



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C Y LA HESPERIDINA DE LOS COPRODUCTOS DEL ZUMO Y PURÉ DE NARANJA LIOFILIZADOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E
INGENIERIA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Rosa Gabriela Galindo Barragán

TUTORA ACADEMICO: María del Mar Camacho Vidal
COTUTORA: Nuria Martínez Navarrete

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, septiembre de 2019

ESTABILIDAD DE LA VITAMINA C Y LA HESPERIDINA DE LOS COPRODUCTOS DEL ZUMO Y PURÉ DE NARANJA LIOFILIZADOS

Galindo, R.G., Martínez-Navarrete, N¹., Camacho, M.M.¹

RESUMEN

En el proceso de obtención de zumo de naranja se generan residuos que tienen un contenido rico en fitoquímicos, en general, y en vitamina C y flavonoides, en particular. Estos residuos podrían ser utilizados como fuente natural de antioxidantes. En este estudio, pensando en la rentabilidad y sostenibilidad del proceso de extracción de zumo de naranja o de obtención de puré, se ha utilizado la liofilización como técnica de deshidratación de estos coproductos para la obtención de productos de alta calidad que podrían ser utilizados como extractos de compuestos bioactivos y/o como ingredientes. Además, se ha variado la temperatura de bandeja del liofilizador, para estudiar la influencia del proceso, y se han incorporado biopolímeros naturales (goma arábiga y fibra de bambú), como posibles estabilizadores físicos y químicos. Para ello, se ha analizado, antes y después de la liofilización, el contenido en sólidos solubles, la humedad, la vitamina C, el ácido L-ascórbico, ácido dehidroascórbico y la hesperidina de todas las muestras estudiadas. Los resultados sugieren que los productos liofilizados con biopolímeros integrados a sus matrices y sometidos a liofilización con calentamiento de bandeja a 50°C presentan concentraciones mayores de vitamina C y hesperidina. Además, el tiempo de liofilización se reduce en un 30%. Los productos obtenidos a partir de estas matrices podrían ser consumidos como alimentos o como ingredientes.

PALABRAS CLAVE: Sostenibilidad, liofilización, Vitamina C, Hesperidina, coproducto, goma arábiga, fibra de bambú.

RESUM

En el procés d'obtenció de suc de taronja es generen residus que tenen un contingut ric en fitoquímics, en general, i en vitamina C i flavonoides, en particular. Aquests residus podrien ser utilitzats com a font natural d'antioxidants. En aquest estudi, pensant en la rendibilitat i sostenibilitat del procés d'extracció de suc de taronja o d'obtenció de puré, s'ha utilitzat la liofilització com a tècnica de deshidratació d'aquests coproductes per a l'obtenció de productes d'alta qualitat que podrien ser utilitzats com a extractes de compostos bioactius i/o com a ingredients. A més, s'ha variat la

¹ Grupo de Investigación e Innovación Alimentaria (CUINA). Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera, s/n. 46022 Valencia (España)

temperatura de safata del liofilitzador, per a estudiar la influència del procés, i s'han incorporat biopolímers naturals (goma aràbiga i fibra de bambú), com a possibles estabilitzadors físics i químics. Per a això, s'ha analitzat, abans i després de la liofilització, el contingut en sòlids solubles, la humitat, la vitamina C, l'àcid L-ascòrbic, àcid dehidroascòrbic i la hesperidina de totes les mostres estudiades. Els resultats sugereixen que els productes liofilitzats amb biopolímers integrats a les seues matrius i sotmesos a liofilització amb calfament de safata a 50 °C presenten concentracions majors de vitamina C i hesperidina. A més, el temps de liofilització es redueix en un 30%. Els productes obtinguts a partir d'aquestes matrius podrien ser consumits com a aliments o com a ingredients.

PARAULES CLAU: Sostenibilitat, liofilització, Vitamina C, Hesperidina, coproducte, goma aràbiga, fibra de bambú.

ABSTRACT

The process of obtaining orange juice generates residues that are generally rich in phytochemicals, vitamin C and flavonoids. These residues could be used as a natural source of antioxidants. In this study, focusing on the profitability and sustainability of the process of extracting orange juice or obtaining puree, freeze-drying has been used as a dehydration technique for these co-products to obtain high quality products that could be used as bioactive compounds extracts and / or as ingredients. In addition, the freeze-dryer tray temperature has been varied to study the influence of the process, and natural biopolymers (Arabic gum and bamboo fiber) have been incorporated as possible physical and chemical stabilizers. Soluble solids content, humidity, vitamin C, L-ascorbic acid, dehydroascorbic acid and hesperidin of all the samples studied were analyzed before and after freeze-drying. The results suggest that freeze-dried samples with added biopolymers and with the freeze-dryer tray heating at 50°C present higher concentrations of vitamin C and hesperidin. In addition, freeze-drying time is reduced by 30%. The products obtained from these matrices could be consumed as food or as ingredients.

KEY WORDS: Sustainability, freeze-drying, Vitamin C, Hesperidin, coproduct, arabic gum, bamboo fiber

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos (*Citrus* spp.) son uno de los cultivos frutales más importantes del mundo (FAO, 2017). España es el mayor productor de cítricos de la Unión Europea y el quinto en el mundo con una producción anual superior a 5 millones de Tm durante la última década (IVIA, 2019). De toda la producción de cítricos, aproximadamente el 58% corresponde a naranjas (Pacheco et al., 2019). La principal región citrícola a nivel nacional en España se encuentra en la comunidad Valenciana, donde se producen mayoritariamente mandarinas y naranjas (50% y 45% de la producción total de cítricos, respectivamente) (IVIA, 2019). El 45-60% de la fruta se deriva a la extracción de zumo dejando aproximadamente la mitad de su peso, en forma de albedo, flavedo, aceites esenciales, zumo, segmentos y membranas, como residuo. Por otro lado, la eliminación de la piel fresca es un problema importante para muchas fábricas ya que este tipo de subproducto es propenso al deterioro microbiano, lo que limita su posterior explotación (O'Shea et al., 2012). Algunas industrias dedicadas a la extracción de zumos cítricos secan los residuos y los venden como materia prima para la extracción de pectina o como granulados para la alimentación animal, aunque este proceso no es muy rentable (Mamma & Christakopoulos, 2014).

