



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escuela Técnica Superior
de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

IMPACTO DE DIFERENTES BIOPOLÍMEROS EN LA BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA NARANJA

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso académico: 2019-2020

Valencia, Noviembre de 2019

Autora: Cebrián Guija, Andrea

Tutora: Martínez Navarrete, Nuria

Cotutora: García Martínez, Eva

Directora experimental: Silva Espinoza, Marilú Andrea

IMPACTO DE DIFERENTES BIOPOLÍMEROS EN LA BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA NARANJA

Valencia, noviembre de 2019

Resumen

Las frutas, además de nutrientes, contienen compuestos bioactivos que aportan efectos fisiológicos beneficiosos para la salud. No obstante, el consumo de frutas es deficitario entre la población, por lo que existe un interés, incluso desde la Administración, en promoverlo. Una posibilidad para ello es ofertar fruta en formatos que eviten algunos de los problemas que puede presentar su consumo en fresco, como pueden ser su estacionalidad, su corta vida útil y su incomodidad de manejo. En este sentido, la oferta de snacks de fruta deshidratada es una opción. No obstante, la fruta deshidratada presenta el inconveniente de que es altamente higroscópica y desarrolla rápidamente una textura pegajosa. Para estabilizar al producto y evitar el colapso de su estructura, es habitual la incorporación de biopolímeros de alto peso molecular. Muchos de estos compuestos actúan, además, como agentes encapsulantes de los compuestos bioactivos protegiéndolos de su pérdida durante el procesado o almacenamiento. No obstante, si se da esta encapsulación, podría suceder que ésta limitara también la absorción de los compuestos durante su digestión. En este sentido, en este trabajo se ha estudiado el impacto de diferentes biopolímeros, como goma Arábiga, fibra de bambú, almidón de maíz nativo, almidón sustituido con grupos octenilsuccínico, fibra de guisante y maltodextrina, en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos de un snack de naranja obtenido por liofilización. Con el fin de evaluar la bioaccesibilidad de las diferentes formulaciones se realizaron digestiones *in vitro* y se analizaron, después de la fase oral, gástrica e intestinal, el contenido en vitamina C, fenoles totales y carotenoides totales, así como la actividad antioxidante. Estos análisis se realizaron también a las muestras antes y después de su liofilización, previo a la digestión *in vitro*. Los resultados mostraron que la concentración de los compuestos bioactivos, especialmente la de los carotenoides, y, consecuentemente, la actividad antioxidante, se vieron afectadas por la acción de las enzimas y del pH en cada etapa de la digestión *in vitro*. El producto liofilizado con goma Arábiga y fibra de bambú fue el que mayor bioaccesibilidad tanto de fenoles totales como de vitamina C presentó, lo cual garantiza un excelente aporte nutricional y supone una ventaja adicional del consumo de fruta en este formato tipo snack.

Palabras clave: Biopolímeros, vitamina C, fenoles totales, carotenoides totales, actividad antioxidante, liofilización, bioaccesibilidad, naranja.

Autora: Cebrián Guija, Andrea.

Tutora: Martínez Navarrete, Nuria.

Cotutora: García Martínez, Eva.

Directora Experimental: Silva Espinoza, Marilú Andrea.

IMPACT OF DIFFERENT BIOPOLYMERS ON THE BIOACCESSIBILITY OF ORANGE BIOACTIVE COMPOUNDS

Valencia, November 2019.

Abstract

Fruits, in addition to nutrients, contain bioactive compounds that provide physiological effects beneficial to health. However, fruit consumption is deficient among the population, so there is an interest, even from the Administration, in promoting it. One possibility for this is to offer fruit in formats that avoid some of the problems that its consumption in fresh can present, such as its seasonality, its short useful life and its discomfort of handling. In this sense, the offer of dehydrated fruit snacks is an option. However, dehydrated fruit has the disadvantage that it is highly hygroscopic and rapidly develops a sticky texture. To stabilize the product and avoid the collapse of its structure, the incorporation of high molecular weight biopolymers is common. Many of these compounds also act as encapsulating agents for bioactive compounds, protecting them from loss during processing or storage. However, if this encapsulation occurs, it could happen that it also limits the absorption of the compounds during their digestion. In this sense, in this work we have studied the impact of different biopolymers, such as Arabic gum, bamboo fiber, native corn starch, substituted starch with octenylsuccinic groups, pea fiber and maltodextrin, in the bioaccessibility of bioactive compounds of an orange snack obtained by freeze-drying. In order to evaluate the bioaccessibility of the different formulations, *in vitro* digestions were performed and the vitamin C content, total phenols and total carotenoids, as well as antioxidant activity were analyzed after the oral, gastric and intestinal phase. These analyzes were also performed on the samples before and after freeze-drying, prior to *in vitro* digestion. The results showed that the concentration of bioactive compounds, especially that of carotenoids, and, consequently, antioxidant activity, were affected by the action of enzymes and pH at each stage of *in vitro* digestion. The freeze-dried product with Arabic gum and bamboo fiber was the one with the greatest bioaccessibility of both total phenols and vitamin C, which guarantees an excellent nutritional contribution and represents an additional advantage of the consumption of fruit in this snack format.

Key words: Biopolymers, vitamin C, total phenols, total carotenoids, antioxidant activity, freeze-drying, bioaccessibility, orange.

Author: Cebrián Guija, Andrea.

Tutor: Martínez Navarrete, Nuria.

Cotutora: García Martínez, Eva.

Experimental Director: Silva Espinoza, Marilú Andrea.

IMPACTE DE DIFERENTS BIOPOLÍMERS EN LA BIOACCESSIBILITAT DELS COMPOSTOS BIOACTIUS DE LA TARONJA

València, novembre de 2019.

Resum

Les fruites, a més de nutrients, contenen compostos bioactius que aporten efectes fisiològics beneficiosos per a la salut. No obstant això, el consum de fruites és deficitari entre la població, per la qual cosa existeix un interès, fins i tot des de l'Administració, a promoure'l. Una possibilitat per a això és oferir fruita en formats que eviten alguns dels problemes que pot presentar el seu consum en fresc, com poden ser la seua estacionalitat, la seua curta vida útil i la seua incomoditat de maneig. En aquest sentit, l'oferta de snacks de fruita deshidratada és una opció. No obstant això, la fruita deshidratada presenta l'inconvenient que és altament higroscòpica i desenvolupa ràpidament una textura enganxosa. Per a estabilitzar al producte i evitar el col·lapse de la seua estructura, és habitual la incorporació de biopolímers d'alt pes molecular. Molts d'aquests compostos actuen, a més, com a agents encapsulants dels compostos bioactius protegint-los de la seua pèrdua durant el processament o emmagatzematge. No obstant això, si es dona aquesta encapsulació, podria succeir que aquesta limitara també l'absorció dels compostos durant la seua digestió. En aquest sentit, en aquest treball s'ha estudiat l'impacte de diferents biopolímers, com la goma Aràbiga, fibra de bambú, midó de dacsca nativa, midó substituït amb grups octenilsuccínico, fibra de pèsol i maltodextrina, en la bioaccessibilitat dels compostos bioactius d'un snack de taronja obtingut per liofilització. Amb la finalitat d'avaluar la bioaccessibilitat de les diferents formulacions es van realitzar digestions *in vitro* i es van analitzar, després de la fase oral, gàstrica i intestinal, el contingut en vitamina C, fenols totals i carotenoides totals, així com l'activitat antioxidant. Aquestes anàlisis es van realitzar també a les mostres abans i després de la seua liofilització, previ a la digestió *in vitro*. Els resultats van mostrar que la concentració dels compostos bioactius, especialment la dels carotenoides, i, conseqüentment, l'activitat antioxidant, es van veure afectades per l'acció dels enzims i del pH en cada etapa de la digestió *in vitro*. El producte liofilitzat amb goma Aràbiga i fibra de bambú va ser el que major bioaccessibilitat tant de fenols totals com de vitamina C va presentar, la qual cosa garanteix una excel·lent aportació nutricional i suposa un avantatge addicional del consum de fruita en aquest format tipus snack.

