 Introduction

In food industry, there is increasing concern about the generation of wastes due to its high polluting potential and interesting chemical and nutritional characteristics. Then, strategies have been adopted for the exploitation of many types of residues (such as apple, orange and carrot) [1] in order to avoid environmental contamination and exploit their potential nutraceutical properties due to its rich composition in polyphenols, dietary fiber (DF), vitamins and minerals [1]. Among these strategies is the use of wastes for the production of bioactive ingredients [2] that can improve technological and functional properties, besides increasing the shelf-life of food products [3].

Olive oil industry generates a solid waste named olive pomace (OP) that has high antioxidant potential [4] and is rich in bioactive compounds, especially dietary fiber (DF), residual oil and polyphenols [5]. Nowadays, most OP is destined for combustion. Although this disposal effectively reduces the waste volume, it disregards the potential use of the valuable compounds found in this residue [3]. The DF found in OP is composed mainly by lignin, an insoluble polyphenol compound that has high molecular weight, low absorption rate in the small intestine and no health benefits reported [6]. Another portion of DF present in OP is composed by a soluble fraction, mainly pectin [7]. Soluble dietary fiber (SDF) is recognized by its beneficial health effects that include improvement of intestinal transit and glycemic response as well as cholesterol lowering properties [8]. Then, residues rich in insoluble and soluble fractions of dietary fiber must be exploited in order to take advantage of these valuable compounds and thus add value to agroindustrial by-products.

Strategies that could modify the composition of OP are of great interest to add value to this lignin-rich residue. Micronization is an eco-friendly process that has been used to modify some agro-industrial by-products [9]. Also known as superfine grinding, micronization consists of a physical method that reduces particle size for a range equal to or lower than 100 μm [10]. Agro-industrial wastes derived from grape, persimmon and wheat bran have been submitted to superfine grinding resulting in the improvement of functional, chemical and physical properties of powders [11]. We have recently demonstrated that short-time micronization of OP (15-24 min) increases the content of free phenolic compounds and the antioxidant capacity of the powder but did not change SDF content [5]. In contrast, long-time micronization has been shown to be an efficient method to promote chemical rearrangements in DF, increasing its solubility in a number of agro-industrial wastes [12] but its impact on the dietary fiber fraction of OP has not been explored yet. Moreover, most studies had isolated insoluble dietary fiber

(IDF), using solvents and enzymes, before evaluating the effects of micronization; this approach increases production costs and generates new residues [13,14]. Thus, the aim of this study is to evaluate the effect of micronization on the composition of dietary fiber and physicochemical properties of the powders obtained by granulometric fractionation of OP. The powder products generated through this process may be an alternative for the exploitation of this residue for food or pharmaceutical applications.

2 Materials and methods

2.1 Sample preparation

Olive pomace was obtained in a production unit of extra virgin olive oil located in Formigueiro city, RS, Brazil (29°59'01"S; 53°21'50"W). The residue was obtained from cv. 'Arbequina' and it was collected immediately after the extraction of olive oil by the biphasic centrifugation method.

The crude wet residue sample was separated in a 2 mm sieve as described by Speroni et al. [5]. The sample retained in sieve (composed by particles > 2 mm) was named F1. The sample that passed through the sieve was composed by particles < 2 mm and liquid. This fraction was centrifuged (1,774 \times g/10 min). The liquid supernatant was separated and will be used in another study, whereas the solid fraction, composed by particles < 2 mm, was named F2. F1 and F2 were freeze-dried (TERRONI, LS 3000 model, Brazil), milled in a knife mill (Marconi®, MA 630 model, Brazil) and defatted with n-hexane as described by Goulart et al. [15]. Thereafter, the defatted F1 and F2 were used for this study.

2.2 Obtaining of micronized samples of olive pomace

Defatted F1 and F2 fractions were submitted to a planetary ball mill (Retsch Co., Germany, PM100 model) using a stainless-steel vessel of 250 mL capacity and six 30-mm diameter stainless steel balls. A 15-g sample batch was micronized in each run, following the manufacturer's recommendation and pilot tests. Every 10 min of milling the equipment was paused 2 min to avoid the increase of temperature in the flask.

An experimental design (Supplementary material) has been used to optimize milling conditions to yield the lowest IDF/SDF ratio. Dietary fiber content was assessed by the enzymatic-gravimetric AOAC method (number 991.43) [16]. For this experimental design, the

variables studied were rotational speed (300, 400 and 500 r min⁻¹) and milling time (3, 4 and 5 h). The lowest IDF/SDF ratio was obtained at 300 r min⁻¹ and 5 h for both F1 and F2. Then, two new samples were obtained after milling at this condition: F1AG and F2AG. Thus, four samples were analyzed in this study, namely F1, F2, F1AG and F2AG.

2.3 Dietary fiber composition

Samples were evaluated to determine the composition of dietary fiber fraction, namely total dietary fiber (TDF), insoluble dietary fiber (IDF), soluble dietary fiber (SDF), lignin, cellulose and hemicellulose content. TDF, IDF and SDF content were obtained by the enzymatic-gravimetric AOAC method (number 991.43) [16]. Cellulose, hemicellulose and lignin content were assessed as described by Goering and Van Soest [17], following sample treatment with neutral detergent and acid detergent solutions. After the treatment of samples with acid detergent, lignin was measured after treatment with 72% H₂SO₄ (w/v). Monosaccharide composition in OP fractions (glucose, xylose, arabinose, mannose and galactose) was determined according to the method of Sluiter et al. [18]. In brief, samples (0.3 g) were hydrolyzed with 72% H₂SO₄ (w/v) at 30°C during 60 min. Thereafter, 84 mL of distilled water was added and samples were hydrolyzed at 121 °C during 60 min, and then filtered under vacuum. The resultant filtrate was analyzed by high performance liquid chromatography with pulsed amperometric detection (HPLC-PAD) to assess released monosaccharides by anion exchange chromatography. Separation was performed using a Dionex-DX500 (Sunnyvale, CA, EUA) instrument, a CarboPac PA1 column (4 mm x 250 mm) and a CarboPac PA1 guard column (4 mm x 50 mm), adopting a linear gradient elution with A (NaOH 50 mM), B (NaOAc 500 mM; NaOH 50 mM) and C (H₂O). The concentration of each monosaccharide was calculated from calibration curves of external standards purchased from Sigma-Aldrich. The analysis were performed on triplicate and results were expressed as the percentage of monosaccharides in the samples (w/w).

2.4 Particle size

The particle size was evaluated using a laser diffraction particle size analyzer equipped with a sonication control unit (Beckman Coulter, LS 13 230 model, California, USA). The samples were added to the equipment until an ideal obscuration was achieved in the software.

Thereafter, powders were dispersed in an aqueous medium and submitted to an ultrasound treatment for 1 min inside the equipment before analysis.

2.5 Technological and functional properties

Water holding capacity (WHC) [19] and oil holding capacity (OHC) [19] were evaluated by exposing sample to soybean oil (density of 0.976 g mL^{-1}) or distilled water for 24 h. Thereafter, samples were centrifuged ($2,000 \times g \text{ } 15 \text{ min}^{-1}$) and the supernatant (water or oil) was discarded. Samples were run in triplicate and the results were expressed as the amount of water/oil retained (g g^{-1} of sample).

The solubility was evaluated by exposing sample (0.3 g) to distilled water, followed by 1 h stirring [20]. Thereafter, samples were centrifuged to separate solid and liquid fractions. The supernatant was collected in a previously weighed flask that was then freeze-dried and weighed again. Results were expressed as the percentage of water-soluble sample.

The bulk density was measured following the methodology of Chau et al. [20]. Samples were added to a previously weighed 10-mL graduated cylinder. The flask was gently tapped several times until there was no further decrease of sample volume. Then, the cylinder was weighed again. Analysis was made in triplicate and results were expressed as g of sample per mL filled in the flask.

The cation exchange capacity (CEC) was evaluated by the methodology of McBurney [21]. Samples were incubated in a solution of 1 M CuSO_4 for 1 h. Thereafter, the solution was filtered and the liquid filtrated was discarded. Then, the sample was washed three times with HCl:propanol solution. The liquid fraction resulting was collected in a 100-mL volumetric flask and the volume was completed with the same solution. A 5-mL aliquot of this solution was withdrawn, the pH was adjusted with a 2 M NH_4OH solution and the liquid is transferred to a volumetric flask of 50 mL. The Cuprizone solution was added and the volume was completed with distilled water. After 30 min, absorbance was verified at 590 nm. Copper was quantified using a 5-point calibration curve of $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. The analysis was run in triplicate and the results were expressed as mg of Cu linked per g of dry matter.

2.6 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscopy (SEM)

Infrared spectroscopy analysis was conducted using a Perkin Elmer (Spectrum Two model) with Universal Attenuated Reflectance (UATR) with a diamond crystal available in the

Laboratory for Advanced Studies of Materials, located in Feevale University. Analysis was made considering a spectral range from 4000 to 400 cm^{-1} . Resolution was 32 cm^{-1} and four scans were run to collect each spectrum. Samples were not treated prior to analysis.

For SEM analysis, a JEOL equipment (model 6510LV) was used to verify the effect of micronization on granule morphology. Samples were treated with a layer of gold, and micrographs were obtained using a 10-kV electron beam. A Karl Zeiss stereomicroscope (Stemi 508 model) coupled to Zen 2 Blue Edition Software was used to evaluate the granule's morphology.

2.7 Statistical analysis

The validation of experimental design to identify the best milling condition was obtained by submitting data to ANOVA (95% of confidence level). Thereafter, to obtain the best milling condition, experiment was tested in triplicate. Data was obtained using Design Expert 6.0.10 software. The other data was analyzed by two-way ANOVA (2 granulometric separation x 2 micronization conditions) followed by Tukey's test when appropriate ($p < 0.05$).

3 Results and discussion

3.1 Dietary fiber composition

Dietary fiber has been increasingly valued due to its health benefits and also because it imparts desirable functional and technological features of fiber-rich foods [22]. The experimental design to find the best rotation/time combination to reduce IDF/SDF values of OP fractions showed lack of fit and did not yield a significant model (Supplementary material, table S1). Then, the milling condition that yielded the lowest IDF/SDF ratio (experiment 3: 300 r min^{-1} for 5 h) for both OP fractions (F1 and F2) was selected. Granulometric fractionation was effective to produce two powdered materials with different characteristics according to dietary fiber (Table 1). Before ultrafine grinding F1 had higher content of TDF and IDF than F2 (1.1 and 1.3 times, respectively, $p < 0.05$) and OP (1.05 and 1.1 times, respectively), whereas F2 had approximately 11 times higher SDF content than F1 ($p < 0.05$) and 2 times higher than OP (Table 1). The content of SDF found in F2 before grinding is similar to that found for other wastes such as cocoa pod husk [23]. Due to fiber solubility, these wastes are indicated as functional ingredients with nutraceutical potential [23]. Sieve-fractionation of cereals and other fruit

byproducts has also changed fiber composition, yielding higher SDF content in the fraction of smaller particle size (that passes through the sieve) [24,25]. Moreover, different particle size obtained by sifting of banana flour revealed a decrease of TDF associated to particle size reduction as observed in our study [26].

Although granulometric fractionation alone had good results (OP and F1 fiber values vs. F2 values before grinding), the association of fractionation with micronization further improved the SDF content in both OP fractions (Table 1). Micronization did not change TDF content of F1 but decreased TDF content of F2. However, micronization of OP fractions increased the SDF and reduced IDF contents for both F1 and F2 after grinding. These data confirm the results of other studies that tested superfine grinding to modify wine grape pomace and hard white winter wheat [27,28]. Micronization increased SDF by 6 and 1.6 times for F1 and F2 after grinding, respectively. Then, micronization promoted a rearrangement in the DF of OP fractions, causing an increase of solubility. Other studies also revealed a positive relationship between the reduction in particle size and the decrease in TDF and IDF contents and consequently an increase of SDF [27,28]. Reductions of TDF and increase of SDF after superfine grinding may occur due to the degradation of cellulose, hemicellulose and lignin in the powders [14].

Table 1. Effect of granulometric fractionation and micronization on the dietary fiber composition of olive pomace.

	Granulometric Fractionation	Micronization		
		Before Grinding	After Grinding	Mean \pm SEM (n=3)
TDF (g 100 g⁻¹ DM)	F1	80.7 \pm 1.2 ^{a,A}	79.5 \pm 0.5 ^{a,A}	80.1 \pm 0.6
	F2	72.5 \pm 0.3 ^{b,A}	66.7 \pm 0.1 ^{b,B}	69.6 \pm 1.3
	Mean \pm SEM	76.6 \pm 1.9	73.1 \pm 2.8	
IDF (g 100 g⁻¹ DM)	F1	78.8 \pm 0.5 ^{a,A}	73.4 \pm 0.3 ^{a,B}	76.1 \pm 1.2
	F2	62.5 \pm 0.5 ^{b,A}	50.8 \pm 0.5 ^{b,B}	56.7 \pm 2.6
	Mean \pm SEM	70.7 \pm 3.7	62.1 \pm 5.1	
SDF (g 100 g⁻¹ DM)	F1	0.9 \pm 0.0	6.1 \pm 0.2	3.5 \pm 1.2 ^a
	F2	9.9 \pm 0.8	15.8 \pm 0.4	12.9 \pm 1.4 ^b
	Mean \pm SEM	5.4 \pm 2.0 ^A	11.0 \pm 2.2 ^B	
Cellulose (g 100 g⁻¹ DM)	F1	1.2 \pm 0.1 ^{a,B}	14.9 \pm 0.1 ^{a,A}	8.1 \pm 3.1
	F2	1.3 \pm 0.0 ^{a,B}	11.1 \pm 0.1 ^{b,A}	6.2 \pm 2.2
	Mean \pm SEM (n=3)	1.2 \pm 0.0	13.0 \pm 0.9	
Hemicellulose ((g 100 g⁻¹ DM))	F1	18.0 \pm 1.0 ^{a,B}	31.6 \pm 0.2 ^{b,A}	24.8 \pm 3.1
	F2	17.9 \pm 0.2 ^{a,B}	39.9 \pm 0.5 ^{a,A}	28.9 \pm 4.9
	Mean \pm SEM (n=3)	17.9 \pm 0.5	35.76 \pm 1.88	
Lignin (g 100 g⁻¹ DM)	F1	57.4 \pm 1.6 ^{a,A}	27.7 \pm 0.8 ^{a,B}	42.6 \pm 6.7
	F2	33.3 \pm 0.5 ^{b,A}	17.7 \pm 1.1 ^{b,B}	25.5 \pm 3.6
	Mean \pm SEM	45.4 \pm 5.4	22.7 \pm 2.3	
<i>Monosaccharides</i>				

Table 1 (continued)

Glucose (g 100 g⁻¹ DM)	F1	23.3 ± 0.3 ^{a,A}	23.8 ± 0.4 ^{a,A}	23.6 ± 0.2
	F2	24.5 ± 0.1 ^{a,A}	23.2 ± 0.4 ^{a,A}	23.9 ± 0.4
	Mean ± SEM	23.9 ± 0.3	23.5 ± 0.3	
Xylose (g 100 g⁻¹ DM)	F1	12.8 ± 0.2 ^{b,A}	12.9 ± 0.11 ^{a,A}	12.8 ± 0.1
	F2	13.5 ± 0.2 ^{a,A}	12.5 ± 0.1 ^{a,A}	13.0 ± 0.2
	Mean ± SEM	13.1 ± 0.2	12.7 ± 0.1	
Arabinose (g 100 g⁻¹ DM)	F1	2.2 ± 0.1	1.9 ± 0.0	2.0 ± 0.1 ^a
	F2	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.0	2.0 ± 0.0 ^a
	Mean ± SEM	2.1 ± 0.1 ^A	1.9 ± 0.0 ^B	
Gallactose (g 100 g⁻¹ DM)	F1	Nd	nd	
	F2	Nd	nd	
	Mean ± SEM			
Mannose (g 100 g⁻¹ DM)	F1	Nd	nd	
	F2	Nd	nd	
	Mean ± SEM			

Lower case letters indicate differences between granulometric fractions and upper case letters indicate differences in the micronization process. F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm); TDF: total dietary fiber; IDF: insoluble dietary fiber; SDF: soluble dietary fiber; DM: dry matter; nd: not detected. Results are mean ± standard error of mean (n= 3). The composition of defatted olive pomace before granulometric fractionation was (g 100 g⁻¹ DM): 76.9 ± 0.6 TDF, 71.7 ± 2.1 IDF, and 5.2 ± 1.5 SDF.

In addition to the changes in IDF and SDF content, granulometric fractionation and micronization also changed the composition of IDF. Granulometric fractionation produced two new powdered materials with the same amount of cellulose and hemicellulose but different content of lignin (Table 1). Granulometric fractionation of OP promoted a partial separation of stones (mainly concentrated in F1) and pulp (mainly concentrated in F2). This may explain the differences in fiber components, and higher content of lignin in F1. Micronization of OP fractions caused a great decrease (at least 50%) in lignin content for both F1 and F2 after grinding. While lignin levels reduced, the cellulose and hemicellulose contents remained constant regardless of sieve fractionation, but increased after micronization. For cellulose and hemicellulose, micronization was effective to break the structures that composes the fibrous complex, with consequent exposure of these compounds. Thus, the exposure of hemicellulose and cellulose make them more soluble in neutral and acid detergents, which explains the increase of these fractions. In contrast, lignin content decreased after micronization, suggesting that lignin may have been released from the cell wall particles where it is usually associated to cellulose and hemicellulose. Micronization of corn straw has been shown to cause a small reduction of lignin, which was suggested to be destroyed by ball milling [29]. Some physical or chemical processes can solubilize the low-molecular weight lignin fragments with the breakage of lignin-carbohydrate bonds [3]. This can be confirmed with the solubility improvement and increase of polyphenols of micronized OP fractions [5]. Lignin breakage is desirable to increase the nutritional applications of this olive by-product as lignin is not digested by the human gastrointestinal tract and does not have the nutritional benefits of soluble fiber [30].

OP fractions (F1 and F2) had no differences in the composition of monosaccharides, which are the monomer units that form the undigestible carbohydrates found in dietary fiber (Table 1). Micronization of OP fractions also did not modify the composition of monosaccharides of F1 or F2. The main monosaccharides found in all samples were glucose, xylose and arabinose. Mannose and galactose were not detected in OP fractions. Glucose and xylose have also been shown to be the major components in a study of dry fractionation of OP but the content was different from our results, likely due to differences in the cultivars and methods of extraction of olive oil [31].

3.2 Particle size

Particle size reduction was important to improve the functional properties and bioaccessibility of polyphenols in the IDF from rice bran [32]. In our study, F1 and F2 before grinding were distributed over a wide range of particle diameters, reaching up to 1800 μm . The highest occurrence of particle size in F1 was within the range of 500 to 1000 μm , while F2 presented higher volume in the range of 0 to 900 μm . F1 before grinding had higher average particle size (317 μm) than F2 (265 μm) because the olive stones were more predominant in F1. Thus, granulometric fractionation modified the composition of OP fractions, due to the high hardness of stones, F1 had greater resistance to particle breakage in conventional milling, which yielded its greater particle size.