Los principales componentes de los residuos secos de la piel de los cítricos son: la celulosa (hasta un 35%), la pectina (hasta un 23%) y los azúcares (hasta un 23%, incluida la glucosa, la fructosa, la sacarosa y la xilosa), y entre los compuestos más atractivos para la producción industrial se encuentra, además, el D-limoneno. La piel cítrica es también rica en flavonoides y en vitaminas (principalmente vitamina C), minerales, fibra dietética, carotenoides y aceites esenciales (Chedea et al., 2010; Ahmed et al., 2017). La vitamina C en su forma reducida (ácido L-ascórbico, AA) y oxidada (ácido dehidroascórbico, ADHA) previene el daño oxidativo de lípidos, ADN y proteínas, que están asociados con el desarrollo de enfermedades degenerativas crónicas como enfermedades cardiovasculares, cáncer y cataratas (Escobedo-Avellaneda et al., 2014). Tanto el AA como el ADHA tienen funciones biológicas (Oro & Donnamaría, 2006), sin embargo, el ADHA tiene un 20% menos de actividad que el AA (Camacho & Martínez-Navarrete, 2019).

Por otra parte, los flavonoides son compuestos naturales que pertenecen a una clase de metabolitos secundarios de las plantas con estructura polifenólica que tienen efectos bioquímicos y antioxidantes favorables asociados con varias enfermedades como el cáncer, Alzheimer y aterosclerosis, entre otras (Panche et al., 2016). El flavonoide mayoritario, en el caso de las naranjas, es la hesperidina, que representa el 50% de los compuestos fenólicos totales (O'Shea et al., 2012) y está especialmente ubicada en la piel (Escobedo-Avellaneda et al., 2014; Lahmer et al., 2015; M'hiri et al., 2014; Roussos, 2011; Sánchez-Moreno et al., 2003). Ésta, mejora la microcirculación, posee un alto efecto antioxidante, efectos antiinflamatorios y analgésicos, disminuye los lípidos en la sangre, ayuda a la cicatrización de las úlceras venosas y presenta una marcada actividad anticancerosa entre otros beneficios para la salud (Adham, 2015; El-Shafae & El-Domiaty, 2001;

Kanaze et al., 2004). En la actualidad, la recuperación de compuestos bioactivos está ganando importancia en la industria de los subproductos alimentarios (Dugmore et al., 2017).

Teniendo en cuenta el potencial como fuente natural de antioxidantes que tienen los residuos generados en la industria de transformación de los cítricos, y pensando en la rentabilidad y sostenibilidad de los procesos, la liofilización podría proponerse como un proceso viable para un aprovechamiento sostenible de la naranja. Ésta técnica de deshidratación permite la obtención de productos de alta calidad y que es, sobre todo, adecuada para alimentos que contienen compuestos sensibles al calor (Berk, 2018). Por lo tanto, puede utilizarse para la obtención de productos a partir de la parte no comestible de la naranja, los cuales podrían ser consumidos directamente como alimentos o como ingredientes. Por otro lado, las condiciones de liofilización, como puede ser la temperatura de las bandejas del liofilizador, también pueden influir en la estabilidad de los compuestos. Es importante tener en cuenta que la mayoría de sólidos solubles de los frutos son azúcares de baja masa molecular, los cuales, al ser sometidos a la eliminación rápida de agua por sublimación, dan como resultado una matriz amorfa que pueden sufrir cambios relacionados con la temperatura de transición vítrea (T_g) que incluyen pegajosidad, apelmazamiento y gomosidad, lo que propicia la inestabilidad del producto deseado (Telis & Martínez-Navarrete, 2012). Una de las estrategias de control de este problema es la adición de biopolímeros de alto peso molecular, antes de la liofilización, para aumentar su T_g . La goma arábica y la fibra de bambú representan algunos de estos biopolímeros. La goma arábica es un exudado de árboles maduros de Acacia, utilizado ampliamente en preparaciones farmacéuticas, es un buen emulsionante, previene la adsorción del agua, la oxidación y la volatilización de compuestos (García-Martínez et al., 2018). Por otra parte, numerosos estudios evidencian los múltiples beneficios biológicos y farmacológicos de la fibra de bambú, además de que es utilizado como aditivo alimentario y como antioxidante natural (Lu et al., 2005).

Por todo ello, el objetivo de este estudio es ver la influencia de la matriz en la estabilidad de los compuestos bioactivos mayoritarios de la naranja, específicamente la vitamina C, el ácido L-ascórbico, el ácido dehidroascórbico y la hesperidina obtenidos del coproducto del puré y del zumo de naranja, durante la liofilización. Así, se pretende estudiar también el interés de añadir biopolímeros estabilizantes y de variar la temperatura de las bandejas del liofilizador para obtener la máxima preservación de estos compuestos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materia prima

Las naranjas (*Citrus sinensis* (L.) var. Valencia-Late) fueron compradas en un supermercado local (Valencia, España). Éstas fueron seleccionadas por su apariencia visual, tomando en cuenta su tamaño, color, ausencia de daños físicos y firmeza. Los biopolímeros (Bp) utilizados en el proceso como antiapelmazantes, antihumectantes y encapsulantes fueron la goma arábica

(GA) (Scharlau, España) y la fibra de bambú (FB) (VITACEL® Rosenberg, Alemania).

2.2 Preparación de muestras

Se trabajó con dos tipos de coproductos de naranja previamente lavada: el coproducto del puré (CoP) conformado por el flavedo y el albedo, obtenido mediante el pelador de naranja, (Orange Peel INOX, Pelamatic, 220V 50W, España) y el coproducto de zumo (CoZ) conformado por el flavedo, albedo, eje central y septos, obtenido después de la extracción de zumo de las naranjas lavadas y cortadas, utilizando un extractor de zumo (Exprimidor naranjas c/brazo 120W, Lacor, España).