Paraules clau: Biopolímers, vitamina C, fenols totals, carotenoides totals, activitat antioxidant, liofilització, bioaccessibilitat, taronja.

Autora: Cebrián Guija, Andrea.

Tutora: Martínez Navarrete, Nuria.

Cotutora: García Martínez, Eva.

Directora Experimental: Silva Espinoza, Marilú Andrea.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. IMPORTANCIA DEL CONSUMO DE FRUTAS. COMPUESTOS BIOACTIVOS E IMPORTANCIA SOBRE LA SALUD.	1
1.2. LIOFILIZACIÓN.....	2
1.3. BIOPOLÍMEROS	3
1.4. BIOACCESIBILIDAD	4
2. OBJETIVO	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 MATERIAS PRIMAS.....	7
3.2 METODOLOGÍA	7
3.2.1 Preparación de las muestras y condiciones de liofilización.....	7
3.2.2. Digestión in vitro.....	7
3.2.3 DETERMINACIONES ANALÍTICAS	8
3.2.3.1. Humedad	8
3.2.3.2. Fenoles totales.....	8
3.2.3.3. Carotenoides totales.....	8
3.2.3.4 Vitamina C	8
3.2.3.5 Actividad antioxidante.....	8
3.3 CÁLCULO DE LA BIOACCESIBILIDAD	9
3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	9
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	10
4.1 EFECTO DE LA DIGESTIÓN EN LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	10
4.2. BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS.....	14
5. CONCLUSIÓN	16
6. BIBLIOGRAFÍA	16

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Aparato digestivo humano.....	4
Figura 2: Contenido en fenoles totales en las diferentes etapas de digestión <i>in vitro</i> de las distintas formulaciones antes de liofilizar (A) y de los productos liofilizados (B). La nomenclatura asignada a las muestras (eje X) se corresponde con los diferentes biopolímeros utilizados en cada formulación (ver Tabla 2). Leyenda: muestra no digerida (ND) y después de la digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal interna (DII) y digestión intestinal externa (DIE).....	11
Figura 3: Contenido en vitamina C en las diferentes etapas de digestión <i>in vitro</i> de las distintas formulaciones antes de liofilizar (A) y de los productos liofilizados (B). La nomenclatura asignada a las muestras (eje X) se corresponde con los diferentes biopolímeros utilizados en cada formulación (ver Tabla 2). Leyenda: muestra no digerida (ND) y después de la digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal interna (DII) y digestión intestinal externa (DIE).....	12
Figura 4: Actividad antioxidante medida mediante el método FRAP en las diferentes etapas de digestión <i>in vitro</i> de las distintas formulaciones antes de liofilizar (A) y de los productos liofilizados (B). La nomenclatura asignada a las muestras (eje X) se corresponde con los diferentes biopolímeros utilizados en cada formulación (ver Tabla 2). Leyenda: muestra no digerida (ND) y después de la digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal interna (DII) y digestión intestinal externa (DIE).	13
Figura 5: Actividad antioxidante medida mediante el método DPPH en las diferentes etapas de digestión <i>in vitro</i> de las distintas formulaciones antes de liofilizar (A) y de los productos liofilizados (B). La nomenclatura asignada a las muestras (eje X) se corresponde con los diferentes biopolímeros utilizados en cada formulación (ver Tabla 2). Leyenda: muestra no digerida (ND) y después de la digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal interna (DII) y digestión intestinal externa (DIE).	14
Figura 6: Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos (Ec. 2) en las diferentes formulaciones para los productos formulados y liofilizados. Letras diferentes, mayúsculas (A, B) y minúsculas (a, b, c), indican diferencias significativas ($p < 0,05$) para los productos formulados antes y después de liofilizar, respectivamente. Las letras z e y indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el producto formulado y el producto liofilizado de cada formulación.	14
Figura 7: Bioaccesibilidad de la vitamina C (Ec. 2) expresada en porcentaje en las diferentes formulaciones para los productos formulados y liofilizados. Letras diferentes, mayúsculas (A, B) y minúsculas (a, b, c), indican diferencias significativas entre las muestras por el ANOVA ($p < 0,05$), para los productos formulados y liofilizados, respectivamente. Las letras z e y indican diferencias significativas por el ANOVA ($p < 0,05$) entre el producto formulado y el producto liofilizado de cada formulación.....	15

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional de la naranja por 100 g de porción comestible.....	1
Tabla 2. Cantidad de los diferentes biopolímeros añadidos en cada formulación (g/100 g de puré de naranja) y código asignado a las formulaciones.....	7
Tabla 3: Porcentaje de preservación ⁽¹⁾ de los diferentes compuestos y actividad antioxidante (métodos DPPH y FRAP), en el puré de naranja y en las distintas formulaciones (Tabla 2) por efecto del proceso de liofilización.	10
Tabla 4 : Contenido en carotenoides totales (media y desviación estándar) expresado como mg β -Caroteno/100g solutos de naranja, de todas las formulaciones elaboradas antes de liofilizar (ND_f), en los productos liofilizados (ND_l) y en las respectivas digestiones intestinales externas (DIE_A , DIE_B).....	12

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del consumo de frutas. Compuestos bioactivos e importancia sobre la salud.

El consumo de frutas es muy importante por las propiedades nutritivas y funcionales que éstas presentan, ejerciendo una función en la prevención de enfermedades (Montaña *et al.*, 2008; OMS/FAO, 2003). Por ello, la OMS recomienda incluir en la dieta unos 400 g diarios entre frutas y hortalizas (Restrepo *et al.*, 2014). Los cítricos son un cultivo primordial a nivel mundial, contando con una producción de alrededor de 100 millones de toneladas por año, siendo Brasil, E.E.U.U. y los países del mediterráneo son los principales productores del mundo (Leiton *et al.*, 2016). En cuanto a la caracterización nutricional, los cítricos están constituidos principalmente por hidratos de carbono simples (fructosa, sacarosa y glucosa), además de polisacáridos no amiláceos (fibra dietética) (Tabla 1). En la naranja la pectina constituye la mayor parte de la fibra, en torno a un 65-70%. El resto de fibra lo ocupa la celulosa, hemicelulosa y algo de lignina. Cabe destacar que la pectina es resistente a la hidrólisis por parte de las enzimas presentes en el intestino delgado, por ello se clasifica como fibra dietética (Rincón *et al.*, 2005). En lo que respecta a los compuestos bioactivos, la naranja destaca por su contenido en ácido ascórbico, folatos y carotenoides con actividad provitamínica A. Además, es rica en flavonoides, tales como la hesperidina, neohesperidina, naringina, narirutina, tangeretina y nobiletina (Fundación Española de la Nutrición, 2011).

Tabla 1. Composición nutricional de la naranja por 100 g de porción comestible.