Micronization modified the particle size of OP fractions, reducing considerably the average size and causing a standardization in the distribution of particle size for F1 and F2 after grinding (Figure 1B). The higher concentration of particles for both samples was within the range from 0 to 40 μm after superfine grinding. F1 after grinding had an average particle size of 17.8 μm that slightly higher than that of F2, which amounted to 15.6 μm . The condition of micronization used in this study (300 r min^{-1} during 5 h) were sufficient to reduce the average particle size by ~ 17 times for both samples (F1 and F2) after grinding. F2 was composed mainly by pulp and small stone fragments, which are easier to break [33] and allow it to attain lower particle size after grinding than F1. The best condition for micronization depends on the material resistance. Carrot IDF required 10 h of ball milling to attain the average particle size of ~ 12 μm , whereas 12 h were required for lotus powder to reach 8 μm [20,34].

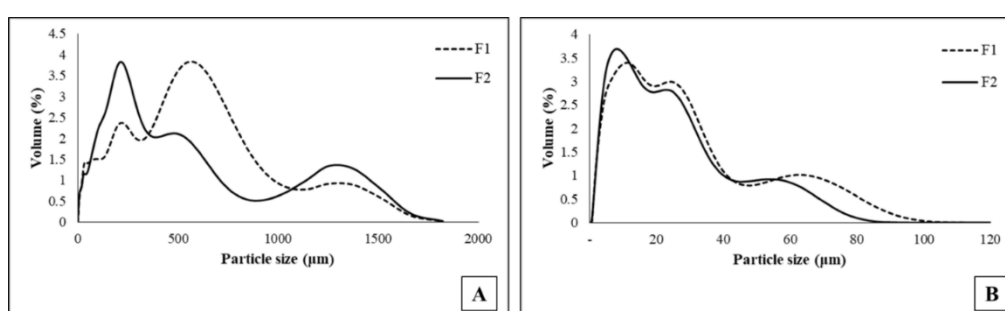


Figure 1. Effect of micronization on the particle size reduction of granulometric fractions of olive pomace.

A: Fraction 1 (F1; particles > 2 mm) and Fraction 2 (F2; particles < 2 mm) before superfine grinding. B: F1 and F2 after superfine grinding. Results were obtained in triplicate.

3.3 Technological and functional properties

WHC is related to the ability of fiber to retain water when an external force is applied [19]. F2 before grinding had higher WHC than F1 before grinding (Table 2). Micronization of F1 fraction increased WHC. Samples with higher amount of hydrophilic groups can form hydrogen bonds and bind more strongly the water molecules [35]. The size and composition of particles are responsible for modifications in this property [36]. However, micronization caused a small reduction of this property in F2 after grinding. Superfine grinding may cause a collapse in fiber matrix, reducing its ability to maintain the water trapped inside the matrix. This property is related to the structure, density and number and nature of water-binding sites and particle size [37,20]. Micronization also promoted a reduction of WHC in barley grass powder [38] but an increase in WHC in wheat flour [36].

Table 2. Effect of granulometric fractionation and micronization on the technological and functional properties of olive pomace.

	Granulometric Fractionation	Micronization		
		Before Grinding	After Grinding	Mean \pm SEM (n=3)
WHC (g H ₂ O g ⁻¹ DM)	F1	1.3 \pm 0.0 ^{b,B}	2.7 \pm 0.0 ^{a,A}	2.0 \pm 0.4
	F2	2.8 \pm 0.0 ^{a,A}	2.5 \pm 0.0 ^{b,B}	2.7 \pm 0.1
	Mean \pm SEM	2.1 \pm 0.4	2.6 \pm 0.1	
Solubility (%)	F1	10.9 \pm 0.5	15.1 \pm 0.5	13.0 \pm 1.3 ^b
	F2	20.2 \pm 0.8	24.8 \pm 0.3	22.5 \pm 1.4 ^a
	Mean \pm SEM	15.5 \pm 2.7 ^B	20.0 \pm 2.8 ^A	
OHC (g oil g ⁻¹ DM)	F1	0.6 \pm 0.0 ^{b,B}	1.3 \pm 0.0 ^{a,A}	1.0 \pm 0.2
	F2	1.5 \pm 0.0 ^{a,A}	1.1 \pm 0.0 ^{b,B}	1.3 \pm 0.1
	Mean \pm SEM	1.0 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	
Bulk density (g mL ⁻¹)	F1	0.7 \pm 0.0 ^{a,A}	0.5 \pm 0.0 ^{a,,B}	0.6 \pm 0.1
	F2	0.3 \pm 0.0 ^{b,B}	0.5 \pm 0.0 ^{a,A}	0.4 \pm 0.1
	Mean \pm SEM	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	
CEC (mg Cu g ⁻¹ DM)	F1	4.1 \pm 0.0 ^{b,B}	5.8 \pm 0.0 ^{b,A}	5.0 \pm 0.5
	F2	6.4 \pm 0.2 ^{a,A}	6.8 \pm 0.1 ^{a,A}	6.6 \pm 0.2
	Mean \pm SEM	5.3 \pm 0.7	6.3 \pm 0.3	

Lower case letters indicate differences between granulometric fractions and upper case letters indicate differences in the micronization process. F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm); WHC: Water holding capacity; OHC: oil holding capacity; CEC: cation exchange capacity; DM: dry matter. Results are mean \pm standard error of mean (n= 3).

Granulometric fractionation remarkably increased water solubility of F2 compared to F1, which is in agreement with the higher content of SDF in this fraction. The redistribution of fiber fractions, from insoluble to soluble, is also responsible for increasing water solubility.

Micronization increased the porosity and capillary attraction of fiber and consequently modified powder solubility [39]. Moreover, micronization reduced the particle size (Figure 1) and increased the surface area (Figure 2), which can increase the solubilization of cell wall constituents as well as some proteins [20]. Micronization has also been shown to improve the solubility of isolated and crude products, such as trans-resveratrol and lotus node powders [40,34].

OHC is related to the ability of entrapping oil molecules within the fiber and can be used to stabilize foodstuffs and emulsions, besides promoting beneficial health effects by reducing intestinal absorption of cholesterol [20]. F2 had higher OHC than F1 (Table 2). Micronization improved OHC for F1 after grinding, but caused a small reduction for F2 after grinding. This property is related to the bulk density of fibrous materials. A reduction of bulk density causes an increase of OHC because micronization modifies the porosity of fiber and favors the entrapment of oil within the matrix [20]. In agreement, we found lower bulk density for F2 than F1 before grinding (Table 2) but micronization reduced bulk density of F1 and increased this property for F2, confirming the changes observed in OHC.

Cation exchange capacity (CEC) is related to the lipid metabolism because the fiber matrix can absorb bile salts and interrupt the stability of lipid micelles during digestion, reducing the absorption of lipids and cholesterol due to the formation of undigested fiber-micelle complex [41]. This mechanism can reduce the number of intact micelles in the organism, modifying lipid absorption [20]. Before grinding, F2 had higher CEC than F1 (Table 2). Micronization increased CEC in F1 after grinding but did not change CEC for F2 after grinding. These results are related to the SDF content [42]. Therefore, samples with higher SDF content have higher CEC potential. Micronization have also been shown to increase the CEC for IDF of citrus due to the increase of SDF content [43]. These results indicate that OP fractions and micronized OP fractions can be used as functional food ingredients or dietary fiber sources in food formulations or pharmaceutical products.

3.4 Scanning electron microscopy and Fourier transform-infrared spectrometry (FT-IR)

Micronization of OP fractions modified the morphology of granules as shown in the SEM micrographs (Figure 2). Ball milling visually changed the shape of F1 and F2 granules. After grinding, granules became smaller and had more fractures and irregularities in surface, visually analysed. Differences in the size of granules were also observed (Figure 2), in agreement with particle size data (Figure 1). After superfine grinding, F1 and F2 granules had

a rough appearance. Micronization of sweet potato peels has been shown to change the shape of granules to a more irregular and poly angular appearance but the surface did not suffer injuries neither had rough appearance [39]. Similar microstructural alterations were observed after superfine grinding of rice bran IDF and these changes have been suggested to be responsible for the improvement of functional properties of DF [32].

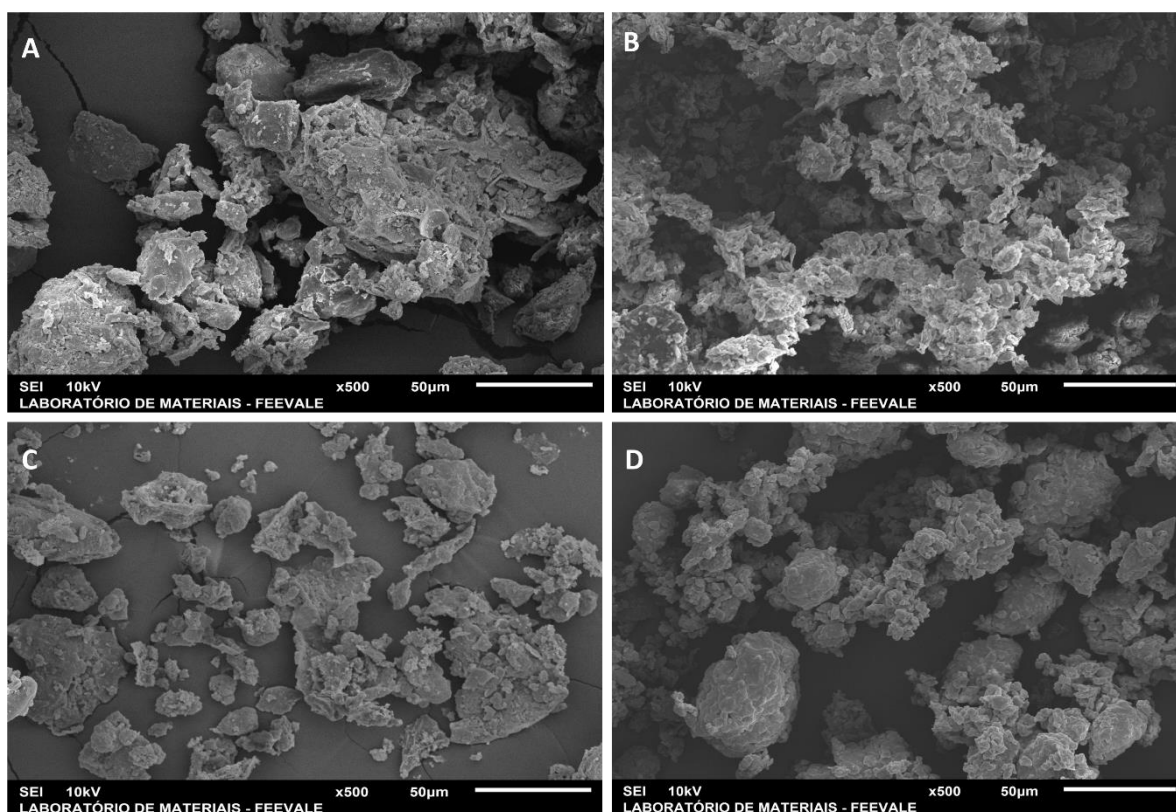


Figure 2. SEM images of granulometric and micronized fractions of olive pomace. A: Fraction 1 (F1; particles > 2 mm) before superfine grinding; B: F1 after superfine grinding; C: Fraction 2 (F2; particles < 2 mm) before superfine grinding; D: F2 after superfine grinding.

The FT-IR spectra of OP fractions before and after micronization are displayed in Figure 3. F1 and F2 had similar spectrum pattern with different intensities of absorption. F2 had an absorption band in the region of 2852 cm^{-1} . This spectral region indicates the presence of vibrations of C-H stretch of methylene groups of polysaccharides, and is related to cellulose and hemicelluloses [44]. Micronization caused changes in the spectral profile of powders (Figure 3). It was observed that the micronization has increased the spectral absorption of both samples, because grinding promotes the exposure of functional groups, facilitating the access to the corresponding groups. F1 and F2 after grinding had increased absorption of infrared radiation in the region 3328 cm^{-1} , which is possibly caused by higher vibrations of O-H associated to polymers [45]. Higher absorbance in 1746 cm^{-1} region for F2 after grinding

indicates a C=O stretch commonly recognized as vibrations of acetyl ester and uronic groups provided by hemicelluloses or ester linkage of carboxyl groups of ferulic or p-coumaric acids also provided by hemicelluloses or lignin. It can be related to the increase of SDF and reduction of lignin content [44]. F1 and F2 both after grinding showed higher intensity of this band. The reduction of particle size increased the wavenumber of 1032 cm^{-1} and 1030 cm^{-1} bands from F1 and F2, respectively. These bands were displaced to 1036 cm^{-1} and 1032 cm^{-1} bands in F1 and F2 after grinding, respectively. Changes of wavenumber can indicate the breakage of intramolecular hydrogen bonds of cellulose and hemicellulose to form cellulose and soluble saccharides, respectively. Then, superfine grinding did not alter the main functional groups of cellulose, the modifications can occur only for the carbon polymer chain [45]. Micronization increased the signal intensity for F1 and F2 after grinding in this band ($\sim 1030 \text{ cm}^{-1}$). These results are in agreement with data found for the changes in lignin, hemicellulose and cellulose contents. Then, micronization of OP fractions is a simple and effective method to improve the functionality of dietary fiber and release compounds of low utilization by the organisms, such as lignin exposing other compounds with higher functionality such as cellulose and hemicellulose. Then, these findings indicate that the application of OP fractions must be further studied.

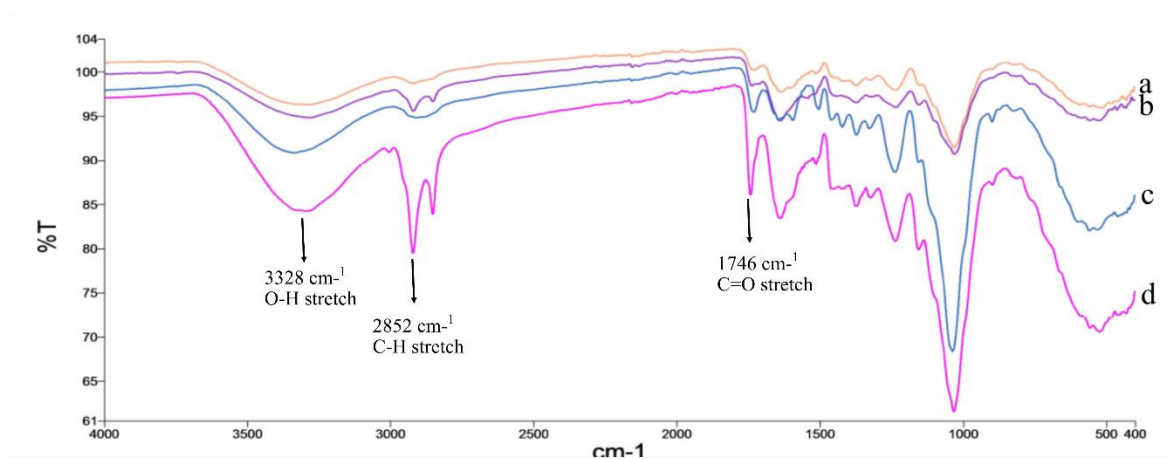


Figure 3. FT-IR spectra of granulometric micronized fractions of olive pomace. a: Fraction 1 (F1; particles > 2 mm) before superfine grinding; b: Fraction 2 (F2; particles < 2 mm) before superfine grinding; c: F1 after superfine grinding; d: F2 after superfine grinding.

4 Conclusions

Granulometric fractionation is a simple method to obtain an OP-derived powder product that is rich in soluble dietary fiber, the sample that presented particles < 2 mm in granulometric

fractionation process. Micronization is an effective process to increase the content of soluble dietary fiber and consequently to change the composition of insoluble fiber by reducing lignin content and increasing cellulose and hemicellulose content of defatted OP fractions. The modifications in granule morphology confirm that micronization process is able to improve technological and functional properties of the novel powders from OP agroindustrial waste.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) [grant number 435932/2018-7], CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) [Finance Code 001] and Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul [grant number DCIT 41/2017]. We thank to Olivais da Fonte Company (Formigueiro, RS, Brazil) for the kind donation of olive pomace.

References

- [1] Z. Kirbas, Kumcuoglu, S., Tavman, S., Effects of apple, orange and carrot pomace powders on glutenfree batter rheology and cake properties, *J Food Sci Technol*, 56 (2) (2019) 914-926.
- [2] A.B.B. Bender, C.S. Speroni, P.R. Salvador, B.B. Loureiro, N.M. Lovatto, F.R. Goulart, M.T. Lovatto, M.Z. Miranda, L.P. Silva, N.G. Penna, Grape pomace skins and the effects of its inclusion in the technological properties of muffins, *J Culinary Sci & Technol*, 15 (2016) 143-157.
- [3] M.A. Nunes, F.B. Pimentel, A.S.G. Costa, R.C. Alves, M.B.P.P. Oliveira, Olive by-products for functional and food applications: Challenging opportunities to face environmental constraints, *Innov Food Sci Emerg Technol*, 35 (2016) 139-148.
- [4] S. Dermeche, M. Nadour, C. Larroche, F. Moulti-Mati, P. Michaud, Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies, *Proc Biochem*, 48 (2013) 1532-1552.
- [5] C.S. Speroni, J. Stiebe, D.R. Guerra, A.B. Beutinger Bender, C.A. Ballus, D.R. dos Santos, F.D.P. Morisso, L.P. da Silva, T. Emanuelli, Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace, *Ind Crops Prod*, 137 (2019) 347-355.
- [6] M. Bunzel, A. Schussler, G. Tchetssebu Saha, Chemical characterization of Klason lignin preparations from plant-based foods, *J Agric Food Chem*, 59 (2011) 12506-12513.