Parte de los coproductos fueron formulados con 5 g GA y 1 g FB / 100 g de muestra, obteniendo las muestras CoPBp y CoZBp. Las cantidades utilizadas se seleccionaron tomando en cuenta los resultados de estudios previos (Agudelo et al., 2017).

Todas las muestras (CoP, CoPBp, CoZ y CoZBp) fueron diluidas, para facilitar su manejo, en una relación 1:1 con ácido oxálico (Scharlau, España) al 0,1%, trituradas y homogeneizadas en la picadora emulsionadora (Eurofred, España) durante 1 min, y a velocidad 4 durante 40 segundos y velocidad 9 durante 40 segundos en un robot de laboratorio (Thermomix Vorwek TM-21, España).

Parte de las muestras CoZ y CoZBp obtenidas fueron reservadas para la extracción de los compuestos bioactivos. Esta se realizó con ácido oxálico al 0,1% en una relación de 1:9 (coproducto: ácido oxálico) con agitación magnética (MS-51M, Jeio Tech, Korea) durante 10 min. El extracto obtenido fue filtrado a través de un filtro de membrana de nylon 90 µm (VWR, Radnor, PA, USA) para obtener las muestras ECoZ y ECoZBp.

Todas las muestras preparadas y homogeneizadas, incluyendo los extractos, se depositaron en bandejas de aluminio de 10,2 cm x 7,6 cm con un espesor de 1 cm y se congelaron a -45°C (Liebherr LGT 2325, Alemania) durante 24 horas.

2.3 Liofilización de muestras

Las muestras congeladas se separaron en dos lotes y se introdujeron en un liofilizador Teslar Lyo Quest-55 (España) a -55°C en el condensador y con presión de la cámara de 0,050 mbar. Se realizaron ensayos sin calentamiento de bandejas del liofilizador, a temperatura ambiente de 25°C (Lote 1) durante 26 horas, y con calentamiento de bandeja del liofilizador hasta 50°C (Lote 2) durante 18 horas.

Los extractos ECoZ y ECoZBp fueron liofilizados en las mismas condiciones que el Lote 1.

2.4 Determinaciones analíticas

2.4.1 SÓLIDOS SOLUBLES

Al zumo fresco, al puré y a los diferentes coproductos (CoZ, CoZBp, CoP y CoPBp) se les midió en contenido en sólidos solubles totales (°Brix), mediante un refractómetro Refracto 30PX (Mettler Toledo, Japón).

2.4.2 ANÁLISIS DE HUMEDAD

La humedad de las muestras, antes de ser liofilizadas, fueron analizadas según el método AOAC 934.06,2000, en una estufa de vacío a 60°C y presión <100 mmHg (Vacioterm, J.P., Selecta), hasta llegar a peso constante.

Después del proceso de liofilización, las muestras deshidratadas fueron analizadas mediante un valorador coulométrico Karl-Fisher automático (C10s Mettler Toledo Compact Coulometric KF Titrator, Columbus, Ohio, SUA).

Este parámetro se expresó en g agua/ 100 g muestra. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.4.3 ANÁLISIS DE VITAMINA C, ÁCIDO ASCÓRBICO Y ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO

La vitamina C (VC) tiene dos formas activas: el ácido ascórbico (AA) y su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (ADHA) (Sánchez-Mata et al., 2000).

Los análisis del contenido de VC y AA se llevaron a cabo mediante técnicas cromatográficas para las cuales se empleó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) conectado a un detector DAD (Jasco equipment, Italia), una columna KromaPhase 100 C18 5µm (250x4.6mm) (Scharlaw, Spain) y las siguientes condiciones cromatográficas: 20 µL de volumen de inyección, velocidad de flujo de 1mL/min y ácido oxálico al 0,1% como fase móvil. La identificación se realizó a una longitud de onda de 243 nm.

El ADHA se determinó mediante el cálculo de la diferencia de concentración de VC y AA debido a su alta inestabilidad

Para la extracción del AA, se tomó 1g de muestra y se disolvió en 9 mL de disolución de ácido oxálico (0,1% p/v) (Xu et al., 2008). Después de homogeneizar manualmente y haber estado en reposo durante 3 minutos en oscuridad, la disolución se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 µm antes de inyectar el analito en el equipo de HPLC. Las mediciones de AA se realizaron por cuadruplicado.

El procedimiento utilizado para la determinación del contenido total de la VC (AA+ADHA) fue la reducción del ADHA a AA (Sánchez-Moreno et al., 2003) utilizando DL-ditiotreitol (DTT) (Scharlau, España) como agente reductor. Se tomó una alícuota de 0,5 g para muestras frescas o 0,075 g para muestras liofilizadas para reaccionar con 2 mL de disolución de DTT (20 g/L) durante 2 horas en la oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento que el utilizado para el método del AA por sextuplicado.

Para la preparación de las curvas de calibrado de la VC y del AA, una batería de disoluciones patrón de AA (Dr. Ehrenstorfer, Alemania) con cinco concentraciones diferentes se analizaron por cuadruplicado para establecer la curva de calibrado de la VC y del AA, ambas disoluciones en ácido oxálico al 0,1% como disolvente.

Las curvas fueron construidas en función del área de pico obtenido respecto a la concentración conocida del analito. Los ensayos indicaron una linealidad para un intervalo de concentración de 50 a 410 mg/L con un coeficiente de correlación R^2 de 0,9829 para la vitamina C, y de entre 50 y 410 mg/L de ácido ascórbico con un coeficiente de correlación de R^2 0,9972.

Los valores de VC, AA y ADHA, tanto de las muestras frescas como liofilizadas, se expresaron en mg compuesto/100 g muestra fresca.

2.4.4 ANÁLISIS DE HESPERIDINA

El análisis de hesperidina (HES) se llevó a cabo mediante HPLC, a una longitud de onda de 284 nm, utilizando para la fase móvil un gradiente de agua y metanol grado HPLC. Las muestras fueron extractadas con dimetilsulfoxido DMSO (Scharlau, España) grado HPLC (Gorinstein et al., 2006; Manthey & Grohmann, 1996; Gómez-Mejía, et al., 2019) tomando 1 g de muestra fresca o 0,075 g de muestra liofilizada para reaccionar con 1 mL de agua bidestilada y 2 mL de DMSO, en agitación magnética durante 10 minutos. Posteriormente la disolución se centrifugó a 4200 rpm (GYROZEN 123GR) durante 10 min, a una temperatura de 4°C. Se recogió el sobrenadante con una jeringa y se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 μ m previo a su inyección en el cromatógrafo. Las mediciones se realizaron por triplicado. Los valores de HES, tanto de las muestras frescas como liofilizadas, se expresaron en mg HES/100 g muestra fresca.