Energía (kcal)	42	Fósforo (mg)	28
Proteínas (g)	0,8	Selenio (µg)	1
Hidratos de carbono (g)	8,6	Riboflavina (mg)	0,03
Fibra (g)	2	Vitamina B ₆ (mg)	0,06
Agua (g)	88,6	Folatos (µg)	37
Calcio (mg)	36	Vitamina B ₁₂ (µg)	0
Hierro (mg)	0,3	Vitamina C (mg)	50
Magnesio (mg)	12	Vitamina A (µg Retinol)	40
Sodio (mg)	3	Vitamina E (mg)	0,2
Potasio (mg)	200	Tiamina (mg)	0,1

Fuente: Moreiras *et al.*, 2013.

Los compuestos bioactivos de los cítricos como la naranja, mandarina y pomelo y su potencial contribución a la mejora de la salud de las personas está siendo un tema primordial para los investigadores. En concreto, la vitamina C, los compuestos fenólicos y los carotenoides presentes en los cítricos parecen contribuir a la prevención de enfermedades tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y cataratas (Gorinstein *et al.*, 2001; Igual *et al.*, 2011). Estos efectos de protección parecen estar ligados a su actividad antioxidante, ya que neutralizan los radicales libres (Martínez-Navarrete *et al.*, 2008).

Los antioxidantes son compuestos capaces de inhibir o retardar la oxidación de otras moléculas inhabilitando la iniciación y/o propagación de las reacciones en cadena de los radicales libres (Rivas *et al.*, 2016). Un radical libre es toda estructura química que contiene en su estructura uno o más electrones no apareados, por tanto, es muy reactivo. Estos radicales son liberados durante el metabolismo humano, pero también por contaminantes ambientales (Llancari y Matos, 2011). Las propiedades antioxidantes, además de estudiarlas por sus interacciones químico-biológicas, se investigan por la función que desempeñan en la prevención del deterioro oxidativo que afecta a los alimentos (Coronado *et al.*, 2015). Los antioxidantes son capaces de atrapar los radicales libres responsables del estrés oxidativo, así como prevenir enfermedades tales como las cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas. Además, poseen actividad antiinflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (Ross y Kasum, 2002). La capacidad antioxidante de una mezcla no sólo depende del conjunto de capacidades antioxidantes de los componentes, sino que también hay que tener en cuenta el ambiente donde se encuentra dicho compuesto, pudiendo mostrar efectos sinérgicos o inhibitorios entre ellos (Kuskoski *et al.*, 2005).

Las funciones biológicas de la vitamina C dependen de su aptitud para actuar como donante de electrones. Así, actúa como cofactor para algunas enzimas con funciones muy importantes en el organismo. Se trata de un antioxidante soluble en agua muy efectivo y se cree que está implicado en la regeneración de la vitamina E *in vivo* (Pearson *et al.*, 2017; Bruno *et al.*, 2006). Existen numerosos efectos beneficiosos

aportados por la vitamina C, entre ellos se encuentran una mejora de la función vascular endotelial, reducción de la inflamación sistémica, incrementa la biodisponibilidad de hierro, posee un efecto inhibidor de la oxidación de lípidos y contribuye a disminuir la probabilidad de padecer enfermedades cardiovasculares y algunos tipos de cáncer (Camacho *et al.*, 2018; Delgado, 2010). Una insuficiencia de vitamina C puede dar lugar al escorbuto, por ello, ya que el organismo no es capaz de sintetizar dicha vitamina es importante la ingesta de fruta y verdura, mediante las cuales es posible obtenerla (Camacho *et al.*, 2018). Por otra parte, hay que tener en cuenta los efectos secundarios que pueden derivar de una ingesta excesiva de vitamina C, como lo es la presencia de cálculos renales en riñones o en vías urinarias (Delgado, 2010).

Los compuestos fenólicos son el grupo más extenso de sustancias no energéticas que existen en los alimentos de origen vegetal. Una dieta abundante en polifenoles vegetales puede contribuir a mejorar la salud y disminuir la incidencia de padecer enfermedades cardiovasculares. Sus efectos beneficiosos se deben mayoritariamente a sus propiedades antioxidantes, que parecen estar relacionadas con su capacidad quelante, inhibición de la lipoxigenasa y captura de radicales libres. Además de su capacidad antioxidante, los compuestos fenólicos, poseen diversos efectos biológicos como antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios, antitrombóticos y acciones vasodilatadoras (Quiñones *et al.*, 2012).

Por su parte, la función primordial de los pigmentos carotenoides en la planta es la captación de la energía luminosa con el fin de transferirla a las clorofilas durante la fotosíntesis. Los carotenoides son capaces de otorgar colores amarillos, anaranjados y rojizos a frutas y verduras, lo que es posible por la presencia de un cromóforo en su misma molécula. En las frutas, la cantidad de carotenoides aumenta con la maduración (Meléndez *et al.*, 2004). Además de aportar coloración, los carotenoides tienen una gran importancia a nivel nutricional. Algunos poseen actividad provitamínica A (Simpson, 1983). La vitamina A es fundamental para la visión nocturna e indispensable para el mantenimiento de una piel y tejidos superficiales sanos (Meléndez *et al.*, 2004). Cabe destacar el efecto positivo de los carotenoides en la respuesta inmune, hecho que se lleva postulando hace tiempo (Olson, 1999). Pero también diversos estudios demuestran la actividad antioxidante de los carotenoides (Instituto de Medicina, 2000). Estudios epidemiológicos muestran que la ingesta de alimentos ricos en carotenoides está estrechamente ligado a un menor riesgo de sufrir enfermedades crónicas, aunque no existen evidencias suficientes (Meléndez *et al.*, 2004).

Con la intención de promover el consumo de fruta entre la población, cada vez se está trabajando más en el diseño y desarrollo de nuevos productos de fruta seguros y saludables. En este sentido, una opción podría ser ofertar un snack a partir de la liofilización del puré de naranja (Silva, 2015).

1.2. Liofilización

Entre los métodos de conservación más comunes se encuentran las fermentaciones, tratamientos térmicos, irradiación, depresión de la actividad del agua, entre otros. Entre las mejores técnicas de deshidratación, la liofilización es conocida por la obtención de productos deshidratados con las cualidades más altas (Hammami *et al.*, 1999). La liofilización es un proceso de secado que se basa en la sublimación del agua sólida contenida en el alimento (Berk, 2013). En dicho proceso, primero se congela el alimento y después es sometido a alto vacío, sin necesidad de aplicar temperaturas elevadas. De esta manera el agua del alimento en estado sólido se sublima, es decir pasa de estado sólido a gas sin pasar por líquido. El vapor de agua liberado de la sublimación queda atrapado, generalmente, en la superficie de un condensador (Berk, 2013).

La liofilización no solo se emplea en la industria alimentaria, sino que su uso destaca en la industria farmacéutica con el fin de conservar compuestos termolábiles de la sangre, cepas de microorganismos, entre otras aplicaciones. Además, también se utiliza en la industria química, para la conservación de libros y documentos, así como en el secado de flores y madera (Cabrera, 2016). La primera aplicación surgió en 1890 cuando R. Altman empleó un sistema similar a la liofilización el cual se basaba en la conservación de tejidos animales; en 1914 L.A. Roger presentó la utilidad de la liofilización para obtener una considerable cantidad de ácido láctico. Pero fue en 1958 cuando fue aplicado a la industria alimentaria empleándose para algunos alimentos como el café, la leche, los huevos, las sopas, los zumos de frutas y la levadura (Ramírez, 2006). Mediante la liofilización es posible obtener alimentos de gran calidad en comparación con otros métodos de secado. La liofilización se usa frecuentemente en productos sensibles al oxígeno, a la humedad y a las altas temperaturas (Gómez *et al.*, 2003). En la industria alimentaria se aplica a productos de alto valor añadido, como lo son productos para montañistas, astronautas, bebés, militares, pero también a aquellos alimentos en los que resulta especialmente conservar la calidad organoléptica, como el café, el té, frutas, entre muchos otros (Bermejo, 1999; Ramírez, 2006).