- [7] C.M. Galanakis, Olive fruit dietary fiber: components, recovery and applications, *Trends Food Sci Technol*, 22 (2011) 175-184.
- [8] D. Mudgil, S. Barak, Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: a review, *Int J Biological Macromolec*, 61 (2013) 1-6.
- [9] M. Elleuch, D. Bedigian, O. Roiseux, S. Besbes, C. Blecker, H. Attia, Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: characterisation, technological functionality and commercial applications: a review, *Food Chem*, 124 (2011) 411-421.
- [10] X.-Y. Zhao, Q. Ao, L.-W. Yang, Y.-F. Yang, J.-C. Sun, G.-S. Gai, Application of superfine pulverization technology in biomaterial industry, *J of Taiwan Inst of Chem Eng*, 40 (2009) 337-343.
- [11] T. Chen, M. Zhang, B. Bhandari, Z. Yang, Micronisation and nanosizing of particles for an enhanced quality of food - a review, *Crit Rev Food Sci Nutr*, (2016) 993-1001.
- [12] B. Du, F. Zhu, B. Xu, Physicochemical and antioxidant properties of dietary fibers from Qingke (hull-less barley) flour as affected by ultrafine grinding, *Bioact Carb Dietary Fibre*, 4 (2014) 170-175.
- [13] C.-F. Chau, Y.-L. Wen, Y.-T. Wang, Improvement of the functionality of a potential fruit insoluble fibre by micron technology, *Int J Food Sci Technol*, 41 (2006) 1054-1060.
- [14] K. Zhu, S. Huang, W. Peng, H. Qian, H. Zhou, Effect of ultrafine grinding on hydration and antioxidant properties of wheat bran dietary fiber, *Food Res Int*, 43 (2010) 943-948.
- [15] F.R. Goulart, C.S. Speroni, N.D.M. Lovatto, B.B. Loureiro, V. Corrêia, J. Radünz Neto, L.P.d. Silva, Atividade de enzimas digestivas e parâmetros de crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com farelo de linhaça *in natura* e demucilada, *Semina: Ci Agr*, 34 (2013) 3069.
- [16] AOAC, Association of Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International, 16 th ed., Washington (1995), pp 1018 p.
- [17] H.K.V.S. Goering, P. J. Van Soest, Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications), USDA, Washington, (1970), .
- [18] A. Sluiter, B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, D. Crocker, Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass., National Renewable Energy Laboratory, Technical Report, 1617 (2008) 1-16.
- [19] A. Femenia, A.C. Lefebvre, J.Y. Thebaudin, J.A. Robertson, C.M. Bourgeois, Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber, *J Food Sci*, (62) (4) (1997) 635-639.
- [20] C.-F. Chau, Y.-T. Wang, Y.-L. Wen, Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre, *Food Chem*, 100 (2007) 1402-1408.
- [21] M.I. McBurney, P. Van Soest, L.E. Chase, Cation exchange capacity and buffering capacity of neutral-detergent fibres, *J Sci Food Agric*, 34 (1983), 910-916.

- [22] E. Capuano, The behavior of dietary fiber in the gastrointestinal tract determines its physiological effect, *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57 (2017), 3543-3564.
- [23] F. Lu, J. Rodriguez-Garcia, I. Van Damme, N.J. Westwood, L. Shaw, J.S. Robinson, G. Warren, A. Chatzifragkou, S. McQueen Mason, L. Gomez, L. Faas, K. Balcombe, C. Srinivasan, F. Picchioni, P. Hadley, D. Charalampopoulos, Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions, *Cur Opin Green Sustain Chem*, 14 (2018) 80-88.
- [24] M.D.P. Masli, B.A. Rasco, G.M. Ganjyal, Composition and physicochemical characterization of fiber-rich food processing byproducts, *J Food Sci*, 83 (2018) 956-965.
- [25] A.P. Daniel, V.C. Bochi, C. Steffens, L.P. da Silva, T. Emanuelli. Fracionamento a seco da farinha de aveia e modificação química da fração rica em amido. *Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 26 (4) (2006), 936-943.
- [26] C. Segundo, L. Roman, M. Gomez, M.M. Martinez, Mechanically fractionated flour isolated from green bananas (*M. cavendishii* var. *nanica*) as a tool to increase the dietary fiber and phytochemical bioactivity of layer and sponge cakes, *Food Chem*, 219 (2017) 240-248.
- [27] F. Zhu, B. Du, J. Li, Effect of ultrafine grinding on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from wine grape pomace, *Food Sci Technol Int*, 20 (2014) 55-62.
- [28] J.L.S. He, Q. He, H. Jian, Y. Zhang, J. Wang, H. Sun, Physicochemical and antioxidant properties of hard white winter wheat (*Triticum aestivum* L.) bran superfine powder produced by eccentric vibratory milling, *Powder Technol*, 325 (2018) 126-133.
- [29] M. Wu, F. Gao, D.-M. Yin, Q. Luo, Z.-Q. Fu, Y.-G. Zhou, Processing of superfine grinding corn straw fiber-reinforced starch film and the enhancement on its mechanical properties, *Polymers*, 10 (8) (2018) 1-16.
- [30] S. Ma, B. Ren, Z. Diao, Y. Chen, Q. Qiao, X. Liu, Physicochemical properties and intestinal protective effect of ultra-micro ground insoluble dietary fibre from carrot pomace, *Food Funct*, 7 (2016) 3902-3909.
- [31] S. Lammi, A. Barakat, C. Mayer-Laigle, D. Djenane, N. Gontard, H. Angellier-Coussy, Dry fractionation of olive pomace as a sustainable process to produce fillers for biocomposites, *Powder Technol*, 326 (2018) 44-53.
- [32] G. Zhao, R. Zhang, L. Dong, F. Huang, X. Tang, Z. Wei, M. Zhang, Particle size of insoluble dietary fiber from rice bran affects its phenolic profile, bioaccessibility and functional properties, *LWT*, 87 (2018) 450-456.
- [33] G. Rodriguez-Gutierrez, F. Rubio-Senent, A. Lama-Munoz, A. Garcia, J. Fernandez-Bolanos, Properties of lignin, cellulose, and hemicelluloses isolated from olive cake and olive stones: binding of water, oil, bile acids, and glucose, *J Chem*, 62 (2014) 8973-8981.
- [34] S. Hussain, J. Li, W. Jin, S. Yan, Q. Wang, Effect of micronisation on dietary fibre content and hydration properties of lotus node powder fractions, *Int J Food Sci Technol*, 53 (2018) 590-598.
- [35] Y. Niu, Q. Xia, M. Gu, L. Yu, Interpenetrating network gels composed of gelatin and soluble dietary fibers from tomato peels, *Food Hydrocol*, 89 (2019) 95-99.

- [36] S. Protonotariou, A. Drakos, V. Evageliou, C. Ritzoulis, I. Mandala, Sieving fractionation and jet mill micronization affect the functional properties of wheat flour, *J Food Eng*, 134 (2014) 24-29.
- [37] F.C. Guillon, M., Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology, *Food Res Int*, 33 (2000) 233-245.
- [38] X. Cao, M. Zhang, A.S. Mujumdar, Q. Zhong, Z. Wang, Effect of nano-scale powder processing on physicochemical and nutritional properties of barley grass, *Powder Technol*, 336 (2018) 161-167.
- [39] C.-C. Huang, Y.-F. Chen, C.-C. Wang, Effects of micronization on the physico-chemical properties of peels of three root and tuber crops, *J Sci Food Agric*, 90 (2010) 759-763.
- [40] G.P.S. Aguiar, B.D. Arcari, L.M.P.C. Chaves, C.D. Magro, D.L. Boschetto, A.L. Piato, M. Lanza, J.V. Oliveira, Micronization of trans-resveratrol by supercritical fluid: Dissolution, solubility and in vitro antioxidant activity, *Ind Crops Prod*, 112 (2018) 1-5.
- [41] S.Y. Lim, P.Y. Tham, H.Y.L. Lim, W.S. Heng, Y.P. Chang, Potential functional byproducts from guava puree processing, *J Food Sci*, 83 (2018) 1522-1532.
- [42] Y.L. Huang, Y.S. Ma, The effect of extrusion processing on the physicochemical properties of extruded orange pomace, *Food Chem*, 192 (2016) 363-369.
- [43] F. Ye, B. Tao, J. Liu, Y. Zou, G. Zhao, Effect of micronization on the physicochemical properties of insoluble dietary fiber from citrus (*Citrus junos* Sieb. ex Tanaka) pomace, *Food Sci Technol Int*, 22 (2016) 246-255.
- [44] X. Luo, Q. Wang, D. Fang, W. Zhuang, C. Chen, W. Jiang, Y. Zheng, Modification of insoluble dietary fibers from bamboo shoot shell: Structural characterization and functional properties, *Int J of Biol Macromol*, 120 (2018) 1461-1467.
- [45] Q. Meng, H. Fan, F. Chen, T. Xiao, L. Zhang, Preparation and characterization of *Dendrobium officinale* powders through superfine grinding, *J Sci Food Agric*, 98 (2018) 1906-1913.

Supplementary material

Granulometric fractionation and micronization: a process to increase soluble dietary fiber content and to improve technological and functional properties of olive pomace

Caroline Sefrin Speroni^a, Ana Betine Beutinger Bender^a, Jessica Stiebe^a, Cristiano Augusto Ballus^a, Patrícia Felix Ávila^b, Rosana Goldbeck^b, Fernando Dal Pont Morisso^c, Leila Picolli da Silva^d, Tatiana Emanuelli^a

^aDepartment of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bSchool of Food Engineering, University of Campinas – UNICAMP, Monteiro Lobato Street no 80, University City, 13083-862, Campinas, SP, Brazil.

^cInstitute of Health Sciences, Feevale University, Vila Nova, 93510-330, Novo Hamburgo, RS, Brazil.

^dDepartment of Animal Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Corresponding author. Tel: +55 55 3220 8596

E-mail address: tatiana.emanuelli@ufsm.br

Table S1. Experimental design for the optimization of milling conditions (rotational speed and time), obtained response (IDF/SDF ratio) and ANOVA results.

Treatments	Variables			Response	
	Rotational speed (min ⁻¹)	speed (r)	Time (h)	IDF/SDF	
				After Grinding	
				F1	F2
Control	0		0	87.1	6.3
1	300		3	58.4	7.4
2	500		3	49.9	22.2
3	300		5	12.0	3.2
4	500		5	86.9	10.2
5	400		4	115.0	11.3
6	400		4	105.2	12.1
7	400		4	84.7	12.7
8	259		4	115.5	13.3
9	541		4	78.6	72.5
10	400		2.59	15.7	10.5
11	400		5.41	14.0	9.3

F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm); IDF: insoluble dietary fiber; SDF: soluble dietary fiber.

Table S2. ANOVA results of FI/FS response observed after micronization.

Sample	Indicated model	Significative		coefficients			Regression			Model fit (p > 0.05)
		standard error		A (rotational speed)	B (time)	AB	A ²	B ²	significance (p < 0.05)	
F1AG*	2FI	79.2	± 18.8	± 15.5	± 54.8	-	-	-	0.2279	
		16.6	19.5	19.5	27.5					
	Mean	79.2 ± 8.6	-	-	-	-	-	-	0.0517	
	Mean	16.8 ± 5.7	-	-	-	-	-	-	0.0011	
F2AG*	Quadratic	12.0 ± 8.1	13.2 ± 5.0	-2.2 ± 5.0	-1.9 ± 7.1	11.5 ± 5.9	-5.0 ± 5.9		0.1563	

*Two models was indicated for both the samples, but none model was significant. F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm). F1AG: Fraction 1 (particles > 2 mm) after micronization; F2AG: Fraction 2 (particles < 2 mm) after micronization.

4.3 MANUSCRITO 3:

MICRONIZATION INCREASES THE BIOACCESSIBILITY OF POLYPHENOLS FROM GRANULOMETRICALLY SEPARATED OLIVE POMACE FRACTION

Manuscrito configurado nas normas do periódico Journal of Functional Foods

Micronization increases the bioaccessibility of polyphenols from granulometrically separated olive pomace fractions

Caroline Sefrin Speroni^a, Daniela Rigo Guerra^a, Ana Betine Beutinger Bender^a, Jessica Stiebe^a, Cristiano Augusto Ballus^a, Leila Picolli da Silva^b, Jesús Lozano-Sánchez^{c,d}, Tatiana Emanuelli^a

^aDepartment of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^bDepartment of Animal Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

^cDepartment of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain.

^dResearch and Development of Functional Food Centre (CIDAF), Bioregion building, PTS Granada, Avda. del Conocimiento s/n, 18016 Granada, Spain.

Abstract

Micronization of granulometrically fractionated olive pomace (OP) has been recently demonstrated to increase the amount of free phenolic compounds. The objective of this study is to investigate the effect of micronization of granulometric fractions of OP on the bioaccessibility of polyphenols and antioxidant capacity during *in vitro* digestion. Crude OP was separated in 2-mm sieve yielding two fractions (F1: > 2 mm; F2: < 2 mm) that were micronized (300 r min⁻¹/5 h) yielding F1AG and F2AG. Samples were submitted to *in vitro* digestion and the transformation of phenolic compounds was assessed after salivary, gastric and intestinal digestion *in vitro*. Salivary phase released polyphenols of all samples and micronization was efficient to increase the amount of polyphenols released. Acidic pH under gastric conditions caused the highest release of phenolic compounds from micronized samples. F1AG had high bioaccessibility for hydroxytyrosol. Oleuropein, luteolin and apigenin remained intact along digestion. Micronized samples and F2 had remarkably high antioxidant capacity in the gastric phase, whereas F2AG exhibited the highest antioxidant capacity in the non-absorbed intestinal fraction, which is the one that will reach the colon. Micronization of olive pomace fractions increased the release of phenolic compounds already under simulated salivary and gastric conditions besides increasing antioxidant capacity during digestion. These results indicate that micronization can be further exploited to improve the nutraceutical properties of olive pomace.

Keywords: antioxidants, *in vitro* digestibility, phenolic compounds, solubility, superfine grinding.

1. Introduction

Olive oil industry generates large amount of olive pomace (OP) that is rich in pulp, peel and stones (Dermeche, Nadour, Larroche, Moulti-Mati, & Michaud, 2013). OP has high amount of bioactive compounds, such as dietary fiber and polyphenols (Lozano-Sánchez et al., 2017; Speroni et al., 2019) but also has large amount of lignin, which limits its nutraceutical use (Rodriguez-Gutierrez, Rubio-Senent, Lama-Munoz, Garcia, & Fernandez-Bolanos, 2014; Speroni et al., 2019).

Many strategies have been investigated to improve the composition and characteristics of agroindustrial wastes, targeting them to a specific use, such as industrial enzymes production, nutraceutical source, nanoparticles development and even as ingredient substitutes in food formulations (Bender et al., 2016; Ravindran & Jaiswal, 2016).. Solvent-free methods that generate little or no wastes have been prioritized (Chemat, Vian, & Cravotto, 2012). Micronization is an eco-friendly method that can modify the physical and chemical characteristics of various pomaces, such as grape, olive and carrot insoluble fiber by reducing their particles to micrometer dimensions (Chau, Wang, & Wen, 2007; Speroni et al., 2019; Zhu, Du, & Li, 2014). This size reduction can be achieved by ball milling through the friction caused by the contact of balls with the sample. Micronization has been demonstrated to increase the content of soluble dietary fiber, the extractability of phenolic compounds and, consequently, increase the antioxidant capacity in OP (Speroni et al., 2019). In addition, we have recently demonstrated that long-time micronization of OP fractions is an useful approach to improve the quality of dietary fiber by increasing soluble dietary fiber content and reducing lignin content (Speroni et al., unpublished data).

Although micronization of fruit and vegetable wastes have been shown to improve physical and functional properties of the generated powders, the impact of this procedure on the fate of nutrients during digestion have been neglected. Thereby, most studies involving agroindustrial residues indicate the inclusion of these products (modified or not) in the human diet, but did not investigate the fate of compounds during human digestion (Majerska et al., 2019). OP contains many bioactive compounds, mostly phenolics, that are of great interest for human health, such as hydroxytyrosol, oleuropein, luteolin, caffeic acid, oleoside and others (Chanoti & Tzia, 2018; Di Nunzio et al., 2018; Lozano-Sánchez et al., 2017). These compounds are recognized as potential antioxidants, besides exhibiting other beneficial health effects such as the cardioprotective effects of hydroxytyrosol (Shahidi & Ambigaipalan, 2015) and the antitumoral, gastro-protective and anti-inflammatory effects of oleuropein (Catalan et

al., 2016; Hassen, Casabianca, & Hosni, 2015). Health effects depend on the bioaccessibility of bioactive compounds, which is the amount of ingested nutrient that is soluble and therefore potentially available for gut absorption after digestion (Parada & Aguilera, 2007). The bioaccessibility of phenolic compounds may be affected by food-matrix interactions, which will ultimately determine their prone to be released by the chemical, physical and enzymatic processes that comprise food digestion. Increasing evidence indicates that besides interacting with food proteins, phenolic compounds also interact with dietary fiber constituents (polysaccharides and lignin) through non-covalent binding (Jakobek & Matic, 2019). This association between phenolic compounds and dietary fiber is expected to affect the bioaccessibility of phenolic compounds but this process is not completely understood (Jakobek & Matic, 2019). Physicochemical conditions change according to the stage of digestion and they can affect the structure and antioxidant capacity of phenolic compounds, which are known to be poorly absorbed in the gastrointestinal tract (Rein et al., 2013; Tagliazucchi, Verzelloni, Bertolini, & Conte, 2010). Despite being known for their high antioxidant capacity, the systemic biological effects of phenolic compounds are unlikely associated to a direct radical scavenging effect, because plasma and tissue concentrations after intestinal absorption are much lower than the one required for such effect (Hollman et al., 2011; Rubio, Motilva, & Romero, 2013). Nevertheless, the concentration of phenolic compounds inside the gastrointestinal tract during food digestion may reach levels required for a direct antioxidant effect (Han et al., 2007), which would be beneficial in gastrointestinal disorders associated to oxidative stress such as gastric ulcer or inflammatory bowel diseases (Maurer et al., 2019). Therefore, the objective of this study is to investigate the effect of micronization of granulometric fractions of OP on the *in vitro* bioaccessibility of phenolic compounds and to characterize the changes in their composition and antioxidant capacity during *in vitro* digestion.

2. Materials and methods

2.1 Sample preparation

OP was obtained from *Olea europaea L.* cv. 'Arbequina' in the agroindustry of virgin olive oil located in Formigueiro city, RS, Brazil (29°59'01"S; 53°21'50"W). Samples were collected immediately after the extraction of olive oil by the biphasic centrifugation method and stored at -18°C until it was processed in the laboratory. Granulometric separation was performed as described by (Speroni et al. (2019)), using a 2 mm-sieve. After the granulometric

separation processes, two samples were generated: F1 (particles > 2 mm) and F2 (particles < 2 mm). F1 and F2 were grounded in a knife mill (Marconi®, MA 630 model, Brazil) and defatted using n-hexane (Goulart et al., 2013).

Micronization of F1 and F2 was performed using a high impact planetary ball mill (Retsch Co, Germany, PM 100 model), with a stainless steel jar (250 mL of capacity) and six balls. Ball milling conditions were based on our previous study that estimated the best condition to reduce IDF/SDF ratio for F1 and F2 (Speroni et al., unpublished data). Then, 15 grams of samples were micronized in the high impact ball mill at 500 r min⁻¹ for 5 h. After micronization of F1 and F2, two new samples were obtained: F1AG and F2AG. Thus, four samples were used in this study, namely F1, F2, F1AG and F2AG, which had respectively the following soluble dietary fiber content: 0.9, 9.9, 0.6 and 15.8 g/100 g dry matter.