2.5 Análisis estadístico

Con la finalidad de determinar las diferencias entre las muestras analizadas, se realizó un análisis de varianza simple (ANOVA) y multifactorial (MANOVA) utilizando el programa Statgraphics Centurion versión XVII con un nivel de confianza del 95% (p-value < 0,05).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización de las muestras frescas

La Tabla 1 muestra el contenido de sólidos solubles, agua, VC, AA y HES de las muestras frescas previas a su liofilización. El zumo de naranja presentó un valor medio de $12,1 \pm 0,10$ g sólidos solubles/100 g de muestra, parecido al reportado por Arévalo Martín (2013) y por Sánchez-Moreno (2003) en zumo de naranja. Se observa una diferencia significativa entre los productos y los coproductos, siendo los últimos los que mayor contenido en sólidos solubles presentan. Por otra parte, y como era de esperar, las muestras que

presentaron mayor concentración de sólidos solubles fueron los coproductos con Bp añadidos (CoPBp y CoZBp) y que, por naturaleza propia, cuentan con un mayor contenido de fibra.

En cuanto a la humedad, el análisis estadístico señaló que existen diferencias entre todas las muestras, sin embargo, las diferencias son mínimas entre los coproductos en comparación con el contenido de agua del zumo, probablemente debido a la diferente composición de la matriz. Las diferencias significativas entre los datos obtenidos para los coproductos pueden ser debidos a la alta reproducibilidad en los análisis representada por una baja desviación estándar.

Tabla 1. Composición química y fisicoquímica del zumo, del puré y de los coproductos frescos obtenidos de la extracción y preparación de zumo y puré de naranja.

Muestra ¹	°Brix ²	X _w ³	VC ⁴	AA ⁴	HES ⁴
Zumo	12,10 ± 0,15 ^b	0,8930±0,0005 ^e	49 ± 4 ^a	53 ± 3 ^d	38 ± 6 ^a
Puré	11,16 ± 0,15 ^a	0,8580±0,0005 ^b	53,4 ± 0,9 ^a	32,1 ± 0,7 ^b	36 ± 2 ^a
CoP	14,20 ± 0,10 ^c	0,8460±0,0015 ^a	149 ± 12 ^d	11 ± 2 ^a	102 ± 15 ^b
CoPBp	18,3 ± 0,3 ^e	0,8570±0,0005 ^b	136 ± 8 ^{bc}	16 ± 3 ^a	146 ± 41 ^c
CoZ	16 ± 0,1 ^d	0,8660±0,0007 ^d	133 ± 3 ^b	37 ± 3 ^{bc}	371 ± 30 ^d
CoZBp	19,30 ± 0,15 ^f	0,8630±0,0018 ^c	144± 4 ^{cd}	38 ± 5 ^c	161 ± 23 ^c

1: Identificación de las muestras explicadas en la sección de preparación de muestras
2: g de sólidos solubles/100 g muestra a 20°C
3: g agua/ g muestra
4: VC: Vitamina C; AA: Ácido ascórbico; HES: Hesperidina, todos expresados en mg /100 g muestra
a-f: Superíndices de letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras (p<0,05) para el ANOVA realizado.

Los coproductos presentaron mayor contenido de VC que el zumo y el puré de naranja, aunque mostraron menores valores de contenido de AA. Teniendo en cuenta que el contenido en VC es la suma de los contenidos de AA y ADHA, podemos concluir que la mayor concentración de VC de los coproductos se debe a la alta concentración de ADHA. Escobedo-Avellaneda et al. (2014) mostraron resultados similares, encontraron que la piel de naranja contiene más ADHA que AA.

La concentración de VC fue mayor en el coproducto derivado de la extracción de puré (CoP), conformado por el flavedo y el albedo de la piel. Esta muestra, presentó una menor concentración de AA (11 ± 2 mg / 100 g de muestra) y una mayor concentración de ADHA (137,6 mg / 100 g de muestra), si lo comparamos con el coproducto derivado de la extracción del zumo (CoZ), conformado por el flavedo, albedo, eje central y septos, estos últimos con residuos de zumo y, por tanto, con mayor concentración de AA (37 ± 3 mg / 100 g de muestra).

La falta de ADHA en el zumo en comparación con las fracciones de los coproductos puede reflejar la protección del AA contra la oxidación por la piel de la naranja (Escobedo-Avellaneda et al., 2014).

Como se observa en la Tabla 1, todos los coproductos presentaron mayor concentración de HES que el zumo y el puré, no habiéndose encontrado

diferencias significativas entre estos dos últimos. Esto puede deberse a la baja solubilidad de la hesperidina en agua, que contribuye a la formación de la nube característica de los zumos, mientras que es casi 1000 veces mayor en la piel (Manthey & Grohmann, 1996), por lo que es de esperar su mayor concentración en la piel de la naranja.

3.2 Contenido de VC, AA y ADHA en los coproductos del zumo liofilizado y su extracto

Antes de estudiar en profundidad el impacto del proceso de liofilización en los compuestos bioactivos mayoritarios de la naranja, se quiso estudiar la mejor manera de estabilizarlos. Así, se comparó el contenido en VC, AA y ADHA del coproducto liofilizado de zumo, con y sin biopolímeros, con el de sus extractos liofilizados. La humedad que alcanzaron estas muestras fue de 0.048 ± 0.006 g agua/100 g muestra para los coproductos y de 0.073 ± 0.003 g agua/100 g muestra para los extractos liofilizados.

La Figura 1 muestra el contenido total de VC de los coproductos del zumo liofilizados (CoZ y CoZBp) y de sus respectivos extractos liofilizados (ECoZ y ECoZBp).