En cuanto a las ventajas hay que destacar que debido a que la liofilización se lleva a cabo a bajas temperaturas y a baja presión, es posible la conservación del sabor y color del alimento, además de minimizar el daño térmico que causan las altas temperaturas en los nutrientes sensibles al calor y las pérdidas de componentes volátiles (Barbosa-Cánovas *et al.*, 2005, Berk, 2013). Además, por la alta reducción en la actividad del agua, permite obtener productos estables microbiológicamente. Sin embargo, la fruta deshidratada puede presentar problemas relacionados con la transición vítrea de su matriz amorfa, en relación con la velocidad de las reacciones de deterioro y el desarrollo de fenómenos de colapso. El alto contenido en azúcares y ácidos orgánicos de las frutas hace que la temperatura de transición vítrea (Tg) cuando se deshidratan sea muy baja, de manera que frecuentemente se encuentran en estado gomoso a temperatura ambiente (Telis y Martínez-Navarrete, 2012). El paso del estado vítreo, muy estable, al gomoso, inestable, tiene lugar cuando se sobrepasa la Tg del producto, lo que puede ocurrir debido a un incremento en la humedad o en la temperatura (Silva, 2015). Dado que la Tg aumenta con el peso molecular promedio de los solutos, la adición de algunos biopolímeros como gomas, maltodextrinas o almidones se ha venido utilizando para la estabilización de productos deshidratados (Bhandari *et al.*, 1993; Roosand Karel, 1991a; Truong *et al.*, 2005; Bormann *et al.*, 2013; Telis y Navarrete, 2009; Barbosa-Canovas *et al.*, 2005). En concreto, en este trabajo se han utilizado diferentes biopolímeros como la goma Arábica, fibra de bambú, maltodextrina, almidón de maíz nativo, fibra de guisante y almidón sustituido con grupos octenilsuccínico.

1.3. Biopolímeros

La goma arábica es un complejo heteropolisacárido con una estructura ramificada, con una cadena principal formada por unidades de D-galactopiranosas unidas por enlaces glicosídicos β -D. La goma arábica es un material formador de película muy eficiente para microencapsular (Lopera *et al.*, 2009). Ha sido ampliamente utilizada como material de microencapsulación por secado por atomización, debido especialmente a su buena capacidad de emulsificación y a su baja viscosidad en medio acuoso. Además, proporciona una alta retención de sustancias volátiles y protege frente a las reacciones de oxidación (Righetto y Netto, 2005). La desventaja que presenta es su alto coste (Lopera *et al.*, 2009).

La maltodextrina está formada por unidades de β -D-glucosa unidas principalmente por enlaces glicosídicos y frecuentemente se clasifican de acuerdo con su equivalencia en dextrosa. Las maltodextrinas se utilizan principalmente en productos difíciles de secar, como lo es el zumo de frutas, y con el fin de mejorar la estabilidad del producto (Righetto y Netto, 2005). Éstas se caracterizan por ser de baja viscosidad cuando hay una alta proporción de sólidos, son incoloras e inodoras, permiten formar polvos sin ocultar el sabor inicial (Parra, 2010), tienen buena solubilidad y son competentes para formar películas, además de ser económicamente factibles (Lopera *et al.*, 2009).

El almidón de maíz nativo, como todos los almidones nativos, se caracteriza por poseer comportamientos diferentes según sus propiedades funcionales. Los almidones son muy empleados en la industria ya que contribuyen a estabilizar a los alimentos, ayudan a la emulsificación y mejoran la textura (Araujo *et al.*, 2004). Además, cuando se mezclan con hidrocoloides, modifican y controlan la textura y mejoran la retención de humedad en los productos alimenticios (Appelqvist y Debet, 1997).

Los almidones modificados químicamente con grupos octenilsuccínico (OSA) presentan propiedades de superficie activa, lo cual otorga capacidad de estabilización en el alimento. A pesar de esta modificación con OSA, el almidón preserva su biodegradabilidad (Jarnstrom *et al.*, 1995), lo cual hace su uso conveniente para muchos alimentos, cosméticos y aplicaciones farmacéuticas. En comparación con los almidones nativos, el almidón OSA es soluble en agua fría y mantiene la viscosidad relativamente baja incluso a altas concentraciones (Ljubica *et al.*, 2012).

Hay un interés continuo por parte de la industria alimentaria en aumentar el contenido de fibras en los alimentos, ya que numerosos estudios han demostrado los efectos beneficiosos del consumo de fibra en la protección contra enfermedades relacionadas con el corazón y cáncer, regulación de lípidos en grasa, regulación de la absorción de glucosa y secreción de insulina y prevención de enfermedades intestinales (Mckee y Latner, 2000). Muchas de ellas son neutras en sabor, libres de olores y no presentan calorías ni grasas. En este estudio se ha trabajado con dos fibras procedentes de guisante y de bambú. La fibra de guisante se ha venido utilizando en la industria alimentaria para enriquecer panes y cereales de desayuno (Vetter, 1984). Asimismo, desde que la fibra de bambú es una alternativa más económica en comparación a otras fibras, muchas compañías la utilizan en sus productos. Es un ingrediente común en cereales para desayuno, pasta, quesos, salsas, mostazas, kétchup, bebidas, zumos de frutas, snacks, postres congelados y pastelería. Estas fibras presentan capacidad de absorción de agua lo cual mejora la textura en los productos, y son muy útiles en productos deshidratados donde son necesarias propiedades contra el apelmazamiento (Chongtham *et al.*, 2011; Mckee y Latner, 2000)

Asimismo, los biopolímeros pueden actuar como agentes de encapsulación, ayudando a prevenir la degradación de algunos compuestos bioactivos (Rascon *et al.*; 2011). La microencapsulación consiste en introducir, en la matriz de biopolímeros, sustancias biológicamente activas con la finalidad de impedir la pérdida de las mismas o su oxidación por la luz o por la presencia de oxígeno (Castañeta *et al.*; 2011). Según

diversas investigaciones, los compuestos encapsulados mantienen sus actividades funcionales durante el procesado y almacenamiento de los alimentos (Lupo *et al.*, 2012). Así mismo, uno de los objetivos de la encapsulación es la de proteger a los compuestos bioactivos de las drásticas condiciones del ambiente del tracto gastrointestinal (Hu *et al.*, 2017). No obstante, los agentes encapsulantes deben permitir una liberación controlada de los compuestos, de manera que para que éstos se encuentren disponibles es necesario que primero se encuentren bioaccesibles. Sin embargo, la naturaleza y funcionalidad de los diferentes biopolímeros pueden afectar, en mayor o menor medida, a que dichos compuestos sean liberados para ser absorbidos por el organismo.

1.4. Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad se puede definir como la fracción de un nutriente disponible para su absorción, es decir, la cantidad de un nutriente que es liberado de la matriz del alimento durante la digestión y que es accesible para ser absorbido en la mucosa (Hedrén *et al.*, 2002; Minekus, 2014). La bioaccesibilidad puede ser medida mediante la simulación *in vitro* de las etapas de digestión en el tracto gastrointestinal, mediante una serie de tratamientos utilizando enzimas características de cada etapa del proceso de digestión, adecuando las condiciones de temperatura y pH (Aravena, 2014; Quesada, 2018).