2.2 Static *in vitro* digestion method

The simulated gastrointestinal static *in vitro* digestion was performed as described by Minekus et al. (2014). The experiment sequentially simulates all phases of digestion, starting with oral phase, followed by gastric and intestinal phases. After intestinal digestion, samples were centrifuged to separate the potentially absorbable fraction (AF), which comprises the soluble fraction that is available for absorption (bioaccessible) and the non-absorbable fraction (NAF), which comprises the insoluble fraction that will not be available for absorption and will reach intact the large bowel. Three independent runs were conducted for each sample.

For the salivary digestion (S), 5-g samples (F1, F2, F1AG and F2AG) were incubated in a simulated salivary fluid (pH= 7), containing 75 U/mL α -amylase under stirring at 37°C for 2 min. Thereafter, the pH of the digested content was adjusted to approximately 3 (using 1 M HCl) and the gastric phase (G) was simulated by adding 7.5 mL of simulated gastric fluid and pepsin (2500 U/mL) to a final volume of 20 mL, followed by incubation at 37 °C under agitation for 2 h. After that, to simulate the intestinal step, the pH of the mixture was adjusted to pH 7, using 1 M NaOH, followed by addition of 11 mL of simulated intestinal fluid, 800 U/mL pancreatin solution and bile salts solution. Incubation media was adjusted to 50 mL and samples were incubated at 37 °C for 2 h. Thereafter, samples were centrifuged (1700 × g, 10 min) to separate the supernatant (AF) and solid residue (NAF) fractions. Samples were stored in liquid nitrogen before the analysis of phenolic compounds and antioxidant capacity. Enzymes and bile salts were obtained from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO).

2.3 UHPLC-MS analysis of phenolics and other related compounds

Phenolics and other related compounds were extracted from undigested OP fractions and from samples of all phases of digestion using methanol:water (75:25 v/v) as described by Lozano-Sanchez et al. (2011). Samples were filtered with a PTFE filter (0.22 µm) before the injection in the ultra high performance liquid chromatograph (UHPLC) system.

Phenolic compounds were quantified using a triple-quadrupole Shimadzu UHPLC Mass Spectrometer (LCMS-8045; Japan). The UHPLC was equipped with a binary pump, degasser, communication module, oven column and an automatic injector. Samples were injected (10 µL) onto a reverse-phase column Shim-pack C-18 XR-ODS (2.2 µm; 30 x 2 mm) at 25 °C. Mobile phases were water with 0.25% acetic acid (mobile phase A) and methanol (mobile phase B) at 0.2 mL/min. The gradient elution was set as follows: 5% B from 0 to 1 min; 35% B from 1 to 2 min; 60% B from 2 to 4 min; 95% B from 4 to 5 min; 60% B from 5 to 6 min; 20% B from 6 to 6.5 min; and 5% B from 6.5 to 7 min. The triple-quadrupole mass spectrometer was used to quantify the phenolic compounds in MRM spectrum mode. The equipment was operated with an Electrospray Ionization Source (ESI), with the following conditions: interface temperature of 300 °C, heating gas flow at 10 L/min, nebulizing gas flow at 3 L/min, drying gas flow at 10 L/min, interface voltage of 3000 V.

Calibration curves were constructed using commercial standards of hydroxytyrosol, oleuropein, luteolin, apigenin and caffeic acid (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO). These compounds were quantified in the samples and results were expressed as mg of phenolic compound per 5 g of sample. Secoiridoids, such decarboxymethyl oleuropein aglycone (3,4-DHPEA-EDA) were quantified as equivalents of oleuropein.

2.4 Bioaccessibility index, recovery index and residual intestinal digesta index

The bioaccessibility was calculated as the amount of phenolic compounds in the AF samples in relation to the amount of phenolic compounds found in the undigested (U) samples, according to following formula:

$$\text{Bioaccessibility} = \frac{\text{Absorbable fraction}}{\text{Undigested fraction polyphenols}} \times 100$$

The recovery index was obtained as the percent of phenolic compounds found in the total content digested (absorbable (AF) + non-absorbable (NAF) fractions) in relation to undigested samples, according to the formula:

$$\text{Recovery index} = \frac{(\text{AF} + \text{NAF})}{\text{Undigested fraction polyphenols}} \times 100$$

The residual intestinal digesta index (RID) represents the amount of phenolic compounds that will not be available for absorption and will attain the large bowel. RID was calculated as the percent of phenolic compounds in the non-absorbable fraction (NAF) relative to the undigested (U) samples:

$$\text{Residual intestinal digesta index} = \frac{\text{NAF}}{\text{Undigested fraction polyphenols}} \times 100$$

2.5 Antioxidant capacity analysis

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) was determined as described by Ou, Hampsch-Woodill, and Prior (2001). This method measures the peroxy radical scavenging capacity of antioxidant extracts assessed as their ability to inhibit the loss of fluorescein fluorescence caused by AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). The results were expressed as mmol equivalents of trolox per 5 g of sample.

2.6 Statistical analyses

Two-way ANOVA (95% of confidence level) was used to assess the recovery index, bioaccessibility and residual intestinal digesta index followed by post hoc Tukey's test. Three-way ANOVA (95% of confidence level) followed by the post hoc Tukey's test was used to assess changes in the content of phenolic compounds during the phases of *in vitro* digestion and antioxidant capacity of *in vitro* digestion. Data obtained from undigested samples and each *in vitro* digestion steps of F1, F2, F1AG and F2AG were from three independent assays for each sample. Principal component analysis (PCA) was run using Pirouette Software Pirouette version 3.11 (Infometrix, USA) to discriminate samples according to their changes in the content of polyphenols along the digestion phases.

3. Results and discussion

3.1 Bioaccessibility and transformation of phenolic compounds during *in vitro* digestion

Olive phenolic compounds are of great interest for human nutrition due to its protective effects against cardiovascular diseases, cancer and obesity (Karkovic Markovic, Toric, Barbaric, & Jakobusic Brala, 2019). Changes in the content of phenolic compounds during the *in vitro* digestion of granulometrically separated and micronized OP can be observed in Figure 1. Before digestion, hydroxytyrosol, oleuropein and 3,4-DHPEA-EDA were found at higher content in F1 than F2, F1AG and F2AG. In addition, luteolin, apigenin and caffeic acid were found at higher content in F1 and F2 than in F1AG and F2AG. Micronization caused a reduction in the content of all compounds due to long time of sample milling (5 hours), suggesting a change of polyphenols composition due to or thermal degradation (Uribe et al., 2013) or lower extractability due to the formation of covalent or non-covalent bonds with other food matrix constituents (Jakobek & Matic, 2019). Even with the drop of phenolic content, long-time micronization caused a significant increase of soluble dietary fiber in F1AG and F2AG (11 and ~2.5 times, respectively) and therefore it is an interesting process to improve functional properties of OP fractions (data not shown). Moreover, long times of micronization reduced the lignin content of olive pomace (data not shown), which along with the change in soluble fiber, can influence on the bioaccessibility of phenolic compounds. We have assessed the effect of granulometric fractionation and long-term micronization on the digestibility of phenolic compounds from OP.

In salivary phase (S), luteolin and apigenin content was increased for all samples (F1, F2, F1AG and F2AG) compared to the undigested samples (Figure 1). In contrast, hydroxytyrosol and oleuropein were not dissolved in the salivary phase only in F1 and F2 samples, while caffeic acid and 3,4-DHPEA-EDA were not dissolved in the salivary phase only for F2 and F1 samples, respectively, when compared to the undigested samples. Although micronized samples (F1AG and F2AG) had lower amounts of phenolic compounds than the non-micronized samples (F1 and F2) before digestion, micronization significantly increased the release of hydroxytyrosol (F1AG and F2AG) and oleuropein (F2AG), luteolin (F1AG and F2AG), apigenin (F1AG and F2AG), caffeic acid (F1AG and F2AG) and 3,4-DHPEA-EDA (F1AG and F2AG) during the salivary phase compared to the undigested samples. As can be observed, micronization was able to increase the release of phenolic compounds from

granulometric fractions of OP under the simulated salivary conditions (Ucar & Karadag, 2019), which is an interesting effect as the absorption of phenolic compounds may start in the mouth. Secoiridoids, an important group of polyphenols found in virgin olive oil, such as hydroxytyrosol, oleuropein and derivatives have high stability during oral digestion (Quintero-Florez et al., 2018) and our results indicate that micronization further increased such stability.

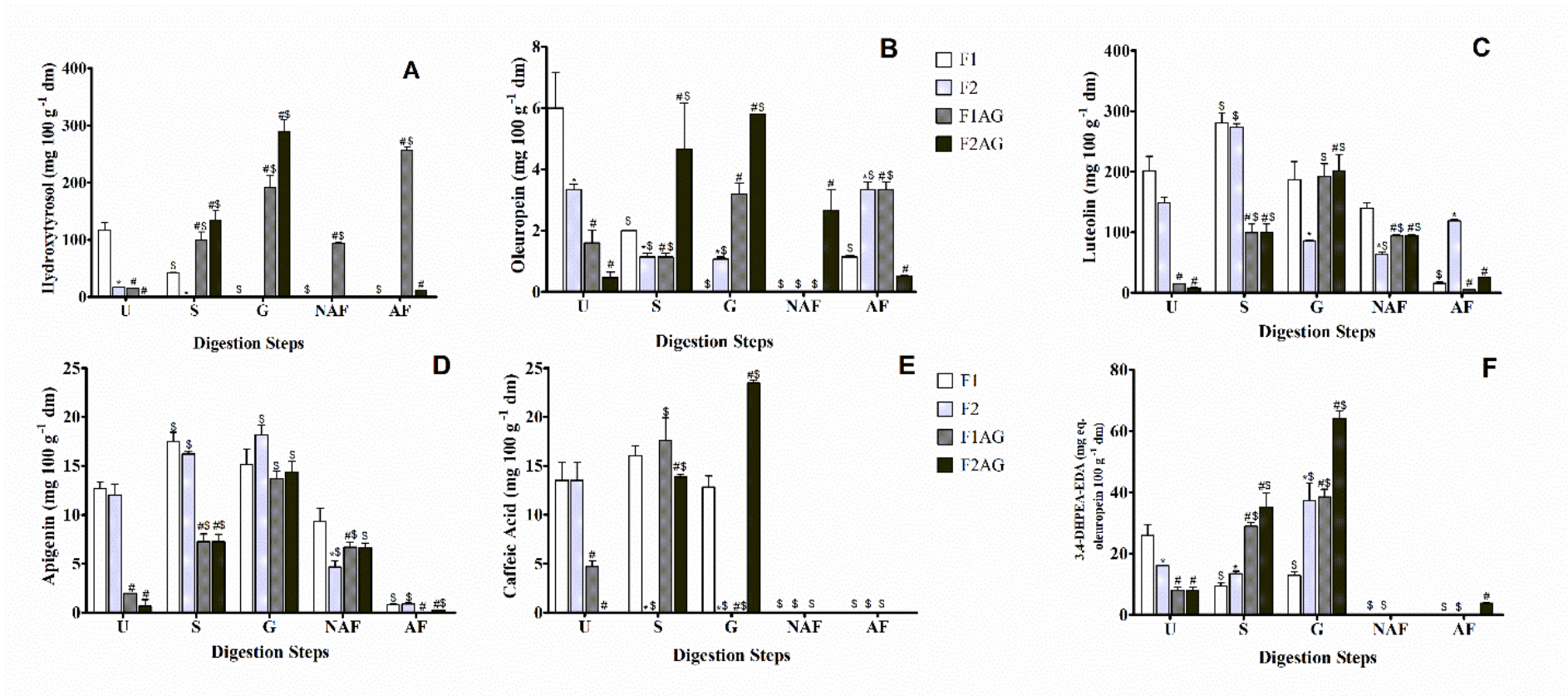


Figure 1. Content of extractable phenolic compounds (mg 5 g⁻¹ of dry matter) from granulometrically separated and micronized OP fractions during the different phases *in vitro* gastrointestinal digestion.

*Different from F1 in the same digestion step. #Different from the respective fraction after grinding in the same digestion phase. \$Different from the respective undigested sample. Tukey's test ($p < 0.05$). dm: dry matter, F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm); F1AG: F1 after micronization; F2AG: F2 after micronization. U: undigested sample, S: salivary phase; G: gastric phase; NAF: non-absorbable fraction in the intestinal phase; AF: absorbable fraction in the intestinal phase. 3,4-DHPEA-EDA: decarboxymethyl oleuropein aglycone.

Hydroxytyrosol from F1 and F2 samples was not detected in the gastric phase. However, the hydroxytyrosol of micronized samples (F1AG and F2AG) were significantly increased during the gastric phase, compared to the undigested, indicating that acid gastric conditions favors the release of hydroxytyrosol bound to OP matrix. Thereafter, hydroxytyrosol from F1AG was still available for absorption (dissolved) in the intestinal phase as it was selectively concentrated in the intestinal absorbable fraction. Although hydroxytyrosol from F2AG was found at lower concentrations in the intestinal phase, it was still found in the intestinal absorbable fraction. Recovery index, bioaccessibility and RID index of hydroxytyrosol can be observed in Table 1. Micronized samples (F1AG and F2AG) had higher recovery index and bioaccessibility than the non-micronized ones, indicating that micronization increased the amount of soluble hydroxytyrosol after intestinal digestion phase, which represents the fraction potentially available for absorption ($p < 0.05$). Only F1AG presented a RID index, which represents the fraction of phenolic compounds that will reach large bowel, is in agreement with the high value found in the non-absorbable fraction for this compound. Phenolic alcohols such as hydroxytyrosol and tyrosol in olive oil samples presented the highest values of bioaccessibility in different olive cultivars (Quintero-Florez et al., 2018). The authors suggested that compounds of secoiridoids group were hydrolyzed during digestion and it resulted in an increase of bioaccessibility (Quintero-Florez et al., 2018). Our data suggest that the micronization of F1AG may have contributed to increase of hydrolysis of secoiridoids in this sample.

Oleuropein from F1 had low dissolution during the gastric phase ($p < 0.05$) but it was still found at low amount in the absorbable fraction after the intestinal phase. Oleuropein from F2 was unchanged in the gastric phase compared to the oral phase and was found at high amount in the absorbable fraction after the intestinal phase. In addition, micronization facilitated the release of significant amount of oleuropein in the gastric phase (F1AG and F2AG). After the intestinal phase, oleuropein from F1AG was largely recovered in the absorbable fraction, whereas for F2AG a major amount was found in the non-absorbable fraction. Oleuropein of F1 had lower recovery index (~20.3 %) compared to F2 (~100.7 %), indicating that F2 presented a significative content of oleuropein throughout *in vitro* digestion ($p < 0.05$). Micronization increased the recovery index of F1AG (~246.5 %) and decreased the recovery index of F2AG (~ 65.5 %). Oleuropein from F2 had higher bioaccessibility than F1 ($p < 0.05$). However, micronization contributed to increase the bioaccessibility of oleuropein in

F1AG, reaching values similar to F1, F1AG and F2AG. This fact is explained by changes in food matrix, that may facilitate the release of oleuropein during digestion (Gonzalez et al., 2019). RID index was obtained only for F2AG, which indicates the presence of this compound in the non-absorbable fraction that can also exert antioxidant properties in the colon prior to the transformation by microbial fermentation or fecal elimination (Yu et al., 2019). Considerable amount of oleuropein was also found after gastric and duodenal digestion of olive leaves, indicating the stability of this compound even during digestion (Martin-Vertedor, Garrido, Pariente, Espino, & Delgado-Adamez, 2016). The stability of oleuropein under digestive conditions aggregates value to micronized OP fractions, because this compound is recognized by the positive effects on health, such as antiviral, cardioprotective and antioxidant properties (Sahin & Bilgin, 2018).

Luteolin from F1 underwent a small decrease during gastric and intestinal digestion, and was largely concentrated in the non-absorbable fraction. Luteolin from F2 had a similar behavior except that it was concentrated in the absorbable fraction. Although the micronized OP samples (F1AG and F2AG) had lower amounts of luteolin than F1 and F2 before digestion, luteolin was easily released from these samples in the gastric phase, yielding levels equal or higher than non-micronized samples. Luteolin from micronized samples had a small decrease during the intestinal phase but was remarkably concentrated in the non-absorbable fraction. The recovery index of luteolin was affected by granulometric fractionation, being higher for F2 (~123 %) than F1 (~78%) (Table 1). Micronization did not change luteolin recovery index, indicating that the particle size reduction not change the chemical structure of luteolin. Luteolin has been shown to exhibit low bioaccessibility from fermented table olives (about 3 %) (D'Antuono et al., 2018) and microparticles of olive leaf extract (Gonzalez et al., 2019) which is agreement with our data for F1.

However, the bioaccessibility of luteolin was 10 times higher for F2 than F1, indicating an effect of granulometric fractionation (Table 1). Micronization caused a further increase in the bioaccessibility of luteolin for F2AG, but did not change bioaccessibility for F1AG. These results are in agreement with the increase of luteolin content in the absorbable fraction of F2 and F2AG. Granulometric fractionation also modified the RID index (Table 1), which was higher for F1 (~70.2 %) than F2 (~43.1 %). Micronization increase RID index in F2AG, which confirm the increase of luteolin content in non-absorbable fraction.

Apigenin from F1 and F2 was unchanged during the gastric phase but underwent small degradation or lower release in the intestinal phase and most apigenin was concentrated in the non-absorbable fraction after intestinal digestion. Although the micronized OP samples (F1AG

and F2AG) had lower amounts of apigenin than F1 and F2 before digestion, this compound was easily released from these samples in the gastric phase, yielding levels equal to non-micronized samples. Apigenin from micronized samples had a small decrease during the intestinal phase but it was remarkably concentrated in the non-absorbable fraction. The recovery index of apigenin was not affected by granulometric fractionation or micronization ($p > 0.05$; Table 1). Low bioaccessibility rates were found for apigenin in all samples (Table 1), which is in agreement with the low bioaccessibility of apigenin from virgin olive oil (Quintero-Florez et al., 2018). However, micronization increased the bioaccessibility of F2AG compared to F2 ($p < 0.05$). RID index was not affected by granulometric fractionation or micronization in all samples ($p > 0.05$). The high RID index and low bioaccessibility values indicate that apigenin was concentrated in non-absorbable fraction.

Caffeic acid from F2 samples was not detected in the salivary phase, whereas for F1 and F2AG samples this compound was unchanged until the intestinal phase, when it was not detected anymore. No caffeic acid was found in the intestinal phase in any sample. For this reason, recovery index, bioaccessibility or RID index were not detected (Table 1). Caffeic acid underwent a reduction of dissolution in the gastric phase and consequently was not detected in the intestinal phase. Data on the digestibility of phenolic acids from virgin olive oils, revealed that caffeic acid was not dissolved in the gastric and intestinal phases (Quintero-Florez et al., 2018). Caffeic acid from cocoa powder also presented low stability in the intestinal phase, demonstrating that caffeic acid can act only until the gastric phase (Ortega, Reguant, Romero, Macia, & Motilva, 2009). In the gastric phase, caffeic acid was still present only in F2AG, which can be related to the food matrix, that may have been modified by micronization process, subsequently affecting the bioaccessibility of phenolic acids (Wang, He, & Chen, 2014).