Los coproductos liofilizados presentaron mayor concentración de VC en comparación con el coproducto fresco. Como no es fácil explicar que un producto pueda ganar VC durante su liofilización, parece razonable pensar que el resultado sea consecuencia de la mayor o menor facilidad que presente la matriz para la extracción del compuesto. La mejor accesibilidad de VC en el coproducto liofilizado favorece su extracción.

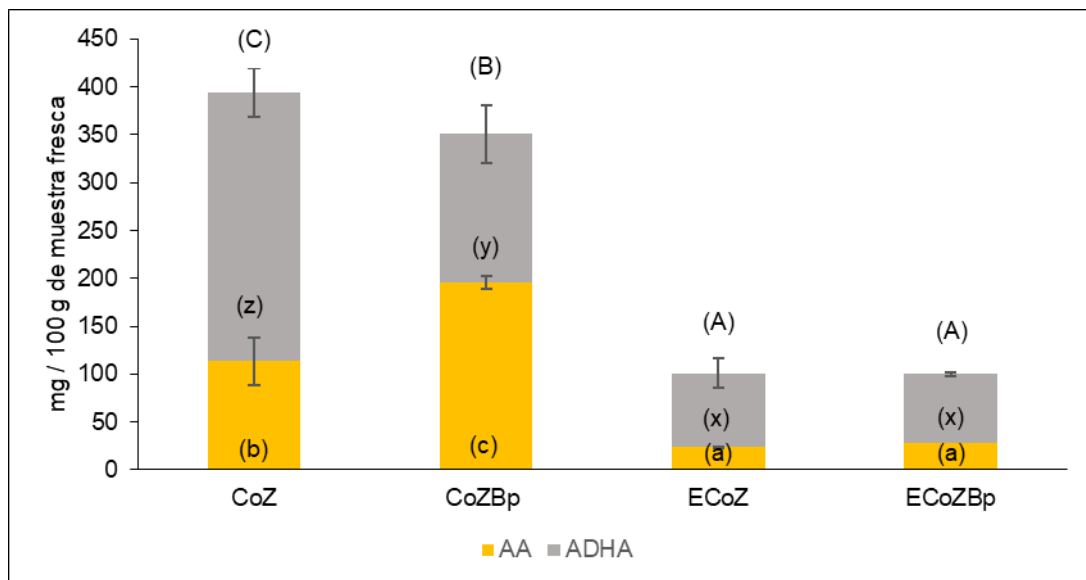


Figura 1. Contenido total de vitamina C (VC), ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) del coproducto del zumo sin (CoZ) y con biopolímeros añadidos (CoZBp) y de los extractos liofilizados (E). Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el ANOVA realizado entre las muestras: A-C para VC; x-z para ADHA y a-c para AA.

Los extractos liofilizados (ECoZ y ECoZBp) presentaron menor contenido de VC, AA y ADHA que CoZ y CoZBp. Estos resultados coinciden con los hallazgos del estudio realizado por Camacho y Martínez-Navarrete (2019). La VC se encuentra más expuesta y puede que se degrade más fácilmente. A pesar de que los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas en cuanto a AA y ADHA para las dos muestras, sí se observó un mayor contenido de AA en la muestra ECoZBp.

En cuanto a los coproductos, el CoZ presentó un contenido de VC total mayor que CoZBp, con una mayor contribución del ADHA que del AA. El mayor contenido de AA en CoZBp y ECoZBp podría indicar que la incorporación de biopolímeros (GA + FB) lo protege.

3.3 Contenido de VC, AA, ADHA y HES en los coproductos liofilizados del zumo y del puré de naranja.

Debido a los bajos rendimientos obtenidos de los extractos ECoZ y ECoZBp en cuanto al contenido en VC, para estudiar el impacto de la liofilización en los compuestos bioactivos mayoritarios de la naranja se optó por trabajar directamente con los coproductos, tanto del zumo como del puré.

Las muestras liofilizadas con y sin Bp, a 25 °C y a 50 °C, presentaron humedades similares, alcanzando valores de entre 0.0370 ± 0.0007 y 0.052 ± 0.006 g agua/100 g muestra, respectivamente.

Las Figuras 2 y 3 muestran el contenido de VC, AA y ADHA de los coproductos, obtenidos de la extracción del zumo y del puré, liofilizados a dos temperaturas 25 y 50 °C, respectivamente.

La concentración total de VC de los coproductos liofilizados a 25°C (Figura 2) varió entre 341 ± 37 y 538 ± 21 mg VC/100 g de muestra fresca, siendo el último valor el correspondiente a CoP. Tal y como ocurría con CoZ y CoZBp, los coproductos liofilizados del puré presentaron más VC que el coproducto fresco, debido probablemente a la mejor extracción.

De igual manera que ocurrió en las muestras frescas, la fracción mayoritaria en la VC es el ADHA. Los coproductos del zumo presentaron mayor concentración de AA que de ADHA. Además, se observó nuevamente que los Bp protegen al AA en ambos coproductos.