En el proceso de digestión humana los alimentos deglutidos se transforman en sustancias de menor tamaño, químicamente más sencillas, de tal manera que el cuerpo las pueda asimilar y emplearlas como fuente de energía y como sustrato para las células. El tracto digestivo es el conjunto de órganos que van de la boca al ano (Figura 1, Rivas, 2014).

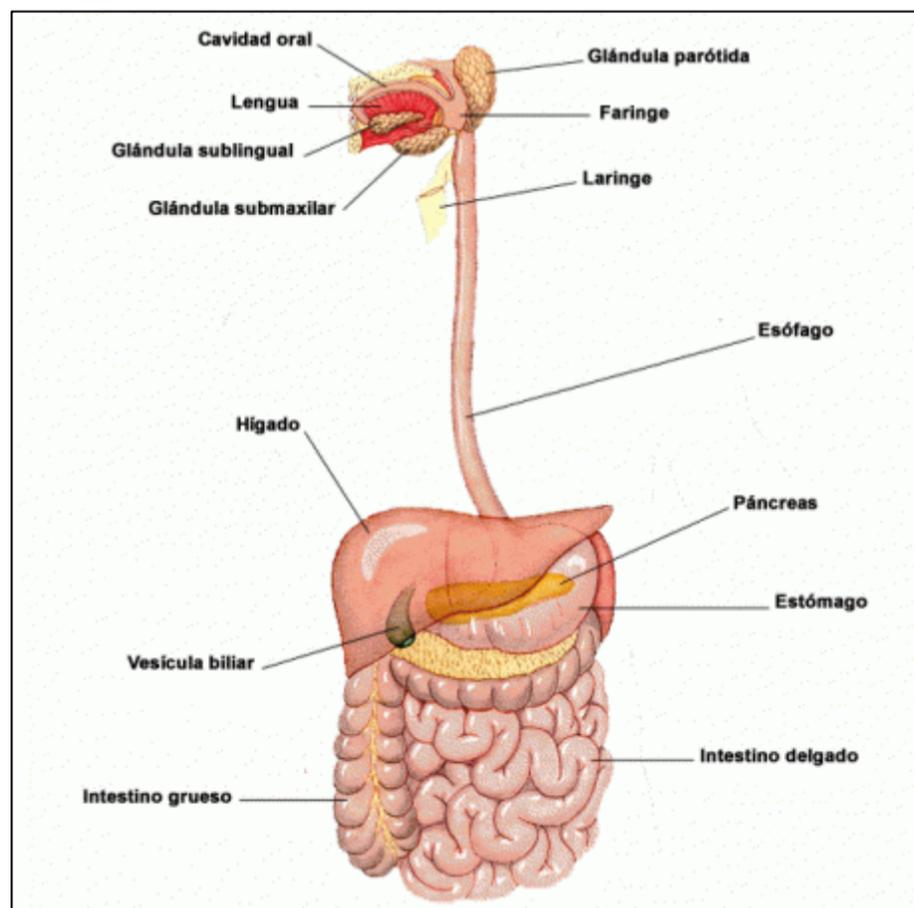


Figura 1: Aparato digestivo humano (Rivas, 2014).

La primera etapa del proceso de la digestión tiene lugar en la boca, en la cual, mediante los dientes y el proceso de mezcla con la saliva, se produce una ruptura mecánica y química del alimento. Como consecuencia se comienzan a liberar los compuestos responsables del sabor, se hidroliza parte del almidón y algunas proteínas precipitan. En la boca la masticación cumple una función muy importante ya que se produce la trituración de los alimentos evitando la posible lesión de la mucosa gastrointestinal y se hace más fácil el tránsito a través de todo el tubo digestivo. Otras funciones de la masticación son la ruptura de las membranas de celulosa indigeribles presentes en los alimentos crudos, el incremento de la superficie de las partículas alimentarias que quedan expuestas a las secreciones del proceso digestivo y la mezcla de los alimentos con la saliva.

Seguidamente el bolo alimenticio circula a través del esófago hasta llegar al estómago. En él, el bolo se mezcla con los jugos gástricos, compuestos principalmente por ácido clorhídrico y pepsina. En esta etapa es donde las proteínas son hidrolizadas en su mayoría. El estómago cumple diversas funciones, como actuar como reservorio para los alimentos ingeridos, combinar los alimentos con los jugos gástricos y depositar paulatinamente su contenido en el intestino delgado. En él se sitúan las glándulas que sintetizan ácido clorhídrico, pepsina, gastrina

y otras enzimas que regulan el pH del tubo digestivo. El pH en el interior del estómago tiene un valor cercano a 2, pero durante el proceso de digestión el pH aumenta debido a la presencia del alimento. En este momento se produce la secreción de pepsina, la cual da como resultado un aumento de la acidez. Con la finalidad de mezclar los alimentos, en el estómago se producen una serie de contracciones rítmicas. Cuando el bolo alimenticio se dispone a pasar al intestino delgado, las contracciones son más intensas.

En el intestino delgado es donde se produce la absorción de los diferentes compuestos liberados durante el proceso de digestión. En él se produce la segregación de un moco alcalino el cual protege las paredes del intestino. En el duodeno, el alimento se combina con los jugos pancreáticos en los que están presentes las enzimas que hacen posible la digestión de lípidos, almidón y proteínas, para posteriormente absorberse en sus subunidades más simples. En el duodeno son secretados los iones bicarbonato y las sales biliares, los cuales permiten el incremento del pH y la emulsificación de las grasas, respectivamente. El duodeno es de vital importancia ya que en él se produce el contacto entre el quimo y las secreciones biliares y pancreáticas. Además de los jugos pancreáticos, en el duodeno también se vierte la bilis producida por la glándula biliar, presente en el hígado. Dicha bilis contiene ácidos biliares, bicarbonatos, colesterol, entre otros. Cabe destacar el papel de la bilis en la fragmentación de las grasas.

Al intestino grueso llegan las sustancias que el intestino delgado no ha podido digerir. Debido a la presencia de las bacterias conformantes de la flora intestinal, es posible digerir dichas sustancias mediante la fermentación de éstas por parte de dichas bacterias. Las principales funciones del intestino grueso son la absorción de agua y electrolitos del quimo, y el almacenamiento de las heces hasta el momento de expulsarlas (Aravena, 2014; Rivas, 2014).

2. OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es evaluar el impacto que presentan diferentes biopolímeros, tales como la goma arábica, fibra de bambú, almidón de maíz nativo, almidón sustituido con grupos octenilsuccínico, fibra de guisante y maltodextrina en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos de un snack de naranja obtenido por liofilización, mediante la simulación de un proceso de digestión *in vitro*.

Para conseguir dicho objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de los compuestos bioactivos (fenoles totales, vitamina C y carotenoides totales) y de la actividad antioxidante, tanto del puré de naranja, como de las diferentes formulaciones con biopolímeros obtenidas a partir del mismo, antes y después de la liofilización.
- Estudio del efecto de las diferentes etapas de la digestión *in vitro* en cada formulación, para cada compuesto bioactivo y para la actividad antioxidante de los productos antes y después de liofilizar.
- Cálculo de la bioaccesibilidad de cada compuesto en las diferentes formulaciones, para los productos antes y después de liofilizar.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materias primas

La materia prima utilizada en este trabajo fue la naranja (*Citrus sinensis* 'Lane Late') adquirida en un supermercado de la ciudad de Valencia. La elección de las naranjas se realizó mediante inspección visual en base a su forma, tamaño, color y buena integridad física. Los biopolímeros utilizados fueron goma Arábica (GA, Scharlab, Sentmenat, España), fibra de guisante (FG, Roquette, Lestrem, Francia), fibra de bambú (FB, VITACELR, Rosenberg, Alemania), almidón sustituido con grupos octenilsuccínico (OSA, Roquette, Lestrem, Francia), maltodextrina (MD, Roquette, Lestrem, Francia) y almidón de maíz nativo (AMN, Roquette, Lestrem, Francia).