In the gastric phase, 3,4-DHPEA-EDA (decarboxymethyl oleuropein aglycone) was increased in F2 and F2AG but remained unchanged in F1 and F1AG compared to the salivary phase. 3,4-DHPEA-EDA was not detected in the intestinal phase in all samples except for F2AG that had a small amount of 3,4-DHPEA-EDA in the absorbable fraction after intestinal digestion. In tests using low pH (similar of the stomach), this compound revealed a high stability (Pinto et al., 2011), confirming the data obtained for F2 and F2AG in the gastric phase. Recovery index and bioaccessibility were calculated only for F2AG (Table 1) as no 3,4-DHPEA-EDA was detected in the intestinal phase for the other samples. Accordingly, low bioaccessibility values have been previously reported for 3,4-DHPEA-EDA from extracts prepared of olive cake and virgin olive oils (about 5 % for both) (Quintero-Florez et al., 2018; Rubio et al., 2014). However, it is remarkable that micronization was able to yield high

bioaccessibility value for 3,4-DHPEA-EDA from F2AG (~80%) (Table 1). As no result for RID index was obtained, this indicate the absence of 3,4-DHPEA-EDA in non-absorbable fraction for all samples (Table 1).

Table 1. Recovery index, bioaccessibility and residual intestinal digestion index of phenolic compounds from olive pomace fractions assessed before and after micronization.

Phenolic Compounds	Recovery index (%)				Bioaccessibility (%)				RID index (%)			
	Before grinding		After grinding		Before grinding		After grinding		Before grinding		After grinding	
	F1	F2	F1AG	F2AG	F1	F2	F1AG	F2AG	F1	F2	F1AG	F2AG
Hydroxytyrosol	0.4 ± 0.0 ^{a,B}	2.9 ± 0.1 ^{a,B}	493.6 ± 18.2 ^{b,A}	5460.0 ± 97.0 ^{a,A}	0.2 ± 0.0 ^{a,B}	1.4 ± 0.1 ^{a,B}	361.0 ± 11.8 ^{b,A}	5360.0 ± 97.5 ^{a,A}	0.2 ± 0.0 ^{b,A}	1.4 ± 0.1 ^{a,A}	132.6 ± 6.5 ^{a,A}	0.0 ± 0.0 ^{b,A}
Oleuropein	20.3 ± 3.6 ^{b,B}	100.7 ± 6.5 ^{a,A}	246.5 ± 4.6 ^{a,A}	65.5 ± 5.5 ^{b,B}	20.3 ± 3.6 ^{b,B}	100.7 ± 6.5 ^{a,A}	164.0 ± 48.6 ^{a,A}	121.9 ± 13.5 ^{a,A}	0.0 ^{a,A}	0.0 ^{a,A}	0.0 ^{b,B}	74.4 ± 7.2 ^{a,A}
Luteolin	77.9 ± 4.7 ^{b,A}	123.6 ± 8.0 ^{a,A}	86.0 ± 0.6 ^{a,A}	122.9 ± 18.3 ^{a,A}	8.4 ± 0.7 ^{b,A}	80.5 ± 4.4 ^{a,B}	5.5 ± 0.9 ^{b,A}	310.0 ± 38.7 ^{a,A}	70.2 ± 4.0 ^{a,A}	43.1 ± 4.5 ^{b,B}	82.1 ± 1.1 ^{b,A}	121.8 ± 8.6 ^{a,A}
Apigenin	117.2 ± 11.1 ^{a,A}	100.8 ± 11.9 ^{a,A}	96 ± 16.9 ^{a,A}	97.3 ± 16.2 ^{a,A}	7.2 ± 1.2 ^{a,A}	15.6 ± 2.8 ^{a,B}	0.0 ^{b,A}	36.5 ± 4.1 ^{a,A}	109.9 ± 10.0 ^{a,A}	85.2 ± 11.4 ^{a,A}	96.0 ± 17.0 ^{a,A}	93.9 ± 15.8 ^{a,A}
Caffeic Acid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Decarboxymethyl oleuropein aglycone	0.0 ^{a,A}	0.0 ^{a,B}	0.0 ^{b,A}	81.3 ± 6.4 ^{a,A}	0.0 ^{a,A}	0.0 ^{a,B}	0.0 ^{b,A}	81.3 ± 6.4 ^{a,A}	0.0	0.0	0.0	0.0

Lower case letters indicate differences between granulometric fractions and upper case letters indicate differences in the micronization process for the same parameter (recovery index, bioaccessibility and residual intestinal digestion index). F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm); Results are mean ± standard error of mean (n= 3). RID: Residual intestinal index. For samples that had hydroxytyrosol and caffeic acid levels lower than the quantification limit in the undigested samples, the limit of detection for these compounds was adopted to calculate digestive recovery index, bioaccessibility and RID index. Limit of detection for hydroxytyrosol: 0.0002 µg/ mL. Limit of detection for caffeic acid: 0.0001 µg/ mL.

Micronization was particularly effective to promote the release of phenolic compounds in the gastric phase. The increase of polyphenols in the gastric phase of digestion has been previously observed for mushrooms and grape pomace extract that had not been micronized, indicating that the acidic pH and digestive enzymes can facilitate the release of phenolic compounds from some food matrices (Beres et al., 2019; Ucar & Karadag, 2019). Low pH values have been shown to increase the stability of some phenolic compounds, i.e. caffeic acid, and to reduce the ratio of deprotonated/protonated functional groups of dietary fiber, which will be expected to reduce the repulsion between dietary fiber molecules and affect their association with phenolic compounds (Jakobek & Matic, 2019).

Our results reveal that micronization likely facilitates the hydrolysis of complex polyphenols or matrix-bound/entrapped polyphenols at acidic pH. Hydroxytyrosol can be increased at acidic conditions due to the hydrolysis of conjugated compounds. The intestinal phase was separated in the absorbable fraction (AF, supernatant) and the non-absorbable fraction (NAF, solid residue) by centrifugation. The low content of hydroxytyrosol, apigenin, caffeic acid and 3,4-DHPEA-EDA in AF demonstrates the lability of these compounds under digestive pH and enzymatic conditions (Viuda-Martos et al., 2018). Only micronized samples had hydroxytyrosol detected in the AF fraction, the highest bioaccessibility being observed for F1AG (361%). Extracts of olive cake also had higher amount of hydroxytyrosol in the fraction with potential to be absorbed than in the undigested samples (Rubio et al., 2014). Oleuropein did not undergo much degradation during digestion and was found in a soluble state in the final step of digestion (AF) yielding high bioaccessibility (Table 1) in F2, F1AG and F2AG (100.7, 164.0 and 104.7 %, respectively). Moreover, granulometric fractionation (F2 vs. F1 content) and micronization (F1AG vs. F1) were able to increase the amount of oleuropein in AF. F2AG was the unique sample that presented oleuropein in the non-absorbable fraction. Therefore, it can be inferred that oleuropein from olive pomace fractions is available for intestinal absorption, which is in agreement with a study that detected oleuropein and derivatives in the bloodstream 125 min after the intake of 30 mL of extravirgin olive oil (Suarez et al., 2011).

Granulometric fractionation (F2 vs. F1 and F2AG vs. F1AG) was also effective to increase luteolin content in the AF, resulting in 80.5% bioaccessibility for F2 and 310% for F2AG (Table 1). Apigenin was detected at very low amounts in the AF fraction and had low bioaccessibility for all samples. Caffeic acid suffered low dissolution during digestion and was not detected in the intestinal step, whereas 3,4-DHPEA-EDA was detected only in F2AG

samples. During the digestion of apples, the free form of caffeic acid was also not detected in the intestinal fluid (Bouayed, Deußer, Hoffmann, & Bohn, 2012). Most phenolic compounds of OP fractions were not dissolved during digestion, which is in agreement with the results obtained after *in vitro* digestion of grape and wine (Lingua, Theumer, Kruzyński, Wunderlin, & Baroni, 2019). However, oleuropein, luteolin and apigenin remained intact until reaching the intestinal stage.

Hydroxytyrosol from micronized samples had high recovery index, whereas for non-micronized samples it was almost completely degraded (Table 1). Luteolin and oleuropein presented higher values of recovery index for F2 than F1 and the overall recovery index for luteolin was relatively elevated for all samples (around 80-120%), demonstrating that this compound presents great stability throughout the digestion conditions. Apigenin also presented high recovery index for all samples. Caffeic acid was not recovered after simulated digestion. 3,4-DHPEA-EDA was recovered only in the F2AG samples. Then, micronization of F1 was effective to improve the bioaccessibility of hydroxytyrosol and oleuropein (F1 vs. F1AG), whereas for F2 micronization improved the recovery of hydroxytyrosol and 3,4-DHPEA-EDA (F2 vs. F2AG).

Luteolin and apigenin were the compounds of non-micronized samples that had a greatest fraction of the ingested amount being potentially able to reach the large bowel (RID index values, Table 1). Micronization increased the RID index for hydroxytyrosol from F1AG and for oleuropein from F2AG (Table 1).

3.2 Antioxidant capacity of *in vitro* digested samples

Antioxidant capacity was measured as the ability to scavenge peroxy radicals and had the following order for undigested samples: F1 = F2 = F2AG > F1AG (Figure 2). This result is in agreement with the content of phenolic compounds, such as hydroxytyrosol, oleuropein, luteolin, apigenin, caffeic acid and 3,4-DHPEA-EDA in samples. Then, long-time micronization decreased the content of phenolic compounds and consequently the antioxidant activity. Thermal degradation of phenolic compounds due to the frictional forces generated during milling may underline such effect.

Antioxidant capacity of all samples increased after salivary digestion compared to the undigested samples, while F2 and F2AG had the highest values. This can be explained by the pH of oral phase, which can modify the scavenging potential of some phenolic compounds, since some of these compounds are recognized to be released at the neutral pH found in mouth.

pH is responsible for modifying the structure and physicochemical characteristic of phenolic compounds such as some phenolic acids (Ydjedd et al., 2017). Phenolic compounds from black, green or white tea also demonstrated good stability under oral conditions and the authors suggested that salivar digestion can play a key role for polyphenols *in vitro* digestibility (Tenore, Campiglia, Giannetti, & Novellino, 2015). The digestion of food matrix by salivar α -amylase may be responsible for increasing the bioaccessibility of food components including phenolic compounds (Tenore, Campiglia, Ritieni, & Novellino, 2013). In fact, hydroxytyrosol, luteolin, apigenin and caffeic acid were increased in most samples during the salivary phase (Figure 1), which may have contributed to increase antioxidant capacity.

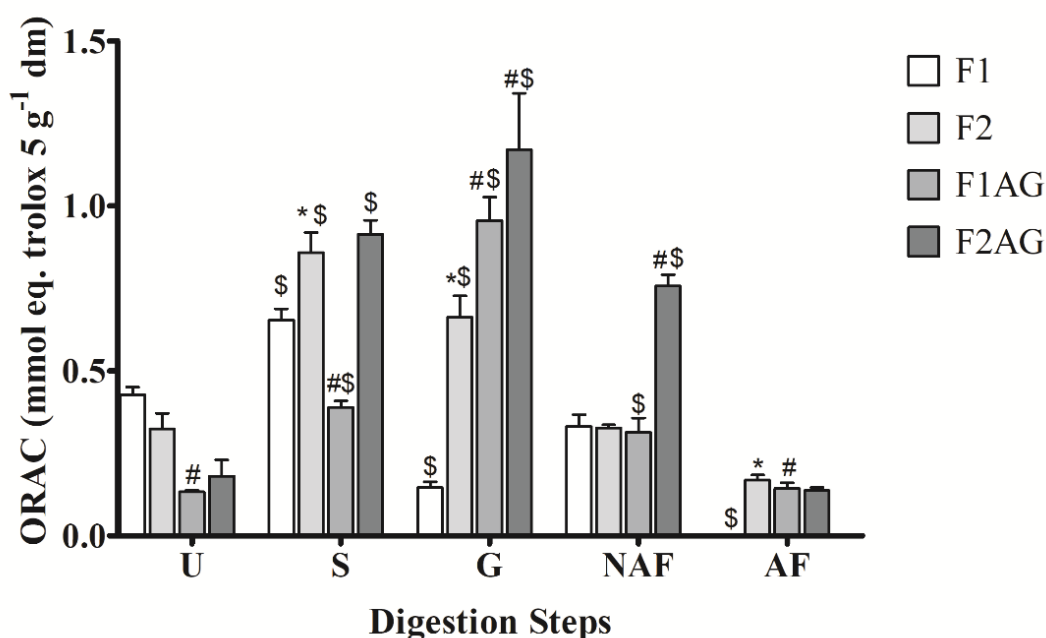


Figure 2. Antioxidant capacity in extractable polyphenols extracts from OP granulometrically separated and micronized during the *in vitro* digestion steps.

*Different from F1 in the same digestion step. #Different from the respective fraction before grinding in the same digestion step. \$Different from the respective undigested sample. Tukey's test ($p < 0.05$). dm: dry matter, F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm); F1AG: Fraction 1 (particles > 2 mm) after micronization; F2AG: Fraction 2 (particles < 2 mm) after micronization. U: undigested sample, S: salivary phase; G: gastric phase; NAF: non-absorbable phase; AF: absorbable phase.

After simulated gastric digestion, antioxidant capacity of non-micronized samples was reduced (F1) or unchanged (F2) compared to the salivary phase, whereas for micronized fractions (F1AG and F2AG) it was increased, exhibiting the highest level (Figure 2). This result can be explained by the content of: hydroxytyrosol, luteolin, apigenin and 3,4-DHPEA-EDA. We suggest that micronization favored the acidic hydrolysis of phenolic compounds, yielding

products of greater antioxidant capacity. Ripe and unripe carob pulp extracts also had an increase of ORAC values in the gastric phase. The authors demonstrate that acid pH causes racemization of some phenolic acids, with the formation of two chiral enantiomers that may present different biological reactivity, and consequently increase the antioxidant reactivity (Ydjedd et al., 2017). Then, it can be suggested that micronization facilitated the release of phenolic compounds in acidic media, enhancing antioxidant capacity under gastric conditions.

No antioxidant capacity was detected for the AF of F1. However, the AF of all other samples had similar capacity for scavenging peroxy radicals, that was similar to F2 and F1AG and F2AG. Dialyzed fractions of berries, grape pomace extract and grape pomace flour had lower ORAC values after *in vitro* digestion (Beres et al., 2019; Marhuenda et al., 2016). Non-absorbed fractions of F1, F2 and F1AG presented similar antioxidant capacity compared to the AF and undigested samples. F2AG had 2-fold higher antioxidant capacity in the NAF compared to the other samples in NAF and to the undigested one. This finding is possibly explained by oleuropein, which was found only in the NAF of F2AG. Oleuropein has great antioxidant potential, although its derivative, hydroxytyrosol, has even higher antioxidant capacity (Jilani, Cilla, Barberá, & Hamdi, 2016). The non-absorbable fraction will reach the colon. Then, the remarkable antioxidant capacity of F2AG in NAF deserves further investigation to determine its functional properties against colonic disorders associated to oxidative stress such as inflammatory bowel diseases. These results indicate that micronization is a green technology to improve nutraceutical properties of olive pomace fractions as it increased the antioxidant capacity of the absorbable fraction of F1, as well as of the non-absorbable fraction of F2.

3.3 Principal Component Analysis

Principal component analysis was used to determine the similarities in the metabolic profile of phenolic compounds for the different olive pomace fractions during digestion (Figure 3). The model used was constituted by four PC's and explained 94.2% of data. PC1 vs. PC2 analysis allowed to discriminate 5 different groups of samples, PC1 explaining 52.92% and PC2 explaining 24.09% of differences among samples. The absorbable fraction of F1AG was discriminated into a separate group (Figure 3A) that was directly correlated to the presence of higher amount of hydroxytyrosol and oleuropein as can be seen in loading graphs (Figure 3B). Samples from the salivary and gastric phases of F1 and F2 were grouped in a portion near to the terminal and in the bottom and were associated to higher amounts of luteolin and apigenin. Samples from the gastric phase of F2AG were grouped separately from the other samples and

were associated to higher concentrations of hydroxytyrosol, oleuropein, caffeic acid and 3,4-DHPEA-EDA compared to other samples. This behavior is related to the antioxidant capacity measured by ORAC, which was higher in the gastric phase of F2AG. Samples of F1 and F2 undigested, salivary phase of F1AG and F2AG and gastric phased of F1AG was grouped in the middle portion of graph. The group formed is related to higher amounts of caffeic acid in samples and medium values to hydroxytyrosol and oleuropein. Undigested F1AG and F2AG, non-absorbable fraction of F1, F2, F1AG, F2AG and absorbable fraction of F1 and F2 were grouped in the left middle of graph. Then, these results confirm that the micronization of F2 was an efficient method to improve antioxidant capacity under gastric conditions.

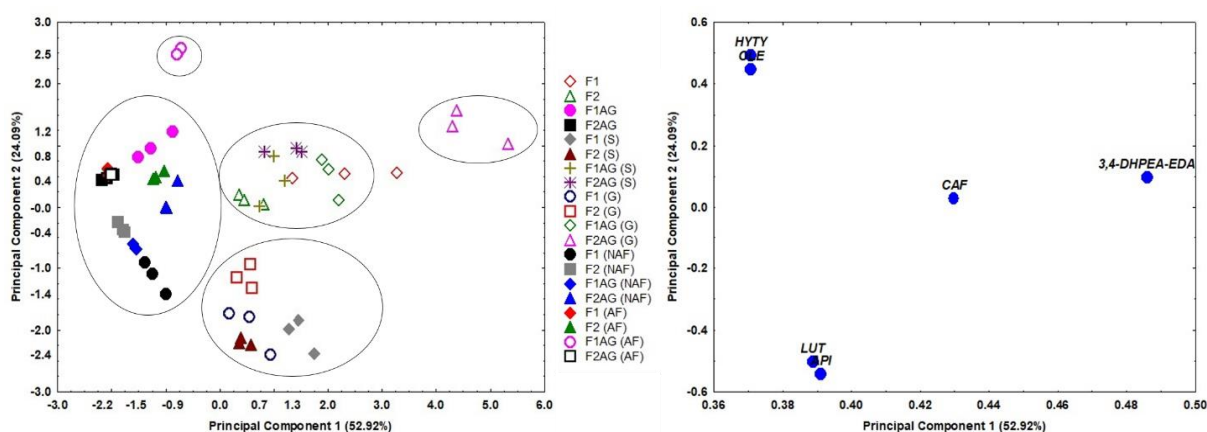


Figure 3. Principal component analysis (PCA) of phenolic compounds of undigested samples and after digestion steps of granulometric and micronized fractions of olive pomace. Scores (A) and correlations loading (B) plots of PCA analysis.