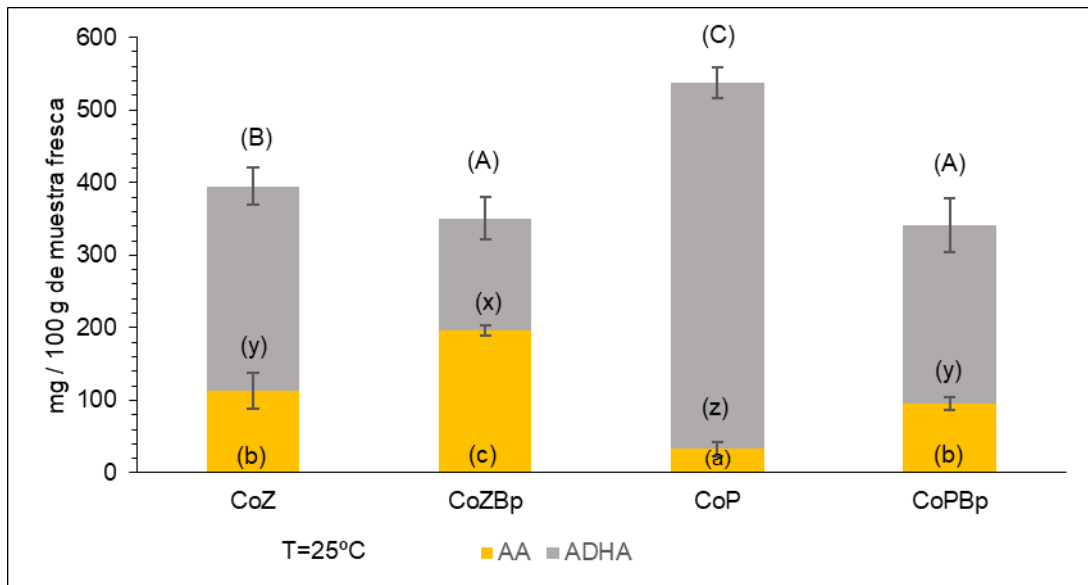


Figura 2. Contenido total de vitamina C (VC), ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) del coproducto del zumo (CoZ) y del coproducto del pure (CoZ) sin y con biopolímeros añadidos (CoZBp y CoPBp) liofilizados a 25°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el ANOVA realizado entre las muestras: A-C para VC; x-z para ADHA y a-c para AA.

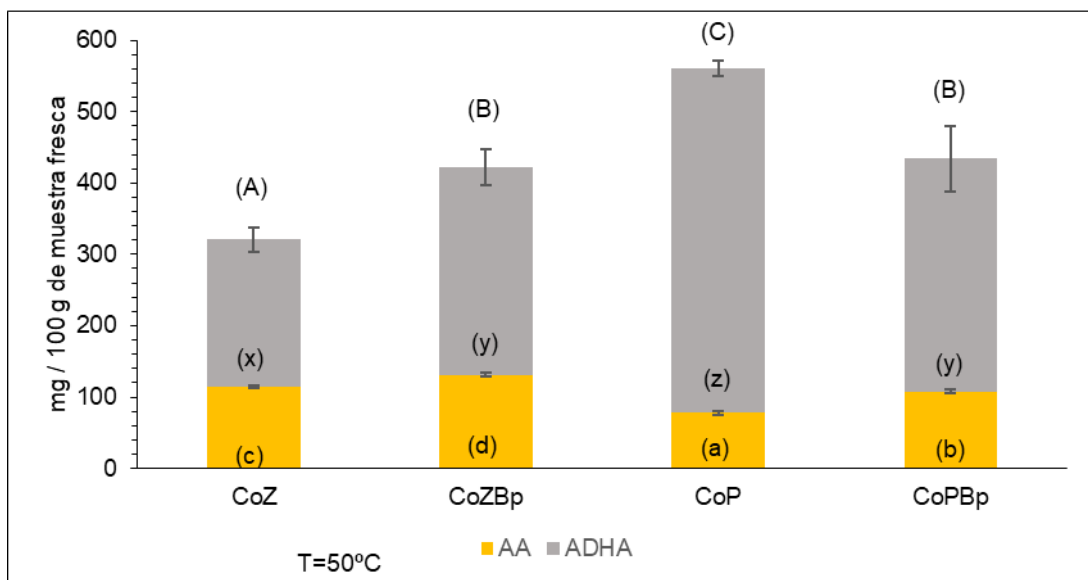


Figura 3. Contenido total de vitamina C (VC), ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADHA) del coproducto del zumo (CoZ) y del coproducto del pure (CoZ) con biopolímeros añadidos (CoZBp y CoPBp) liofilizados a 50°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el ANOVA realizado entre las muestras liofilizadas: A-C para VC; x-z para ADHA y a-c

En general, las muestras sometidas a calentamiento de bandeja de liofilizador a 50°C (Figura 3) tuvieron un comportamiento similar a las muestras liofilizadas a 25°C (Figura 2). Se observó un mayor contenido en VC de CoP y no existen diferencias significativas entre CoZBp y CoPBp. Por otra parte, también se observó una mayor concentración de esta vitamina al aumentar la temperatura de las bandejas, probablemente debido a la obtención de productos más porosos que facilitan la extracción (Egas-Astudillo et al., 2019).

Las Figuras 4 y 5 muestran el contenido de HES de los coproductos, obtenidos de la extracción del zumo y del puré, liofilizados a las dos condiciones de temperatura de bandeja del liofilizador (25 y 50°C), respectivamente.

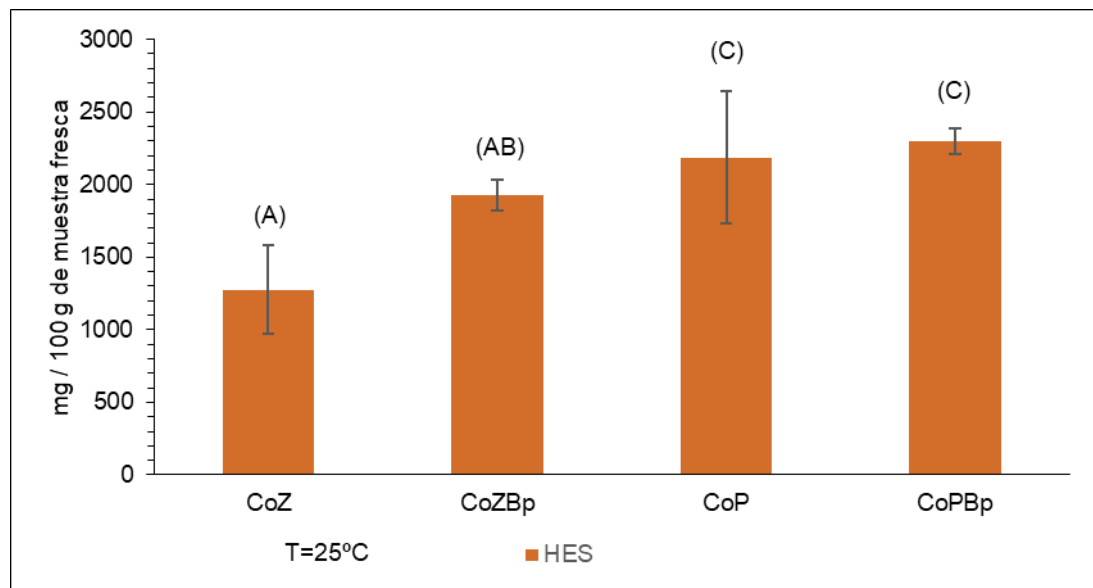


Figura 4. Contenido de hesperidina (HES) del coproducto del zumo (CoZ) y del coproducto del pure (CoZ) con biopolímeros añadidos (CoZBp y CoPBp) liofilizados a 25°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el ANOVA realizado entre las muestras.