3.2 Metodología

3.2.1 Preparación de las muestras y condiciones de liofilización

En primer lugar, la naranja, fue pelada, cortada y se trituró con la ayuda de un robot de cocina (Thermomix TM 21, Vorwerk, España) obteniendo finalmente el puré de naranja. Posteriormente se añadieron los diferentes biopolímeros y se homogeneizó la mezcla en el mismo robot de cocina para obtener 4 formulaciones con las concentraciones de cada uno de ellos mostradas en la Tabla 2.

Tabla 2. Cantidad de los diferentes biopolímeros añadidos en cada formulación (g/100 g de puré de naranja) y código asignado a las formulaciones.

Biopolímero	FORMULACIÓN			
	GA-FB	OSA-FG	MD-AMN	MD-FG
Goma Arábica	5			
Fibra de bambú	1			
Almidón sustituido con grupos octenilsuccínico		5		
Fibra de guisante		1		
Maltodextrina			5	5
Almidón de maíz nativo			1	1

El puré de naranja y las 4 muestras formuladas se colocaron en bandejas de aluminio de 0,5 cm de espesor y se congelaron (Liebherr LGT 2325, Alemania) a -45 °C durante 7 días. La liofilización (Liofilizador Telstar Lioalfa-6, España) se realizó mediante unas condiciones de liofilización de 0,084 mBar, - 48 °C de temperatura en el condensador y 40°C de temperatura de bandeja durante 20 horas. Tanto el puré de naranja como todas las muestras formuladas, fueron analizados en cuanto a sus compuestos bioactivos y actividad antioxidante antes y después de liofilizar, así como después de las diferentes etapas de la digestión *in vitro*. Las muestras se conservaron en refrigeración 24 horas hasta realizar la posterior digestión.

3.2.2. Digestión *in vitro*

El proceso de digestión *in vitro* constó de tres partes claramente diferenciadas: fase oral, fase gástrica y fase intestinal. Se siguió la metodología propuesta por Miller et al., (1981) con algunas adaptaciones, realizando 3 repeticiones de cada etapa de la digestión por muestra.

En primer lugar, para la **fase oral** de la digestión es importante tratar de simular los fluidos que se encuentran en la boca. La saliva está formada mayoritariamente por amilasa, por ello a 120 mL de puré de naranja sin y con biopolímeros añadidos y a 12 g de snack liofilizado con 120 mL de agua destilada se le añadió 5 mL de una disolución de α -amilasa/CaCl₂ (130 mg/100 mL CaCl₂ 1 mM, pH 7) (Sigma-Aldrich, Alemania) (Huang *et al.*, 2014). Las muestras fueron incubadas a 37°C en vasos con camisa termostática (Vidrafoc, Valencia, España) durante 10 minutos en constante agitación (agitador magnético Ika Labortechnik). Una vez finalizada la fase oral, se retiraron 100 mL para la siguiente fase gástrica y los 20 mL restantes se conservaron en vasos estériles y se congelaron a -45°C para los posteriores análisis de los diferentes compuestos bioactivos y actividad antioxidante. Esta muestra analizada tras la fase oral de la digestión se ha codificado como DO.

Para la **fase gástrica**, el pH de la muestra proveniente de la fase oral se ajustó a 2 con HCl 2M (Sigma Aldrich, Alemania). Seguidamente se adicionaron 0,1 g de pepsina de origen porcino (Sigma-Aldrich, Alemania) y la mezcla se mantuvo durante 2 horas a 37 °C y en constante agitación (agitador magnético Ika Labortechnik). Finalizadas las 2 horas, 20 mL de la muestra se destinó para la siguiente fase intestinal y la cantidad restante se conservó en vasos esterilizados y se congeló a -45°C para su posterior análisis. En este caso, la muestra analizada tras la fase gástrica de la digestión se ha codificado como DG.

Para simular la **fase intestinal** se empleó una membrana de diálisis con un tamaño de poro de 14000 daltons (Sigma-Aldrich, Alemania). Dicha membrana se rellenó con 25 mL de NaHCO_3 0,5 N. Las muestras procedentes del digesto gástrico se dializaron manteniéndolas en agitación (agitador orbital Ovan, España) y a 37 °C (estufa J.P. Selecta, S.A., España). Una vez que la muestra alcanzó un pH de 5 (aproximadamente tras 15 minutos), se adicionó 5 mL de una mezcla de pancreatina (4 g/L, Sigma-Aldrich, Alemania)-extracto de bilis (25 g/L, Sigma-Aldrich, Alemania) en NaHCO_3 0,5 N y se continuó con la incubación durante 2 horas hasta alcanzar pH 7. Finalizada la fase intestinal, se recogió la solución de la parte externa de la membrana la cual representa el digesto intestinal que pasa al intestino grueso, y en otro vaso se depositó el contenido del interior de la membrana, que representa el digesto intestinal que sería absorbido por el organismo. Ambos digestos se conservaron en congelación a -45°C para ser posteriormente analizados. Las muestras analizadas tras la fase intestinal de la digestión, en el exterior y en el interior de la membrana de diálisis, se han codificado como DIE y DII, respectivamente.

3.2.3 Determinaciones analíticas

Tanto el puré de naranja y las 6 formulaciones preparadas, como los correspondientes productos liofilizados, como los digestos orales (DO), gástricos (DG) e intestinales internos (DII) y externos (DIE), se analizaron en cuanto al contenido de fenoles totales (FT), vitamina C (VC), carotenoides totales (CT) y actividad antioxidante (AAO). El procedimiento analítico fue el mismo en todos los casos excepto para las muestras digeridas que fueron previamente centrifugadas a 10.000 rpm, 24 °C, durante 10 min (Selecta Medifriger-BL, España) y el sobrenadante se filtró mediante un filtro de nylon de 45 µm.

3.2.3.1. Humedad

Se determinó la humedad del puré de naranja antes y después de formular, mediante el método gravimétrico de secado en estufa para alimentos ricos en azúcares (AOAC, 1990). En el caso de las diferentes muestras liofilizadas se empleó el método de valoración volumétrica de Karl Fischer (Mettler Toledo, España).

3.2.3.2. Fenoles totales

La extracción de los compuestos fenólicos se realizó mezclando entre 0,6-3 g de muestra, en función de si se trataba de muestra liofilizada ó puré, respectivamente, y entre 1-4 g dependiendo del digesto, con 9 mL de una disolución de metanol: agua (70:30, v/v). La mezcla se mantuvo durante 30 minutos en agitación magnética y en oscuridad, a 23 °C. A continuación, se centrifugó a 4 °C, 1000 rpm, durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante.

Los FT se cuantificaron siguiendo el método de Folin-Ciocalteu según Benzie y Strain (1999). El resultado se expresó como mg de ácido gálico/100 g de solutos de naranja (Agudelo *et al.*, 2016).

3.2.3.3. Carotenoides totales

La determinación de CT se realizó por espectrofotometría mediante el método de AOAC (1996). En primer lugar, se realizó una extracción en las mismas condiciones y proporciones que para los compuestos fenólicos pero empleando como disolvente una mezcla de hexano: acetona: etanol (50:25:25, v/v), (VRW, España) (Barba *et al.*, 2006). Se midió la absorbancia a 446 nm (Espectrofotómetro UV-visible Thermo Electron Corporation, Estados Unidos) y el resultado se expresó como mg de β caroteno/ 100 g de solutos de naranja.