F1: Fraction 1 (particles > 2 mm); F2: Fraction 2 (particles < 2 mm); F1AG: Fraction 1 (particles > 2 mm) after micronization; F2AG: Fraction 2 (particles < 2 mm) after micronization. U: undigested sample, S: salivary phase; G: gastric phase; NAF: non-absorbable phase; AF: absorbable phase. F1 (S): salivary phase of fraction 1 (particles > 2 mm); F2 (S): salivary phase of fraction 2 (particles < 2 mm); F1AG (S): salivary phase of fraction 1 (particles > 2 mm); F2AG (S): salivary phase of fraction 2 (particles < 2 mm). F1 (G): gastric phase of fraction 1 (particles > 2 mm); F2 (G): gastric phase of fraction 2 (particles < 2 mm); F1AG (G): gastric phase of fraction 1 (particles > 2 mm); F2AG (G): gastric phase of fraction 2 (particles < 2 mm). F1 (NAF): non-absorbable phase of fraction 1 (particles > 2 mm); F2 (NAF): non-absorbable phase of fraction 2 (particles < 2 mm); F1AG (NAF): non-absorbable phase of fraction 1 (particles > 2 mm); F2AG (NAF): non-absorbable phase of fraction 2 (particles < 2 mm); F1 (AF): absorbable phase of fraction 1 (particles > 2 mm); F2 (AF): absorbable phase of fraction 2 (particles < 2 mm); F1AG (AF): absorbable phase of fraction 1 (particles > 2 mm); F2AG (AF): absorbable phase of fraction 2 (particles < 2 mm); HYTY: hydroxytyrosol; OLE: oleuropein; CAF: caffeic acid; 3,4-DHPEA-EDA: decarboxymethyl oleuropein aglicone; LUT: luteolin; API: apigenin.

Conclusions

Micronization of olive pomace fractions largely improved the release of phenolic compounds in the salivary and gastric phase of *in vitro* digestion and increased the

bioaccessibility of some phenolic compounds studied, such as hydroxytyrosol, oleuropein, luteolin and 3,4-DHPEA-EDA. Moreover, micronization increased the antioxidant capacity of olive pomace fractions in the gastric phase of digestion and yielded remarkably higher antioxidant capacity in the non-absorbable fraction of F2 after intestinal digestion, which may have colonic beneficial health effects. Then, micronization is an effective method to increase the bioaccessibility of phenolic compounds and antioxidant capacity of OP during digestion. Thus, particle size reduction is expected to increase the intestinal absorption of phenolic compounds from olive pomace fractions and can be further investigated as green technology to improve the nutraceutical properties of this agro-industrial waste.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) [grant number 435932/2018-7], CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) [Finance code 001] and Secretaria de Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul [grant number DCIT 41/2017]. We thank to Olivais da Fonte Company (Formigueiro, RS, Brazil) for the kind donation of olive pomace.

References

- Anson, N. M., Selinheimo, E., Havenaar, R., Aura, A. M., Mattila, I., Lehtinen, P., . . . Haenen, G. R. (2009). Bioprocessing of wheat bran improves in vitro bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, *57*(14), 6148-6155. doi: 10.1021/jf900492h
- Bender, A. B. B., Speroni, C. S., Salvador, P. R., Loureiro, B. B., Lovatto, N. M., Goulart, F. R., . . . Penna, N. G. (2016). Grape Pomace Skins and the Effects of Its Inclusion in the Technological Properties of Muffins. *Journal of Culinary Science & Technology*, *15*(2), 143-157. doi: 10.1080/15428052.2016.1225535
- Beres, C., Freitas, S. P., Godoy, R. L. d. O., de Oliveira, D. C. R., Deliza, R., Iacomini, M., . . . Cabral, L. M. C. (2019). Antioxidant dietary fibre from grape pomace flour or extract: Does it make any difference on the nutritional and functional value? *Journal of Functional Foods*, *56*, 276-285. doi: 10.1016/j.jff.2019.03.014
- Bouayed, J., Deußer, H., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2012). Bioaccessible and dialysable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns. *Food Chemistry*, *131*(4), 1466-1472. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.10.030
- Catalan, U., Rubio, L., Lopez de Las Hazas, M. C., Herrero, P., Nadal, P., Canela, N., . . . Sola, R. (2016). Hydroxytyrosol and its complex forms (secoiridoids) modulate aorta and heart proteome in healthy rats: Potential cardio-protective effects. *Mol Nutr Food Res*, *60*(10), 2114-2129. doi: 10.1002/mnfr.201600052

- Chanioti, S., & Tzia, C. (2018). Extraction of phenolic compounds from olive pomace by using natural deep eutectic solvents and innovative extraction techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 48, 228-239. doi: 10.1016/j.ifset.2018.07.001
- Chau, C.-F., Wang, Y.-T., & Wen, Y.-L. (2007). Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. *Food Chemistry*, 100(4), 1402-1408. doi: 10.1016/j.foodchem.2005.11.034
- Chemat, F., Vian, M. A., & Cravotto, G. (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *Int J Mol Sci*, 13(7), 8615-8627. doi: 10.3390/ijms13078615
- D'Antuono, I., Bruno, A., Linsalata, V., Minervini, F., Garbetta, A., Tufariello, M., . . . Cardinali, A. (2018). Fermented Apulian table olives: Effect of selected microbial starters on polyphenols composition, antioxidant activities and bioaccessibility. *Food Chem*, 248, 137-145. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.12.032
- Dermeche, S., Nadour, M., Larroche, C., Moulti-Mati, F., & Michaud, P. (2013). Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. *Process Biochemistry*, 48(10), 1532-1552. doi: 10.1016/j.procbio.2013.07.010
- Di Nunzio, M., Picone, G., Pasini, F., Caboni, M. F., Gianotti, A., Bordoni, A., & Capozzi, F. (2018). Olive oil industry by-products. Effects of a polyphenol-rich extract on the metabolome and response to inflammation in cultured intestinal cell. *Food Res Int*, 113, 392-400. doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.025
- Gonzalez, E., Gomez-Caravaca, A. M., Gimenez, B., Cebrian, R., Maqueda, M., Martinez-Ferez, A., . . . Robert, P. (2019). Evolution of the phenolic compounds profile of olive leaf extract encapsulated by spray-drying during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chem*, 279, 40-48. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.11.127
- Goulart, F. R., Speroni, C. S., Lovatto, N. D. M., Loureiro, B. B., Corrêia, V., Radünz Neto, J., & Silva, L. P. d. (2013). Atividade de enzimas digestivas e parâmetros de crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados com farelo de linhaça in natura e demucilada. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(6), 3069. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n6p3069
- Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007) Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.*, 8, 950-988. doi: 10.3390/i8090950
- Hassen, I., Casabianca, H., & Hosni, K. (2015). Biological activities of the natural antioxidant oleuropein: Exceeding the expectation – A mini-review. *Journal of Functional Foods*, 18, 926-940. doi: 10.1016/j.jff.2014.09.001
- Hollman, P. C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., . . . Vidry, S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr*, 141(5), 989S-1009S. doi: 10.3945/jn.110.131490
- Jakobek, L., & Matic, P. (2019). Non-covalent dietary fiber - polyphenol interaction and their influence on polyphenol bioaccessibility. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 235-247. doi: 10.1016/j.tifs.2018.11.024
- Jilani, H., Cilla, A., Barberá, R., & Hamdi, M. (2016). Improved bioaccessibility and antioxidant capacity of olive leaf (*Olea europaea* L.) polyphenols through biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. *Industrial Crops and Products*, 84, 131-138. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.02.002

- Karkovic Markovic, A., Toric, J., Barbaric, M., & Jakobusic Brala, C. (2019). Hydroxytyrosol, Tyrosol and Derivatives and Their Potential Effects on Human Health. *Molecules*, 24(10). doi: 10.3390/molecules24102001
- Kumar, K., Yadav, A. N., Kumar, V., Vyas, P., & Dhaliwal, H. S. (2017). Food waste: a potential bioresource for extraction of nutraceuticals and bioactive compounds. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). doi: 10.1186/s40643-017-0148-6
- Lingua, M. S., Theumer, M. G., Kruzynski, P., Wunderlin, D. A., & Baroni, M. V. (2019). Bioaccessibility of polyphenols and antioxidant properties of the white grape by simulated digestion and Caco-2 cell assays: Comparative study with its winemaking product. *Food Res Int*, 122, 496-505. doi: 10.1016/j.foodres.2019.05.022
- Lozano-Sánchez, J., Bendini, A., Di Lecce, G., Valli, E., Gallina Toschi, T., & Segura-Carretero, A. (2017). Macro and micro functional components of a spreadable olive by-product (pâté) generated by new concept of two-phase decanter. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(1), 1600096. doi: 10.1002/ejlt.201600096
- Lozano-Sanchez, J., Giambanelli, E., Quirantes-Pine, R., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., & Fernandez-Gutierrez, A. (2011). Wastes generated during the storage of extra virgin olive oil as a natural source of phenolic compounds. *J Agric Food Chem*, 59(21), 11491-11500. doi: 10.1021/jf202596q
- Majerska, J., Michalska, A., & Figiel, A. (2019). A review of new directions in managing fruit and vegetable processing by-products. *Trends in Food Science & Technology*, 88, 207-219. doi: 10.1016/j.tifs.2019.03.021
- Marhuenda, J., Alemán, M. D., Gironés-Vilaplana, A., Pérez, A., Caravaca, G., Figueroa, F., . . . Zafrilla, P. (2016). Phenolic Composition, Antioxidant Activity, and In Vitro Availability of Four Different Berries. *Journal of Chemistry*, 2016, 1-7. doi: 10.1155/2016/5194901
- Martin-Vertedor, D., Garrido, M., Pariente, J. A., Espino, J., & Delgado-Adamez, J. (2016). Bioavailability of Bioactive Molecules from Olive Leaf Extracts and its Functional Value. *Phytother Res*, 30(7), 1172-1179. doi: 10.1002/ptr.5625
- Maurer, L. H., Cazarin, C. B. B., Quatrin, A., Minuzzi, N. M., Costa, E. L., Morari, J., . . . Emanuelli, T. (2019). Grape peel powder promotes intestinal barrier homeostasis in acute TNBS-colitis: A major role for dietary fiber and fiber-bound polyphenols. *Food Res Int*, 123, 425-439. doi: 10.1016/j.foodres.2019.04.068
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Brodtkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct*, 5(6), 1113-1124. doi: 10.1039/c3fo60702j
- Ortega, N., Reguant, J., Romero, M. P., Macia, A., & Motilva, M. J. (2009). Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model. *J Agric Food Chem*, 57(13), 5743-5749. doi: 10.1021/jf900591q
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). <Ou et al. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe.pdf>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Parada, J., & Aguilera, J. M. (2007). Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *J Food Sci*, 72(2), R21-32. doi: 10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzalez, R., Sayas-Barbera, E., Fernandez-Lopez, J., Perez-Alvarez, J. A., & Viuda-Martos, M. (2018). Bioaccessibility of Phenolic Compounds and Antioxidant

- Capacity of Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *Plant Foods Hum Nutr*, 73(1), 47-53. doi: 10.1007/s11130-017-0649-7
- Pinto, J., Paiva-Martins, F., Corona, G., Debnam, E. S., Jose Oruna-Concha, M., Vauzour, D., . . . Spencer, J. P. (2011). Absorption and metabolism of olive oil secoiridoids in the small intestine. *Br J Nutr*, 105(11), 1607-1618. doi: 10.1017/S000711451000526X
- Quintero-Florez, A., Pereira-Caro, G., Sanchez-Quezada, C., Moreno-Rojas, J. M., Gaforio, J. J., Jimenez, A., & Beltran, G. (2018). Effect of olive cultivar on bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic fraction of virgin olive oil. *Eur J Nutr*, 57(5), 1925-1946. doi: 10.1007/s00394-017-1475-2
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Exploitation of Food Industry Waste for High-Value Products. *Trends Biotechnol*, 34(1), 58-69. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.10.008
- Rein, M. J., Renouf, M., Cruz-Hernandez, C., Actis-Goretta, L., Thakkar, S. K., & da Silva Pinto, M. (2013). Bioavailability of bioactive food compounds: a challenging journey to bioefficacy. *Br J Clin Pharmacol*, 75(3), 588-602. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04425.x
- Rodriguez-Gutierrez, G., Rubio-Senent, F., Lama-Munoz, A., Garcia, A., & Fernandez-Bolanos, J. (2014). Properties of lignin, cellulose, and hemicelluloses isolated from olive cake and olive stones: binding of water, oil, bile acids, and glucose. *J Agric Food Chem*, 62(36), 8973-8981. doi: 10.1021/jf502062b
- Rosa, N. N., Barron, C., Gaiani, C., Dufour, C., & Micard, V. (2013). Ultra-fine grinding increases the antioxidant capacity of wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 57(1), 84-90. doi: 10.1016/j.jcs.2012.10.002
- Rubio, L., Macia, A., Castell-Auvi, A., Pinent, M., Blay, M. T., Ardevol, A., . . . Motilva, M. J. (2014). Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chem*, 149, 277-284. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.075
- Rubio, L., Motilva, M. J., & Romero, M. P. (2013). Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53(9), 943-953. doi: 10.1080/10408398.2011.574802
- Sahin, S., & Bilgin, M. (2018). Olive tree (*Olea europaea* L.) leaf as a waste by-product of table olive and olive oil industry: a review. *J Sci Food Agric*, 98(4), 1271-1279. doi: 10.1002/jsfa.8619
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897. doi: 10.1016/j.jff.2015.06.018
- Speroni, C. S., Stiebe, J., Guerra, D. R., Beutinger Bender, A. B., Ballus, C. A., dos Santos, D. R., . . . Emanuelli, T. (2019). Micronization and granulometric fractionation improve polyphenol content and antioxidant capacity of olive pomace. *Industrial Crops and Products*, 137, 347-355. doi: 10.1016/j.indcrop.2019.05.005
- Suarez, M., Valls, R. M., Romero, M. P., Macia, A., Fernandez, S., Giralt, M., . . . Motilva, M. J. (2011). Bioavailability of phenols from a phenol-enriched olive oil. *Br J Nutr*, 106(11), 1691-1701. doi: 10.1017/S0007114511002200
- Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Bertolini, D., & Conte, A. (2010). In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*, 120(2), 599-606. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.10.030

- Tenore, G. C., Campiglia, P., Giannetti, D., & Novellino, E. (2015). Simulated gastrointestinal digestion, intestinal permeation and plasma protein interaction of white, green, and black tea polyphenols. *Food Chem*, *169*, 320-326. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.006
- Tenore, G. C., Campiglia, P., Ritieni, A., & Novellino, E. (2013). In vitro bioaccessibility, bioavailability and plasma protein interaction of polyphenols from Annurca apple (M. pumila Miller cv Annurca). *Food Chem*, *141*(4), 3519-3524. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.051
- Ucar, T. M., & Karadag, A. (2019). The effects of vacuum and freeze-drying on the physicochemical properties and in vitro digestibility of phenolics in oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Journal of Food Measurement and Characterization*. doi: 10.1007/s11694-019-00149-w
- Uribe, E., Lemus-Mondaca, R., Veja-Gálvez, A., López, L.A., Pereira, K., López, J., Ah-Hen, K., Di Scala, K. (2013) Quality characterization of waste olive cake during hot air drying: nutritional aspects and antioxidant activity. *Food Bioprocess Technol.*, *6*, 1207-1217. doi: 10.1007/s11947-012-0802-0
- Viuda-Martos, M., Lucas-Gonzalez, R., Ballester-Costa, C., Perez-Alvarez, J. A., Munoz, L. A., & Fernandez-Lopez, J. (2018). Evaluation of protective effect of different dietary fibers on polyphenolic profile stability of maqui berry (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) during in vitro gastrointestinal digestion. *Food Funct*, *9*(1), 573-584. doi: 10.1039/c7fo01671a
- Wang, T., He, F., & Chen, G. (2014). Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. *Journal of Functional Foods*, *7*, 101-111. doi: 10.1016/j.jff.2014.01.033
- Ydjedd, S., Bouriche, S., Lopez-Nicolas, R., Sanchez-Moya, T., Frontela-Saseta, C., Ros-Berruezo, G., . . . Kati, D. E. (2017). Effect of in Vitro Gastrointestinal Digestion on Encapsulated and Nonencapsulated Phenolic Compounds of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Pulp Extracts and Their Antioxidant Capacity. *J Agric Food Chem*, *65*(4), 827-835. doi: 10.1021/acs.jafc.6b05103
- Yu, Y., Zhang, B., Xia, Y., Li, H., Shi, X., Wang, J., & Deng, Z. (2019). Bioaccessibility and transformation pathways of phenolic compounds in processed mulberry (*Morus alba* L.) leaves after in vitro gastrointestinal digestion and faecal fermentation. *Journal of Functional Foods*, *60*, 103406. doi: 10.1016/j.jff.2019.06.008
- Zhu, F., Du, B., & Li, J. (2014). Effect of ultrafine grinding on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from wine grape pomace. *Food Sci Technol Int*, *20*(1), 55-62. doi: 10.1177/1082013212469619

5 DISCUSSÃO

O volume de resíduo gerado na prática da olivicultura vem aumentando em consequência do acréscimo anual de oliveiras com potencial produtor, bem como o incremento das áreas de plantio. Tal fato vem preocupando produtores, pois no Estado do Rio Grande do Sul ainda não há práticas para um destino apropriado do bagaço de oliva, o qual é devolvido ao solo para enriquecimento ou realizado o processo de compostagem. Contudo, o potencial deste resíduo vai muito além de ser utilizado como adubo ou material combustível, como é empregado na Europa (MANFREDINI & SCHIANCHI, 2019). O alto teor de polifenóis e fibra alimentar deste subproduto demonstra a importância de sua exploração, principalmente visando finalidade nutricional. Estudos com biscoitos feitos a partir de bagaço de oliva, com o objetivo de enriquecer o produto em polifenóis, mostraram efeitos positivos da ingestão, com efeitos no intestino grosso, elevando a produção metabólica da microbiota intestinal (CONTERNO et al., 2019). Isso demonstra que o bagaço de oliva pode exercer ainda efeitos mais positivos sobre a saúde, devido a composição. Outros estudos avaliaram a produção de massas do tipo espaguete utilizando resíduo pastoso proveniente da extração do azeite (pasta de oliva) como substituto de farinha de sêmola de trigo grano duro. Os resultados obtidos foram satisfatórios, e os novos produtos tiveram um incremento no teor de polifenóis e fibras. Além da composição, relatou-se melhoria dos parâmetros tecnológicos da massa, com destaque à redução do teor de amido disponível e elevação do teor de amido resistente. A substituição de 10% da farinha de trigo pela farinha de resíduos da extração do azeite de oliva foi aprovada considerada aceitável pelo painel sensorial (PADALINO et al., 2018; SIMONATO et al., 2019). Dessa forma, faz-se necessário maiores estudos a respeito das potenciais aplicações e dos efeitos dos compostos do bagaço de oliva e demais subprodutos no organismo.