En ambas condiciones de temperatura, el comportamiento fue similar, la temperatura no afectó significativamente al contenido en HES. Los coproductos del puré fueron lo que presentaron una mayor concentración de HES observándose una posible protección de este compuesto por la adición de Bp.

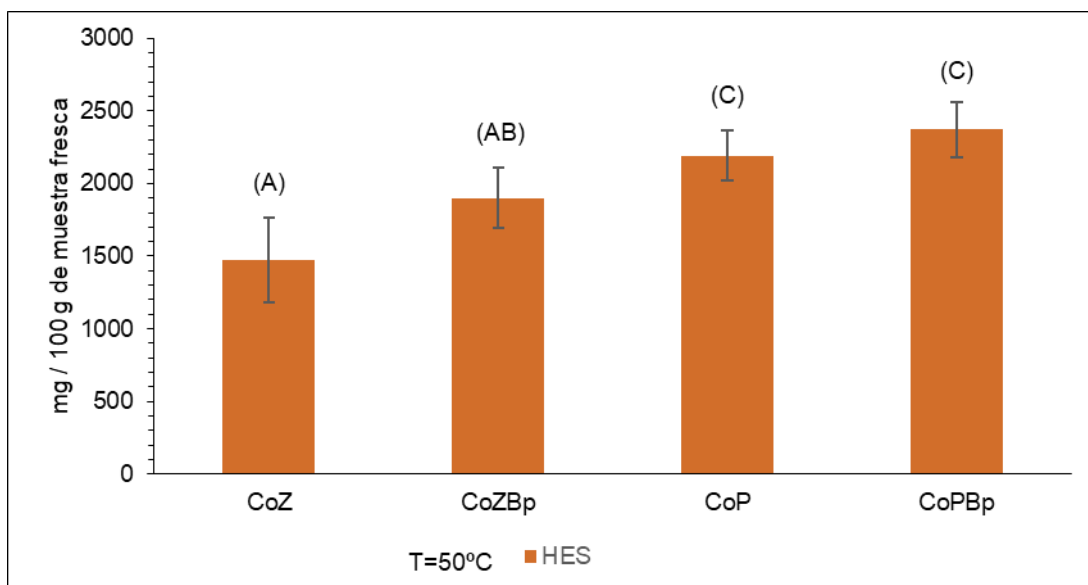


Figura 5. Contenido de hesperidina (HES) del coproducto del zumo (CoZ) y del coproducto del pure (CoZ) con biopolímeros añadidos (CoZBp y CoPBp) liofilizados a 50°C. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para el ANOVA realizado entre las muestras.

Para analizar los efectos de los diferentes factores (matriz, incorporación de Bp y temperatura de las bandejas del liofilizador) en los diferentes compuestos, se realizó un análisis de la varianza multifactorial (MANOVA) con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Los resultados del análisis estadístico indicaron que, para los CoZ, la adición de Bp sugiere una protección de la HES, la VC y el AA, pero no del ADHA. La temperatura no afecta al contenido de HES ni al de VC, aunque éste último compuesto se mantiene constante porque, mientras que AA disminuye, el ADHA aumenta.

En el caso de los CoP, la incorporación de Bp parece proteger a la HES y al AA pero no a la VC ni al ADHA. A su vez, la HES no se ve afectada por el aumento de temperatura de bandeja a 50°C, que sí tiene un efecto sobre la VC, AA y ADHA, aumentando sus concentraciones.

En general, podríamos concluir que los Bp protegen al AA y a la HES pero no al ADHA. Así, la VC más rica en AA es más estable cuando se incorporan Bp que aquella más rica en ADHA. La temperatura no afecta al contenido en HES y parece que puede favorecer la extracción de VC, AA y ADHA, probablemente por la mayor porosidad del producto obtenido (Egas-Astudillo, 2019).

4. CONCLUSIONES

Los coproductos tienen un mayor contenido de VC y de HES que la parte comestible de la fruta (el puré y el zumo).

Los extractos liofilizados ECoZ y ECoZBp son físicamente muy inestables y presentan una estructura difícil de manejar, además de que presentan un

contenido muy bajo de VC. Por esto, se recomienda, si se quiere conservar la mayor cantidad de compuestos bioactivos, liofilizar directamente el coproducto derivado de la extracción de zumo y/o del puré para no perder los compuestos de interés.

Los resultados obtenidos hasta ahora confirman la conveniencia de la liofilización del coproducto para preservar los compuestos bioactivos y extraerlos posteriormente. Asimismo, estos coproductos liofilizados, podrían utilizarse como ingrediente alimenticio.

Las condiciones de liofilización (temperatura de la bandeja del liofilizador) como las del procesamiento de las muestras (adición de Bp), afectan la estabilidad de los compuestos bioactivos. Por lo tanto, para obtener un coproducto de alta calidad y/o extraer la mayor cantidad de bioactivos de los coproductos estudiados, se recomienda la incorporación de GA y FB en la formulación y liofilizar las muestras calentando las bandejas a 50°C. Liofilizar a esta temperatura, además, disminuye un 30% el tiempo de liofilización.

5. AGRADECIMIENTOS

Estoy especialmente agradecida con mi tutora Ma. del Mar, por creer en mí, por su apoyo incondicional, por su dedicación, por permitirme ser parte de su equipo y sobre todo con su paciencia y despertar mi interés en la investigación. Agradecer también a Nuria por sus valiosos comentarios y estupendas recomendaciones sobre el tema. Agradecer a mi mamá, a mi papá y hermanos por su esfuerzo y apoyo a lo largo de este camino.