3.2.3.4 Vitamina C

La determinación de VC consistió en la reducción del ácido dehidroascórbico (DHAA) a ácido ascórbico (AA) empleando el reactivo DTT (DL-ditiotreitol) (Sigma-Aldrich, Alemania) según Sánchez-Mata *et al.* (2000) y Sánchez-Moreno *et al.* (2003), y posterior determinación por HPLC según Xue *et al.* (2008). El HPLC empleado (Jasco, Italia) consta de una bomba ternaria (Jasco PU-1580 HPLC pumb), un generador de gradiente (LG-1580-02 Ternary Gradiente Unit) y un detector UV-visible (MD-1510) con un intervalo de medida de longitud de onda entre 190 y 650 nm. El equipo contiene un desgasificador incorporado y un inyector automático. Se utilizó una columna Zorbax SSBC18 de 5 µm, 4,6 x 25 mm (España). La vitamina C fue identificada por su tiempo de retención y cuantificada por integración de las áreas de los picos obtenidos de los cromatogramas usando ácido ascórbico como patrón (Panreac, España). Los resultados se expresaron como mg de AA/ 100 g de solutos de naranja.

3.2.3.5 Actividad antioxidante

A partir de los extractos obtenidos para la determinación de los compuestos fenólicos, la AAO de las muestras fue determinada por dos métodos, el método FRAP y el DPPH. El método FRAP se basa en determinar la capacidad de reducción del ion férrico (Fe^{+3}), presente en un complejo con 2, 4, 6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), a su forma ferrosa (Fe^{+2}) (Carvajal de Pabón *et al.*; 2011). El método DPPH se basa en la capacidad que presentan las sustancias antioxidantes para captar radicales libres (Sanchez-Moreno *et al.*, 2003).

i. Método FRAP

El método FRAP se realizó siguiendo la metodología propuesta por Bezie y Strain (1996); Pulido *et al.* (2000) y Thaipong *et al.* (2006). Los resultados finales fueron expresados como mmol de trolox equivalente (TE)/100 g solutos de naranja, usando una curva de calibración de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) de 0-250 mg TE /1000 g.

ii. Método DPPH

Para la realización del método DPPH se siguió la metodología propuesta por Brand-Williams *et al.* (1995); Pupoonen-Pimia *et al.* (2003) y Sanchez-Moreno *et al.* (2003). Los resultados finales fueron expresados como mmol de trolox equivalente (TE)/100 g de solutos de naranja, para ello se calculó previamente el porcentaje de DPPH según la ecuación 1 y se empleó una curva de calibración de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) de 0-250 mg TE/ 1000 g.

$$\% \text{ DPPH} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{control}}} * 100 \quad (\text{Ec.1})$$

Donde: A_{control} es la absorbancia a tiempo 0 del DPPH con disolvente; A_{muestra} es la absorbancia del DPPH con la muestra cuando la reacción se ha estabilizado, a los 15 minutos.

3.3 Cálculo de la bioaccesibilidad

Para el cálculo de la bioaccesibilidad de los diferentes compuestos bioactivos de las diferentes muestras, se empleó la ecuación 2 (Briones-Labarsca *et al.*, 2011; Rodriguez-Roque *et al.*, 2013; Stinco *et al.*, 2013).

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{\text{Concentración de bioactivos en DII}}{\text{Concentración de bioactivos en ND}} * 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde DII es el digesto recogido tras la etapa de la digestión intestinal interna y ND es la muestra aún no iniciada la digestión.

3.4 Análisis estadístico

Para conocer las diferencias significativas que existen entre las diferentes muestras se realizaron análisis de la varianza de carácter simple (ANOVA) para un nivel de confianza de 95 % ($p < 0,05$), empleando el programa Statgraphics Centurion XVII.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los distintos compuestos bioactivos analizados y de la actividad antioxidante, tanto en el puré de naranja, como en las diferentes formulaciones obtenidas a partir del mismo y, en todos los casos, en los productos antes y después de la liofilización. En el apartado 4.1. se detalla, para cada analito y tipo de producto, el efecto de las diferentes etapas de la digestión *in vitro*. En el apartado 4.2 los resultados se refieren a la bioaccesibilidad de cada compuesto, para comparar ambos productos y las diferentes formulaciones.

Además, aunque no era el objetivo del trabajo, con los datos obtenidos se evaluó el efecto del proceso de liofilización en los distintos compuestos bioactivos estudiados y en las diferentes formulaciones. Para ello, se calculó el % de preservación de los compuestos bioactivos en el producto liofilizado (Tabla 3). En general, se observó un mayor impacto sobre el contenido en carotenoides y en la actividad antioxidante (DPPH) por efecto de la liofilización. De hecho, Vanamala *et al.* (2005) reportaron una mayor reducción significativa (44%) en el contenido de carotenoides en pomelo, en relación con otros compuestos bioactivos estudiados, tras su liofilización. Las pérdidas observadas podrían asociarse a diferentes reacciones de degradación/oxidación ocurridas durante el proceso. Los % mayores a 100 pueden justificarse asumiendo una mayor facilidad de extracción de los compuestos en los productos liofilizados, asociados a su mayor porosidad (Michalczyk *et al.*, 2009). En general los resultados pusieron de manifiesto la alta estabilidad de la vitamina C y de los fenoles frente a la liofilización y la alta inestabilidad de los compuestos carotenoides. En cuanto a los biopolímeros utilizados, se observó un papel protector sobre los fenoles por parte de OSA+FG y MD, especialmente cuando se combina con FG. Asimismo, la formulación OSA+FG fue la que conservó en mayor medida el contenido en carotenoides. Por su parte, la vitamina C fue mejor preservada en las formulaciones que contenían maltodextrina o GA+FB. Como consecuencia de todos estos cambios, esta última formulación fue la que aseguró menores pérdidas de la actividad antioxidante.

Tabla 3: Porcentaje de preservación⁽¹⁾ de los diferentes compuestos y actividad antioxidante (métodos DPPH y FRAP), en el puré de naranja y en las distintas formulaciones (Tabla 2) por efecto del proceso de liofilización.

	Fenoles (%)	Carotenoides (%)	Vitamina C (%)	DPPH (%)	FRAP (%)
Naranja	89 ± 2 ^c	67 ± 5 ^b	97 ± 6 ^b	67,7 ± 0,3 ^b	99 ± 3 ^a
GA+FB	80 ± 6 ^d	66 ± 6 ^b	110 ± 6 ^a	77,7 ± 1,3 ^a	97 ± 11 ^{ab}
MD+FG	111 ± 3 ^a	43 ± 4 ^c	112,5 ± 0,8 ^a	66 ± 3 ^{bc}	89 ± 12 ^{ab}
MD+AMN	102 ± 3 ^b	42 ± 4 ^c	109,2 ± 1,4 ^a	62,9 ± 1,7 ^c	90 ± 5 ^{ab}
OSA+FG	106 ± 4 ^{ab}	97 ± 12 ^a	59 ± 2 ^c	53 ± 3 ^d	84 ± 5 ^b

⁽¹⁾100*(m^l/m^F) siendo m^F y m^l la cantidad del compuesto analizado en 100 g de cada producto formulado y liofilizado (referido a los solutos propios de la naranja), respectivamente.