A presença de compostos caracterizados por menor aproveitamento pelo organismo, como a lignina, é um dos fatores que desestimulam pesquisas sobre propriedades nutricionais do bagaço de oliva. O presente estudo avaliou métodos de modificação da matriz, utilizando processos simples, fáceis de implementar e que podem contribuir com reduções no impacto ambiental, como o fracionamento granulométrico seguido de micronização.

O fracionamento granulométrico foi um método simples no qual foram empregadas peneiras e separação manual do resíduo ainda úmido. Desta seleção por tamanho, obteve-se duas amostras (F1 > 2 mm e F2 < 2 mm) com características distintas, tanto química quanto fisicamente. Embora os grânulos obtidos para F1 e F2 tenham apresentado características morfológicas semelhantes quando visualizados através da microscopia eletrônica de varredura,

as amostras apresentaram diferenças na composição, como no teor de polifenóis extraíveis, taninos hidrolisáveis e condensados (Manuscrito 1), sendo que todos estes compostos apresentaram um incremento na F2. Além disso, o perfil de compostos fenólicos também foi modificado, no qual F2 apresentou maiores teores de hidroxitirosol e luteolina. A composição das frações do bagaço de oliva diferiu quanto ao teor de cinzas, proteína bruta, gordura e fibras total, insolúvel, solúvel e lignina. Contudo, F2 apresentou características nutricionais importantes. Esta amostra apresentou uma elevação no conteúdo de fibra alimentar solúvel e redução de lignina quando comparada a F1. Assim, as propriedades químicas podem fazer desta uma fonte alternativa de compostos bioativos, devido ao teor de polifenóis e fibra solúvel. Como confirmação da obtenção de um produto com características nutracêuticas, F2 mostrou maior capacidade antioxidante nos três métodos estudados (DPPH, ABTS e ORAC). Além disso, F2 apresentou melhoria nas propriedades funcionais e tecnológicas para esta amostra (Manuscrito 2), como maior capacidade de retenção de água e óleo, maior solubilidade e maior capacidade de ligação a cátions. Os resultados obtidos foram suficientes para afirmar que o fracionamento granulométrico é um processo eficiente para modificar a matriz do bagaço de oliva. O estudo destas propriedades em matérias-primas é de suma importância para viabilizar o uso do bagaço de oliva pela indústria, pois assim é conhecida sua aplicabilidade e potenciais benefícios que pode acarretar ao produto final, como melhoria da umidade, textura, além de fortificação nutricional. O fracionamento granulométrico vem mostrando que a divisão de uma amostra usando como critério o tamanho das partículas tem efeito sobre as características dos novos produtos formados e também exercem efeitos benéficos nos produtos aos quais são agregados (DANIEL et al.; 2006; SEGUNDO et al., 2017).

A micronização das frações granulométricas do bagaço de oliva também mostrou resultados promissores. Para este método, foram realizados dois estudos, nos quais foram testados tempos reduzidos (minutos) e prolongados de moagem (horas). Ambos os tempos utilizados apresentaram diferenças no tamanho de partícula e uma padronização na distribuição do tamanho destas, em relação às respectivas amostras não micronizadas. Contudo a moagem com tempos prolongados apresentou menor tamanho médio de partícula, devido à maior exposição das amostras ao impacto gerado no moinho planetário de bolas. A rigidez das partículas é uma característica importante para trabalhos com moagem. No nosso estudo, F1 apresentou maior quantidade de caroços da oliva do que F2, o que pode contribuir para uma menor eficiência na redução do tamanho de partícula, por ser um material mais rígido e menos quebradiço (ZHAO et al., 2018). A micronização utilizando tempos reduzidos aumentou a extratibilidade de polifenóis extraíveis para ambas as amostras e polifenóis hidrolisáveis para

F1AG. Isso é explicado pelo aumento área superficial das amostras, elevando também sua reatividade com os solventes de extração (CHAU et al., 2007). Isso também se refletiu no teor de gordura, o qual aumentou com a redução do tamanho das partículas, devido a maior extratibilidade. Menores tempos de moagem reduziram o teor de lignina de ambas as amostras, destacando-se F1AG, a qual apresentou uma redução percentual maior. Isto significa um incremento da solubilidade desta amostra rica em caroços frente a detergente ácido. Este efeito já tem sido demonstrado em outros trabalhos os quais testaram outros subprodutos como palha de milho (WU et al., 2018).

Embora uma moagem de minutos já apresente resultados satisfatórios, o uso de tempos prolongados apresentou alterações mais pronunciadas nas características físicas e químicas das frações do bagaço de oliva. As amostras submetidas a uma baixa rotação e cinco horas de processamento no moinho de bolas tiveram suas morfologias alteradas, ficando com aspecto mais poroso ou rugoso, com mais fraturas e partes irregulares, demonstrando uma modificação na estrutura física dos grânulos do pó formado. Além disso, redução no teor de fibra insolúvel combinada com o acréscimo de fibra solúvel foi observada para F1AG e F2AG, seguida também de uma redução mais pronunciada no teor de lignina. Dessa forma, observa-se que a micronização exerce influência sobre a composição de fibra da amostra, causando a ruptura de estruturas mais externas e rígidas da parede celular, como a lignina, podendo liberar/expor compostos mais internos como hemicelulose e celulose. Então, observa-se uma redistribuição nas frações de fibra alimentar, causando também impactos sobre a solubilidade da amostra, conforme obtido neste estudo. Estes resultados confirmam o que vem sendo exposto na literatura, na qual há relatos de modificações nas frações fibrosas de diversas amostras como banana nanica e bagaço de uva provindo da vinificação (SEGUNDO et al., 2017; ZHU et al., 2014). Destaque também deve ser dado ao teor de fibra alimentar solúvel atingido por F2AG (aproximadamente 15.8 %). Este teor é considerado elevado para fibra solúvel em matrizes vegetais. Alimentos como a linhaça, que tem aproximadamente 11 % de fibra solúvel faz com que esta seja indicada nutricionalmente como um ingrediente funcional rico em fibras (NANDI; GOSH, 2015). Assim, a obtenção de F2AG demonstra amplo potencial de aproveitamento do bagaço de oliva, com ênfase na produção de alimentos nutracêuticos, devido a associação do alto teor de fibra solúvel e presença de polifenóis da oliva, reconhecidos pelo potencial na prevenção de doenças (SHAHIDI; AMIGAIPALAN, 2015).

Mesmo com uma composição rica em moléculas que apresentem efeitos benéficos à saúde do consumidor, são necessários ensaios que demonstrem a viabilidade deste composto no organismo. Com isso, a bioacessibilidade dos compostos deve ser estudada, de modo a

caracterizar uma amostra de acordo com o comportamento dos compostos ao longo das etapas intestinais. A bioacessibilidade é importante para elucidar quais compostos estão solúveis e disponíveis para a absorção intestinal (ANSON et al., 2009). Compostos antioxidantes como os polifenóis são reconhecidos por apresentar dificuldade de serem absorvidos no trato gastrointestinal, por isso muitas vezes exercem um status antioxidante no intestino grosso e também podem atuar como substrato para a microbiota intestinal (JAKOBEK; MATIC, 2019; MOLINO et al., 2019). As frações granulométricas do bagaço de oliva e as respectivas micronizadas pelo tempo de 5 horas foram submetidas ao teste de digestibilidade *in vitro* e apresentaram diferenças no comportamento em cada etapa avaliada (salivar, gástrica, fração absorvível e não absorvível; Manuscrito 3). A micronização aumentou a solubilidade de hidroxitirosol, oleuropeína, luteolina, apigenina, ácido cafeico e 3,4-DHPEA-EDA durante a digestão salivar podendo-se sugerir que a liberação destes compostos possa começar na boca. A micronização aumentou os teores de polifenóis na fase gástrica em relação às amostras não digeridas, logo houve maior liberação dos compostos hidroxitirosol, luteolina, apigenina e 3,4-DHPEA-EDA para as duas frações micronizadas. Oleuropeína e ácido cafeico apresentaram aumento na fase gástrica somente para F2AG. Assim, esta amostra apresentou maior liberação de todos os compostos em pH ácido estomacal. Na fração absorvível (FA), somente F1AG apresentou hidroxitirosol na composição, com alto índice de bioacessibilidade. A oleuropeína apresentou maiores teores na fração absorvível para ambas as amostras micronizadas, refletindo-se também em uma maior bioacessibilidade. Esses resultados são positivos, pois estes dois compostos são majoritários no azeite de oliva, além de contribuírem para efeitos benéficos que o consumo de azeite acarreta à saúde (TUCK; HAYBALL, 2002). Luteolina e apigenina apresentaram baixa bioatividade e permaneceram em maior quantidade na fração não absorvível. Quando avaliada a capacidade antioxidante das diferentes frações (submetidas ou não à micronização) ao longo das etapas intestinais observa-se que as amostras micronizadas (F1AG e F2AG) apresentaram maior capacidade antioxidante nas etapas salivar, gástrica e duodenal não absorvível. Atenção especial deve ser dada à amostra F2AG, a qual apresentou aumento significativo na capacidade antioxidante ao longo da digestão. Isso demonstra que a redução do tamanho de partícula pode promover a liberação de moléculas antioxidantes da matriz, de acordo com o pH do meio, podendo contribuir para aumentar a capacidade antioxidante da digesta. Dessa forma, F2AG apresenta potencial para ser explorada na prevenção e/ou tratamento de doenças gastrintestinais associadas ao stress oxidativo, tais como gastrite e doenças inflamatórias intestinais.

A micronização mostrou ser um eficiente método para modificações na estrutura da matriz alimentícia e estas estão diretamente relacionadas com o tempo de exposição da amostra durante a moagem, bem como a velocidade de rotação utilizada no moinho planetário de bolas. O fracionamento granulométrico gerou amostras com características benéficas, com destaque à F2, a qual apresentou maior teor de polifenóis, maior capacidade antioxidante, maior teor de fibra alimentar solúvel e menor teor de substâncias de difícil absorção pelo trato gastrointestinal como a lignina. A micronização de F2, com tempos prolongados potencializou as características físicas e químicas, propondo-se uma melhoria desta. Mesmo que a micronização desta amostra tenha resultado na degradação dos compostos fenólicos, esta deve ser valorizada pela sua composição rica em fibra alimentar solúvel, por apresentar boas propriedades tecnológicas e funcionais e também devido à liberação de polifenóis ao longo do processo digestivo. A capacidade antioxidante ao longo das etapas da digestão *in vitro* em relação às demais amostras também é um fator positivo que valoriza este produto, pois por mais que a fração de polifenóis seja reduzida, a diminuição do tamanho de partícula já foi suficiente para que os compostos atuassem na maior eliminação de radicais peróxil. Logo, este efeito pode ser responsável por aumentar o status antioxidante em determinadas etapas da digestão, beneficiando a saúde. Dessa forma, diferentes produtos foram obtidos a partir do bagaço de oliva, cada um podendo apresentar suas potencialidades de uso, dependendo das características, composição e finalidade na produção de alimentos.

6 CONCLUSÃO

O fracionamento granulométrico do bagaço de oliva, combinado com o processo de micronização, mostra potencial para geração de produtos com características nutracêuticas. O fracionamento granulométrico pode ser um método simples e sustentável para produção de um pó rico em compostos fenólicos e fibra alimentar. A micronização em diferentes condições de moagem leva à produção de dois produtos pulverizados com composição e propriedades diversificadas. A micronização do bagaço de oliva em tempos reduzidos potencializou a capacidade antioxidante, o que é consequência do aumento da extratabilidade de compostos com potencial antioxidante como os polifenóis. Além disso, a moagem ultrafina em tempos prolongados é responsável por causar um rearranjo nas frações de fibra alimentar, refletindo-se no aumento da solubilidade da amostra e melhoria das propriedades funcionais e tecnológicas e possibilita o uso deste produto. Ensaio de digestão *in vitro* demonstraram que a micronização exerce efeitos promissores aumentando a bioacessibilidade dos compostos fenólicos ao longo do trato gastrointestinal. Percebe-se que a micronização pode agregar valor ao bagaço de oliva e a seleção do tratamento desejado (tempos prolongados ou reduzidos) pode se basear nas características desejáveis do produto, com ênfase no aumento do teor de polifenóis e alta capacidade antioxidante ou na redução do teor de lignina e melhoria da composição da fibra alimentar. Logo, a geração destes produtos pulverizados pode ser uma alternativa para agregar valor ao bagaço de oliva, além de suprir a demanda de mercado por ingredientes bioativos. Em face disso, o fracionamento granulométrico e a micronização são uma alternativa para reduzir o impacto ambiental gerado pelo descarte inadequado do resíduo na cadeia da olivicultura.

REFERÊNCIAS

ABBEDDOU, S. et al. Supplementing diets of Awassi ewes with olive cake and tomato pomace: on-farm recovery of effects on yield, composition and fatty acid profile of the milk. **Tropical Animal Health and Production**. V. 47, n. 1, p. 145-152, 2015.

AHMAD-QASEM, M. H. et al. Influence of olive leaf processing on the bioaccessibility of bioactive polyphenols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 62, n. 26, p. 6190-6198, 2014.

AHMED, J. et al. Effect of sieve particle size on functional, thermal, rheological and pasting properties of Indian Turkish lentil flour. **Journal of Food Engineering**. V. 186, p. 34-41, 2016.

AIRES, C. M. G. L. S., **Contribuição para o estudo da aplicação de subprodutos da indústria de extracção de azeite em solos agrícolas**. Universidade Técnica de Lisboa, 2007.

ALBA, J. M. F. et al. Zoneamento edafoclimático da olivicultura para o Rio Grande do Sul. In: Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Fruticultura. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/995817/1/JoseFilipiniTRA3108.pdf>>. Acesso em agosto de 2019.

ALBURQUERQUE J.A. et al. Agrochemical characterization of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. **Bioresource Technology**. V. 91, p. 195–200, 2004.

ALU'DATT, M.H. et al. Optimisation, characterization and quantification of phenolic compounds in olive cake. **Food Chemistry**. V. 123, p. 117-122, 2010.

ANGELINO, D. et al. Bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in bread: a review. **Food & Function**. V. 8, p. 2368 – 2393, 2017.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. V. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANSON, N. M., et al. Bioprocessing of wheat bran improves *in vitro* bioaccessibility and colonic metabolism of phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 57, n. 14, p. 6148-6155, 2009.

ARAÚJO, M. et al. Phenolic compounds from olive mill wastes: health effects, analytical approach and application as food antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**. V. 45, p. 200-211, 2015.

ARGYRI, K. et al. Phenolic compounds in red wine digested *in vitro* in the presence of iron and other dietary factors. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. V. 56, n. 3, p. 213-222, 2005.

ARRANZ, S.; SILVÁN, J.M.; SAURA-CALIXTO, F.. Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. **Molecular Nutrition & Food Research**. V. 54, n. 11, p. 1646-1658, 2010.

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC), 1996. **Official Methods of Analysis**, 16th ed. AOAC, Washington, DC, USA.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**. V. 99, p. 191-203, 2006.
- BECKMAN, C.H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation with disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**. V. 57, p. 101-110, 2000.
- BECKER, S. et al. How do grinding and sieving impact on physicochemical properties, polyphenol content, and antioxidant activity of *Hieracium pilosella* L., powders? **Journal of Functional Foods**. V. 35, p. 666-672, 2017.
- BENITEZ, J. et al. Aerobic degradation of olive mill wastewaters. **Applied Microbiology Biotechnology**. N. 47, p. 185–188, 1997.
- BLANCO, R. A., **Jardim de Flores**. Disponível em: <<http://www.jardimdeflores.com.br/floresefolhas/A48oliveira.htm>> (Consultado em 13-8-2014).
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. V. 37, p. 911–917, 1959.
- BOLANOS, J.F. et al. . Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: isolation of added-value compounds. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**. N. 52, p. 5849-5855, 2004.
- BORJA, R. et al. A study of anaerobic digestibility of two-phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature. **Process Biochemistry**, N. 38, p. 733-742, 2002.
- BOSKOU, D. **Olive oil: Chemistry and technology**. AOCS Press. Champaign, Illinois. Segunda edição, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT Food Science and Technology**. V. 28, p. 25–30, 1995.
- CARDOSO, L.G.V. Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais- Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. V. 31, n. 1, p. 127-136, 2010.
- CARDOSO, C. et al. Bioaccessibility assessment methodologies and their consequences for the risk benefit evaluation of food. **Trends Food Science and Technology**. V. 41, p. 5-23, 2015.
- CASTELLANI, F. et al. Dietary supplementation with dried olive pomace in dairy cows modifies the composition of fatty acids and the aromatic profile in milk and related cheese. **Journal of Dairy Science**. V. 100, n. 11, p. 8658-8669, 2017.
- CATALANI, L.A. et al. Fibras alimentares. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. V. 18, n. 4, p. 178-182, 2003.

- CAVALCANTI, M.L.F. Fibras alimentares: definição e classificação. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. V. 12, n. 4, p. 147-150, 1997.
- CEOLIN, A.C.; ABICHT, A.M.; MACHADO, J.A.D. Inovação e tomada de decisão na olivicultura na região centro-oeste do Rio Grande do Sul. XXV Simpósio de Gestão de Inovação Tecnológica. Brasília, outubro de 2008.
- CHAU, C; HUANG, Y. Comparison of the chemical composition and physicochemical properties of different fibers prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. Cv. Liucheng. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 51, n. 9, p. 2615-2618, 2003a.
- CHAU, C. F.; HUANG, Y. L.; LEE, M. H. In vitro hypoglycemic effects of different insoluble fibre-rich fractions prepared from the peel of *Citrus sinensis* L. cv. Liucheng. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. V. 51, P. 6623–6626, 2003b.
- CHAU, C.F.; WEN, Y.; WANG, Y. Improvement of the functionality of a potential fruit insoluble fibre by micron technology. **International Journal of Food Science and Technology**. V. 41, p. 1054-1060, 2006.
- CHAU, C.; WANG, Y.; WEN, Y. Different micronization methods significantly improve the functionality of carrot insoluble fibre. **Food Chemistry**. V. 100, p. 1402-1408, 2007.
- CHAWLA, R.; PATIL, G.R. 2010. Soluble dietary fiber. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. V. 9, p. 178–196, 2010.
- CHEMAT, F.; VIAN, M.A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of natural products: concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**. V. 13, p. 8615-8627, 2012.
- CHEN, L. et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: an update on structure-activity relationship. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. V. 58, n. 4, p. 513-527, 2016.
- CHOU, L.; LIU, H.; KAO, T. Effect of micronization process on the functional component content and anti-inflammatory activity peel of *Luffa cylindrical* peel. **Journal of Functional Foods**. V. 27, p. 150-159, 2016.
- CLIFFORD, M.N. Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implication for health. **Planta Medica**. V. 70, p. 1103-1114, 2004.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Report of the 31st Session of the Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses**. Düsseldorf, Germany, 2-6 November, 2009. ALINORM 10/33/26. 2009.
- CONTERNO, L. et al. Measuring the impact of olive pomace enriched biscuits on the gut microbiota and its metabolic activity in mildly hypercholesterolaemic subjects. **European Journal of Nutrition**. V. 58, n. 1, p. 63-81, 2019.
- COUTINHO, E. F.; JORGE, R. O.; HAERTER, J. A.; COSTA, V. B. **Oliveira – Aspectos técnicos e cultivo no sul do Brasil**. Brasília, Embrapa, 2015, 181 p.
- COUTINHO, E.F.; RIBEIRO, F. C.; CAPPELLARO, T. H. **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 2009, 125 p.