6. REFERENCIAS

- Adham, A. N. (2015). RP-HPLC Method Growing in Kurdistan Region / Iraq. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 33(46), 220–224.
- Agudelo, C., Igual, M. M., Camacho, M. M., & Martínez-Navarrete, N. (2017). Effect of process technology on the nutritional, functional, and physical quality of grapefruit powder. *Food Science and Technology International*, 23(1), 61–74. <https://doi.org/10.1177/1082013216658368>
- Ahmed, O. M., Hassan, M. A., Abdel-Twab, S. M., & Abdel Azeem, M. N. (2017). Navel orange peel hydroethanolic extract, naringin and naringenin have anti-diabetic potentials in type 2 diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 94, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.094>
- Arévalo Martín, M. (2013). Determinaciones cuantitativas en naranja mediante tecnologías nirs. *Universidad Pública de Navarra*, 11–33.
- Berk, Z. (2018). Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration. *Food Process Engineering and Technology*, 567–581. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812018-7.00023-3>
- Camacho, M. del M., & Martínez-Navarrete, N. (2019). Freeze-Dried Co-Product of Orange Juice Extraction As a Source of Vitamin C. *MDPI*, (3rd edition).
- Chedea, V. S., Kefalas, P., & Socaciu, C. (2010). Patterns of carotenoid pigments extracted from two orange peel wastes (Valencia and Navel var.). *Journal of Food Biochemistry*, 34(1), 101–110. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00267.x>
- Dugmore, T. I. J., Clark, J. H., Bustamante, J., Houghton, J. A., & Matharu, A. S. (2017). Valorisation of Biowastes for the Production of Green Materials Using Chemical Methods. *Topics in Current Chemistry*, 375(2), 1–49. <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0133-8>

- Egas-Astudillo, L., Martínez-Navarrete, N., & Camacho, M. (2019). Impact of biopolymers added to a grapefruit puree and freeze-drying shelf temperature on process time reduction and product quality. *Journal of Food Bioproducts*. (En revisión)
- El-Shafae, A. M., & El-Domiaty, M. M. (2001). Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26(4), 539–545. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00476-9](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00476-9)
- Escobedo-Avellaneda, Z., Gutiérrez-Urbe, J., Valdez-Fragoso, A., Torres, J. A., & Welti-Chanes, J. (2014). Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. *Journal of Functional Foods*, 6(1), 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.013>
- FAO. (2017). Citrus Fruit Fresh and Processed Statistical. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 77. Retrieved from <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citrus-fruit/en/%0A>
- García-Martínez, E., Andújar, I., Yuste del Carmen, A., Prohens, J., & Martínez-Navarrete, N. (2018). Antioxidant and anti-inflammatory activities of freeze-dried grapefruit phenolics as affected by gum arabic and bamboo fibre addition and microwave pretreatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(8), 3076–3083. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8807>
- Gómez-Mejía, E., Rosales-Conrado, N., León-González, M. E., & Madrid, Y. (2019). Citrus peels waste as a source of value-added compounds: Extraction and quantification of bioactive polyphenols. *Food Chemistry*, 295(November 2018), 289–299. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.136>
- Gorinstein, S., Huang, D., Leontowic, H., Leontowicz, M., Yamamoto, K., Soliva-Fortuny, R., ... Trakhtenberg, S. (2006). Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography. The antioxidant potential of citrus fruit. *Acta Chromatographica*, 17(January), 108–124.
- IVIA. (2019, 08 24). *Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias*. Récupéré sur <http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana>
- Kanaze, F. I., Kokkalou, E., Georgarakis, M., & Niopas, I. (2004). A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin in urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(1), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.05.015>
- Lahmer, N., Belboukhari, N., Cheriti, A., & Sekkoum, K. (2015). Hesperidin and hesperitin preparation and purification from Citrus sinensis peels. *Der Pharma Chemica*, 7(2), 1–4.
- Lu, B., Wu, X., Tie, X., Zhang, Y., & Zhang, Y. (2005). Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. *Food and Chemical Toxicology*, 43(5), 783–792. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.019>
- Mamma, D., & Christakopoulos, P. (2014). Biotransformation of Citrus By-Products into Value Added Products. *Waste and Biomass Valorization*, 529-549. [doi:https://doi.org/10.1007/s12649-013-9250-y](https://doi.org/10.1007/s12649-013-9250-y)
- M'hiri, N., Ioannou, I., Ghoul, M., & Boudhrioua, N. M. (2014). Extraction Methods of Citrus Peel Phenolic Compounds. *Food Reviews International*, 30(4), 265–290. <https://doi.org/10.1080/87559129.2014.924139>
- Manthey, J. A., & Grohmann, K. (1996). Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3), 811–814. <https://doi.org/10.1021/jf950572g>
- O'Shea, N., Arendt, E. K., & Gallagher, E. (2012). Dietary fibre and phytochemical characteristics of fruit and vegetable by-products and their recent applications as novel ingredients in food products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.06.002>
- Oro, J. R. D. X., & Donnamaría, M. C. (2006). Acción farmacológica, biofísicoquímica y estructura dinámica de la vitamina C. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25(1), 145–154.
- Pacheco, M. T., Moreno, F. J., & Villamiel, M. (2019). Chemical and physicochemical characterization of orange by-products derived from industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 868–876. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9257>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of*

- Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Roussos, P. A. (2011). Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece. *Scientia Horticulturae*, 129(2), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.040>
- Sánchez-Mata, M. C., Cámara-Hurtado, M., Díez-Marqués, C., & Torija-Isasa, M. E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research and Technology*, 210(3), 220–225. <https://doi.org/10.1007/PL00005516>
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., De Ancos, B., & Cano, M. P. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 430–439. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1392>
- Telis, V. R. N., & Martínez-Navarrete, N. (2012). Biopolymers used as drying aids in spray-drying and freeze-drying of fruit juices and pulps. *Biopolymer Engineering in Food Processing*, 279–325. <https://doi.org/10.1201/b12048>
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., & Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.046>