COVAS, M.I. et al. Minor components of olive oil: evidence to date of health benefits in humans. **Nutrition Reviews**. V. 64, n. 10, 2006.

CUSTÓDIO, T. **Azeites extra-virgem comerciais: composição em compostos voláteis e relação com parâmetros químicos de qualidade**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto, 2009.

DAL BOSCO, A. et al. Effect of dietary supplementation with olive pomaces on the performance and meat quality of growing rabbits. **Meat Science**. V.92, p.783-788, 2012.

DANIEL, A.P. et al. Fracionamento a seco da farinha de aveia e modificação química da fração rica em amido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. V. 26, n. 4, p. 936-943, 2006.

DAOU, C.; ZHANG, H. Study on functional properties of physically modified dietary fibres derived from defatted rice bran. **Journal of Agricultural Science**. V. 4, n. 9, p. 85-97, 2012.

D'ANTUONO, I. et al. Fermented Apulian table olives: effect of selected microbial starters on polyphenols composition, antioxidant activities and bioaccessibility. **Food Chemistry**. v. 248, p. 137-145, 2018.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**. V. 43, n.4, p. 348-361, 2007.

DELI, M. et al. Successive grinding and sieving as a new tool to fractionate polyphenols and antioxidants of plants powders: Application to *Boscia senegalensis* seeds, *Dichrostachys glomerata* fruits, and *Hibiscus sabdariffa* calyx powders. **Food Science & Nutrition**. v. 7, p. 1795-1806, 2019.

DERMECHE, S. et al. Olive mill wastes: biochemical characterizations and valorization strategies. **Process Biochemistry**. V. 48, p. 1532-1552, 2013.

DI GIOVACCHINO, L.; SESTILI, S.; VINCENZO, D.D. Influence of olive processing on virgin olive quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**. V. 104, p. 587-601, 2002.

DILLARD, C.J.; GERMAN, J.B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the science of food and agriculture**. V. 80, p. 1744-1756, 2000.

DRAKOS, A. et al. Influence of jet milling and particle size on the composition, physicochemical and mechanical properties of barley and rye flours. **Food Chemistry**. V. 215, p. 326-332, 2017.

ELLEUCH, M. et al. Dietary-fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. **Food Chemistry**. V. 124, p. 411-421, 2011.

ESPOSITO, F. et al. Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. **Food Research International**. V. 38, p. 1167-1173, 2005.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 13/07/2019.

FEMENIA, A. et al., Physical and sensory properties of model foods supplemented with cauliflower fiber. **Journal of Food Science International**, v .62, p. 635-639, 1997.

FRANCO, M. N. et al. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. **Food Chemistry**. v. 163, p. 289-298, 2014.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. **Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications)**. Washington, DC: USDA, 1970.

GONG, Z.; ZHANG, M.; SUN, J. Physico-chemical properties of cabbage powder as affected by crying methods. **Drying technology**. V. 25, p. 913-916, 2007.

GOÑI, I. et al. Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber including associated polyphenols, in food and beverages. **Food Research International**. V. 42, n.7, p. 840-846, 2009.

GUILHERME, V.R.S. **Biodegradação anaeróbia do bagaço de azeitona**. 2012. 130 p. Dissertação (Mestrado em Química Industrial) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012.

HE, S. et al. Effect of ball-milling on the physicochemical properties of maize starch. **Biotechnology Reports**. V. 3, p. 54-59, 2014.

HIDALGO, A.; FONGARO, L.; BRANDOLINI, A. Wheat flour granulometry determines colour perception. **Food Research International**. V. 64, p. 363-370, 2014.

HUANG, Y. et al. Effects of particle size reduction of insoluble fibres by micron technology on various caecal and faecal indices. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 88, p. 435-441, 2008.

HUANG, C.; CHEN, Y.; WANG, C. Effects of micronization on the physico-chemical properties of peels of three root and tuber crops. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. V. 90, p. 759-763, 2010.

ICH, 2005. London: EMEA International Conference on Harmonization Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology 2005.

ISHII, T. et al. Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. **Free Radical Biology & Medicine**. V. 45, n. 10, p. 1384-1394, 2008.

JAKOBEK, L., MATIC, P. (2019). Non-covalent dietary fiber - polyphenol interaction and their influence on polyphenol bioaccessibility. **Trends in Food Science & Technology**. V. 83, p. 235-247, 2019.

JULIO, L.R.C. **Tratamento, caracterização química e estudo in vivo do bagaço de azeitona resultante da extração do azeite de oliva**. 145 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

KAPPELLAKIS, I.E.; TSAGARAKIS, K.P.; CROWTHER, J.C. Olive oil history, production and by-product management. **Reviews in environmental science and biotechnology**. V. 7, n. 1, p. 1-26, 2008.

KLEINERT, M.; BARTH, T. Phenols from lignin. **Chemical Engineering & Technology**. V. 31, n. 5, p. 736-745, 2008.

KLEN, B.T.J.; VODOPIVEC, B.M. The fate of olive fruit phenols during commercial olive oil processing: Traditional press versus continuous two- and three-phase centrifuge. **LWT-Food Science and Technology**. V. 49, n. 2, p. 267-274, 2012.

KERR, W.L. et al. Effect of milling and particle size on functionality and physicochemical properties of cowpea flour. **Cereal Chemistry**. v. 77, n. 2, p. 213-219, 2000.

LOH, Z.H.; SAMANTA, A.K.; HENG, P.W.S. Overview of milling techniques for improving the solubility of poorly water-soluble drugs. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 10, n.4, p. 255-274, 2015.

LÓPEZ, G. et al. Propiedades funcionales de la fibra dietética: mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal. **Archivos Latino Americanos de Nutrition**. v 47, n.3, p.203-206. 1997.

LOZANO-SÁNCHEZ, J. et al. Wastes Generated during the Storage of Extra Virgin Olive Oil as a Natural Source of Phenolic Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 11491-11500, 2011.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**. V. 81, p. 230S-242S, 2005.

MANDARINO, J.M.G.; ROESSING, A.C.; BENASSI, V.T. **Óleos: alimentos funcionais**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005, 91 p.

MANFREDINI & SCHIANCHI. Plantas de moagem e peneiramento de bagaço de azeitona. Disponível em: <<http://www.manfredinieschianchi.com/213-4PO-moagem-peneiramento-bagaco-de-azeitona.htm>>. Acesso em agosto de 2019.

MCBURNEY, M. I.; VAN SOEST, P. J.; CHASE, L. E. Cation exchange capacity and buffering capacity of neutral-detergent fibres. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34 (9), 910-916, 1983.

MERCADO-MERCADO, G. et al. Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Journal of Functional Foods**. V.18, p. 171-181, 2015.

MINEKUS, M., et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. **Food and Function**. V. 5, n. 6, p. 1113-1124, 2014.

MIRA, G.S.; GRAF, H.; CÂNDIDO, L.M.B. Visão retrospectiva em fibras alimentares com ênfase em beta-glucanas no tratamento do diabetes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. V. 45, n. 1, p. 11-20, 2009.

MOLINO, et al. Study of antioxidant capacity and metabolization of quebracho and chestnut tannins through in vitro gastrointestinal digestion-fermentation. **Journal of Functional Foods**. V. 49, p. 188-195, 2019.

MONAGAS, M et al. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. **Food and Function**. V. 1, p. 233-253, 2010.

MUDGIL, D.; BARAK, S. Composition, properties and health benefits of indigestible carbohydrate polymers as dietary fiber: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**. V. 61, p. 1-6, 2013.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NANDI, I.; GHOSH, M. Studies on functional and antioxidant property of dietary fibre extracted from defatted sesame husk, rice bran and flaxseed. **Bioactive Carbohydrates Dietary Fibre**. V. 5, n. 2, p. 129–136, 2015.

NASOPOULOU, C. et al. Effects of olive pomace and olive pomace oil on growth performance, fatty acid composition and cardio protective properties of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Food Chemistry**. v. 129, n. 3, p. 1108-1113, 2011.

OIC. International Olive Council: **World olive oil figures**. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>. Acesso julho de 2019.

OLIVEIRA, A. C. et al. Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. **Food Chemistry**. V. 115, p. 469-475, 2009.

OLIVEIRA, M.C. et al. Características fenológicas e físicas e perfil de ácidos graxos em oliveiras do Sul de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V. 47, n.1, p. 30-35, 2012.

OMAR, J.M.A.; DAYA, R.; GHALEB, A. Effects of different forms of olive cake on the performance and carcass quality of Awassy lambs. **Animal Feed Science and Technology**. V.171, p. 167-172, 2012.

ORTEGA-GARCIA, F. et al. Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leafs of olive (*Olea europaea*) cv. ‘Picual’ trees during fruit ripening, **Tree Physiology**, v. 28, p. 45-54, 2008.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4619–26, out. 2001.

PADALINO, L. et al. Use of olive oil industrial by-product for pasta enrichment. **Antioxidants**. V. 7, n. 59, p. 1-15, 2018.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**. v. 41, p. 274–285, 2008.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. et al. Bioavailability of phenolic antioxidants associated with dietary fiber: plasma antioxidant capacity after acute and long-term intake in humans. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 64, p. 102-107, 2009.

RAMACHANDRAIAH, K.; CHIN, K.B. Evaluation of ball-milling time on the physicochemical and antioxidant properties of persimmon by-products powder. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. V. 37, p. 115-124, 2016.

RAMALHEIRO, J. P. S. C. **Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades**. 51 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

RAO, M. A.; TATTIYAKUL, J. Granule size and rheological behavior of heated tapioca starch dispersions. **Carbohydrate Polymers**. V. 38, p. 123–132, 1999.

RASENACK, N.; MÜLLER, B.W. Micron-size drug particles: common and novel micronization techniques. **Pharmaceutical development and technology**. V. 9, n.1, p. 1-13, 2004.

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. V. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trend in plant science**. V. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

RIO GRANDE DO SUL. **Produção de azeite de azeite extravirgem deste ano deve ser a maior do estado**. Disponível em: <https://estado.rs.gov.br/producao-de-azeite-extravirgem-deve-ser-a-maior-do-rs-em-2019>. Acesso em setembro de 2019.

RODIS, P. S.; KARANTHANOS, V.T.; MANTZAVINO, A. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 50, n.3, p. 596-601, 2002.

RODRÍGUEZ, R. et al. Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. **Trends in Food Science & Technology**. V. 17, n. 1, p. 3-15, 2006.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, R. et al. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. **Drying Technology**. V. 23, n.4, p. 955-973, 2005.

ROIG, A.; CAYUELA, M.L.; SÁNCHEZ-MONEDERO, M.A. An overview on olive mill wastes and their valorization methods. **Waste Manage**. V. 26, p.960–969, 2006.

ROLEIRA, F. M. F. et al. Plant derived and dietary phenolic antioxidants: anticancer properties. **Food Chemistry**. v. 183, p. 235-258, 2015.

ROSELLÓ-SOTO, E. et al. Emerging opportunities for the effective valorization of wastes and by-products generated during olive oil production process: Non-conventional methods for the recovery of high-added value compounds. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 296-310, 2015.

- RUFINO, MD.S.M., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., ALVES, R.E., DE BRITO, E.S., OLIVEIRA, M.S.P., SAURA-CALIXTO, F. Açai (*Euterpe oleraceae*) 'BRS Pará': a tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2100–2106, 2011.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *Journal of Nutrition*. v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.
- SCALBERT, A. et al. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. V. 56, p. 276-282, 2002. SCALBERT, A. et al. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. V. 45, p. 287-306, 2005.
- SEGUNDO, C. et al. Mechanically fractionated flour isolated from green bananas (*M. cavendishii* var *nanica*) as a tool to increase the dietary fiber and phytochemical bioactivity of layer and sponge cakes. *Food Chemistry*. v. 219, p. 240-248, 2017.
- SERVILI, M. et al. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and sensory activities according to their chemical structures. *Inflammopharmacology*. V. 17, p. 1-9, 2009.
- SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects – a review. *Journal of functional foods*. N. 18, p. 820-897, 2015.
- SHAMSHOUM, H.; VLAVCHESKI, F.; TSIANI, E. Anticancer effects of oleuropein. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. V. 43, n. 4, p. 517-528, 2017.
- SILVA, C. **Aplicación directa de residuos de almazaras de dos fases en un olivar con riego localizado: Efectos en las propiedades edáficas y el cultivo**. Tese de Doutorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 2009.
- SILVA, L.F.O. Variação da qualidade do azeite em cultivares de oliveira. *Bragantia*. V. 71, n.2, p. 202-209, 2012.
- SIMONATO, B. et al. Pasta fortification with olive pomace: effects on the technological characteristics and nutritional properties. *LWT*. V. 114, p. 1- 6, 2019.
- SLUITER, A. et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. **National Renewable Energy Laboratory**. Technical Report. V. 1617, p. 1-16, 2008.
- SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*. V. 15, n.1, p.71-81, 2002.
- SOUZA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. V. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- STEVENSON, D.E.; HURST, R.D. Polyphenolic phytochemicals e just antioxidant or much more? *Cellular and Molecular Life Sciences*. V. 64, p. 2900-2916, 2007.
- TAGLIAZUCCHI, D. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chemistry*. V.120, p. 599-606, 2010.

- TERAMOTO, J.R.S; BERTONCINI, E.I.;PRELA,P. Histórico da introdução da cultura da oliveira no Brasil. 2010. Artigo em Hypertexto. Disponível em:<http://www.infobibos.com/artigos/2010_4/historicooliveira/index.htm>. Acesso em: março de 2016.
- THEBAUDIN, J.Y. et al. Dietary-fibres: Nutritional and technological interest. **Trends in Food Science & Technology**. V. 8, p. 41-48, 1997.
- TUNGLAND, B.C.; MEYER, D. Non-digestible oligo- and polisaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. V. 3, p. 90-109, 2002.
- TUCK, K. L.; HAYBALL, P. J. Major compounds in olive oil: metabolism and health effects. **Journal of Nutritional Biochemistry**. V. 13, p. 636-644, 2002.
- TUUNILA, R.; NYSTRÖM, L. Effects of grinding parameters on product fineness in jet mill grinding. **Minerals Engineering**. V.11, n.11, p. 1089-1094, 1998.
- TZOUNIS, X. et al. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavonols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. **The American Journal of Clinical Nutrition**. V. 93, p. 62-72, 2011.
- UCEDA, M.; JIMÉNEZ, A.; BELTRÁN, G. Olive oil extraction and quality. **Grasas y aceites**. V. 57, n.1, p. 25-31, 2006.
- URIBE, E. et al. Quality characterization of waste olive cake during hot air drying: nutritional aspects and antioxidant activity. **Food Bioprocess Technology**. V. 6, p. 1207-1217, 2013.
- URIBE, E. et al. Dehydrated olive-waste cake as a source of high value-added bioproduct: drying kinetics, physicochemical properties, and bioactive compounds. **Chilean Journal of Agricultural Research**. V. 74, n. 3, p. 293-301, 2014.
- VALTA, K. et al. Adding value to olive oil production through waste and wastewater treatment and valorisation: the case of Greece. **Waste Biomass Valor**. V.6, p. 913-925, 2015.
- VISSERS, M.N.; ZOCK, P.L.; KATAN, M.B. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenols in humans. **European Journal of Clinical and Nutrition**. V. 58, p. 955-965, 2004.
- VOSSSEN, P. Olive oil: history, production, and characteristics of the world's classic oils. **American Society of Horticultural Science**. V. 42, n. 5, p. 1093-1100, 2007.
- VUKSAN, V. Viscosity rather than quantity of dietary fibre predicts cholesterol-lowering effect in healthy individuals. **British Journal of Nutrition**. V. 106, p. 1349-1352, 2011.
- WANG, C.; CIOU, J.; CHIANG, P. Effect of micronization on functional properties of the water caltrop (*Trapa taiwanensis* Nakai) pericarp. **Food Chemistry**. N. 113, p. 970-974, 2009.
- WANG, T.; HE, F.; CHEN, G. Improving bioaccessibility and bioavailability of phenolic compounds in cereal grains through processing technologies: A concise review. **Journal of functional foods**. V. 7, p.101-111, 2014.

WATERHOUSE A. L. Determination of total phenolics. In: **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, R. E. Wrolstad, Ed., units I, pp. I1.1.1–I1.1.8, John Wiley & Sons, New York, NY, USA, 2003.

WEICKERT, M.O.; PFEIFFER, A.F.H. Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. **The Journal of Nutrition**. V. 138, p. 439-442, 2008.

WEICKERT, M.O.; PFEIFFER, A.F.H. Impact of dietary fiber consumption on insulin resistance and the prevention of type 2 diabetes. **The Journal of Nutrition**. v. 148, n. 1, p. 7 – 12, 2018.

WU, G.C. et al. Production of silver carp bone powder using superfine grinding technology: suitable production parameters and its properties. **Food Engineering**. V. 109, p. 730-735, 2012.

WU, M. et al. Processing of superfine grinding corn straw fiber-reinforced starch film and the enhancement on its mechanical properties. **Polymers**. V. 10, n. 8, p. 1-16, 2018.

ZHAO, X. et al. Application of superfine pulverization technology in Biomaterial Industry. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. V. 40, p. 337-343, 2009.

ZHAO, G., et al. Particle Size of insoluble dietary fiber from rice bran affects its phenolic profile, bioaccessibility and functional properties. **LWT Food Science & Technology**. V. 87, p. 450–456, 2018.

ZHU, F.; DU, B.; LI, J. Effect of ultrafine grinding on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from wine grape pomace. **Food Science and Technology International**. V. 20, n. 1, p. 55-62, 2014a.

ZHU, F. et al. Effect of micronization technology on physicochemical and antioxidant properties of dietary fiber from buckwheat hulls. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**. V. 3, p. 30-34, 2014b.

ZHU, F.; DU, B.; XU, B. Superfine grinding improves functional properties and antioxidant capacities of bran dietary fibre from Qingke (hull-less barley) grown in Qinghai-Tibet Plateau, China. **Journal of Cereal Science**. V. 65, p. 43-47, 2015.

ZURITA, J., DIAZ-RUBIO, M.E., SAURA-CALIXTO, F. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. **International Journal of Food Science & Nutrition**. V. 63, n. 8, p. 936–939, 2012.