4.1 Efecto de la digestión en los compuestos bioactivos

En las figuras 2 y 3 se presentan los valores obtenidos del contenido en fenoles totales y vitamina C de los productos formulados, tanto antes de liofilizar como en los productos liofilizados, después de las distintas etapas de la digestión. La variabilidad observada en las distintas muestras formuladas aún no digeridas (ND) es consecuencia de los distintos lotes de fruta utilizados en el estudio. Para todas las formulaciones y tanto en los productos antes como después de liofilizar, se observó que, en general, las etapas DO y DG afectaron poco al contenido en fenoles totales. Así, aunque en muchos casos no hubo cambios significativos, en algunos casos estos compuestos aumentaron y en otros disminuyeron ligeramente. Los aumentos pueden ser debidos al pH del estómago y al efecto de las enzimas, que rompen las estructuras y liberan compuestos fenólicos. Además, según su naturaleza, las condiciones gástricas pueden favorecer la oxidación química o enzimática o protegerlos de la misma. En este sentido, se ha descrito como la hesperidina, quercetina o catequina disminuyen durante la digestión gástrica mientras que naringenina y rutina aumentan (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013a). En este caso, que todas muestras contienen naranja, el diferente efecto observado podría deberse a pequeñas diferencias en la capacidad protectora de los biopolímeros utilizados en la formulación. Asimismo, se observó que el contenido en fenoles en la fase DIE fue mayor que en la fase DII, excepto para las muestras de puré de naranja formuladas con GA+FB (Figura 2). Por una parte, el pH alcalino de la fase intestinal provoca que los compuestos fenólicos sufran distintas reacciones químicas, principalmente oxidación y polimerización, favoreciendo la formación de otros compuestos fenólicos derivados (como las chalconas) que no pueden absorberse debido a su baja solubilidad y a su alto peso molecular (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013a). Por otra parte, se ha descrito como las interacciones entre los compuestos fenólicos y otros constituyentes de la naranja (minerales, fibra) pueden favorecer la formación de complejos incapaces de atravesar la membrana de diálisis (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013b). En este sentido, los resultados obtenidos en este estudio parecen indicar un mayor efecto protector de la combinación GA+FB frente a las interacciones de los compuestos fenólicos que facilitarían su absorción intestinal. No obstante, conviene mencionar en este punto que los fenoles que quedan en la fracción duodenal, los no absorbibles, no significa que no tengan un efecto protector sobre la salud. En este caso,

pasarían al intestino grueso donde serían transformados por la microbiota y podrían ser absorbidos a este nivel para ejercer su actividad biológica (Gil-Izquierdo *et al.*, 2001)

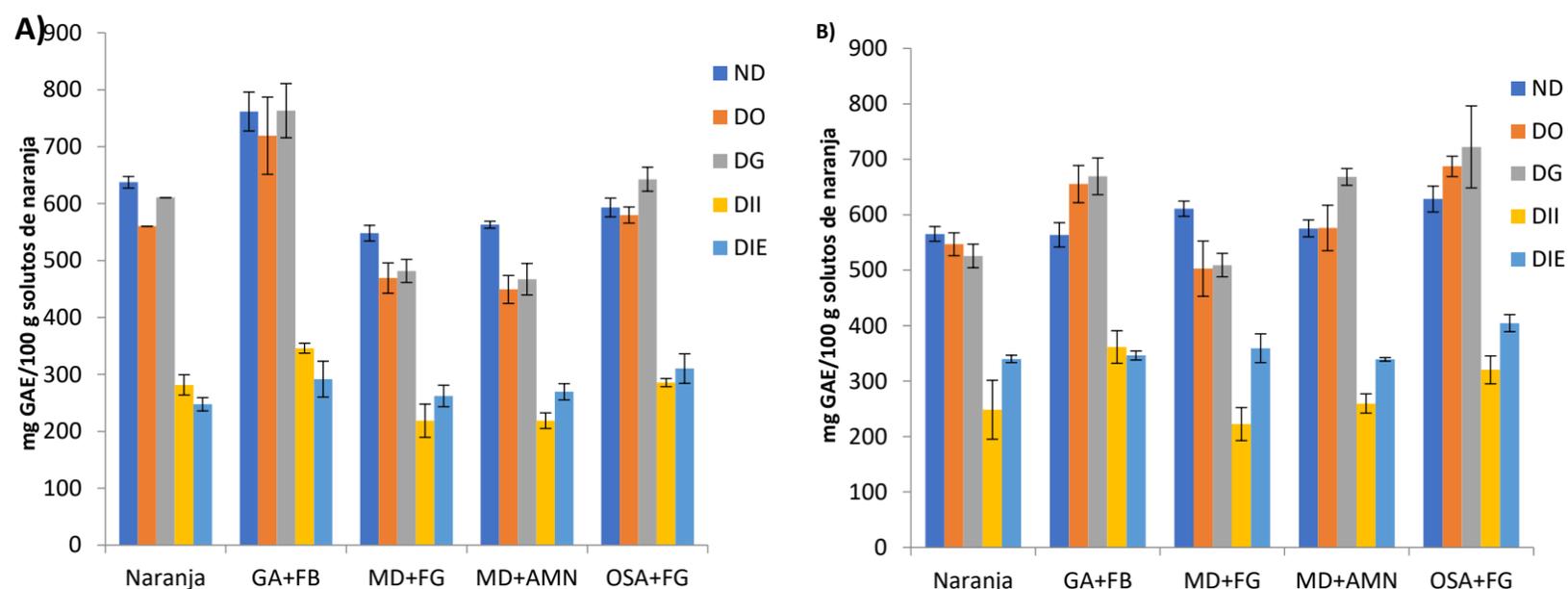


Figura 2: Contenido en fenoles totales en las diferentes etapas de digestión *in vitro* de las distintas formulaciones antes de liofilizar (A) y de los productos liofilizados (B). La nomenclatura asignada a las muestras (eje X) se corresponde con los diferentes biopolímeros utilizados en cada formulación (ver Tabla 2). Leyenda: muestra no digerida (ND) y después de la digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal interna (DII) y digestión intestinal externa (DIE).

En la figura 3 se observa como el contenido en vitamina C presentó la misma tendencia que el contenido en fenoles. Así, VC no se vio significativamente afectada por las digestiones oral y gástrica. Otros autores, también observaron que las fases oral y gástrica de la digestión tenían poco efecto en la estabilidad de la vitamina C (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013; Pérez-Vicente *et al.*, 2002). Las condiciones ácidas de la fase gástrica protegen a la vitamina de la oxidación química y enzimática: a bajos pH la molécula de AA se encuentra protonada, lo cual la protege del ataque del oxígeno. Asimismo, se observó que el contenido en VC de los productos antes de liofilizar, fue mayor en la fase DIE que en la fase DII para las muestras que contenían maltodextrina, y el efecto inverso para las muestras GA+FB y OSA+FG. Sin embargo, estas diferencias en la concentración de VC entre ambas fracciones no se observaron para los productos liofilizados, lo que indica una proporción equilibrada entre el contenido en VC que se absorbe en el intestino delgado y el que pasa al duodeno, a excepción de la formulación GA+FB donde ésta fue mayor en la fase DIE que en la DII (figura 3B).

Estos resultados en las digestiones intestinales muestran la inestabilidad de la vitamina C respecto a las condiciones intestinales, como el pH alcalino y la acción de las enzimas propias de esta etapa. Otros factores como la temperatura, la agitación, el oxígeno pueden propiciar también la oxidación de la vitamina C (Rodríguez-Roque, 2014). En este sentido, Jeney-Nagymate y Fodor (2008) observaron que cuando el

pH es mayor a 4 la concentración de ácido ascórbico va disminuyendo. Ball (2006) relacionó la degradación de la vitamina C en la etapa intestinal con la formación de complejos de metal-oxígeno-ascorbato.

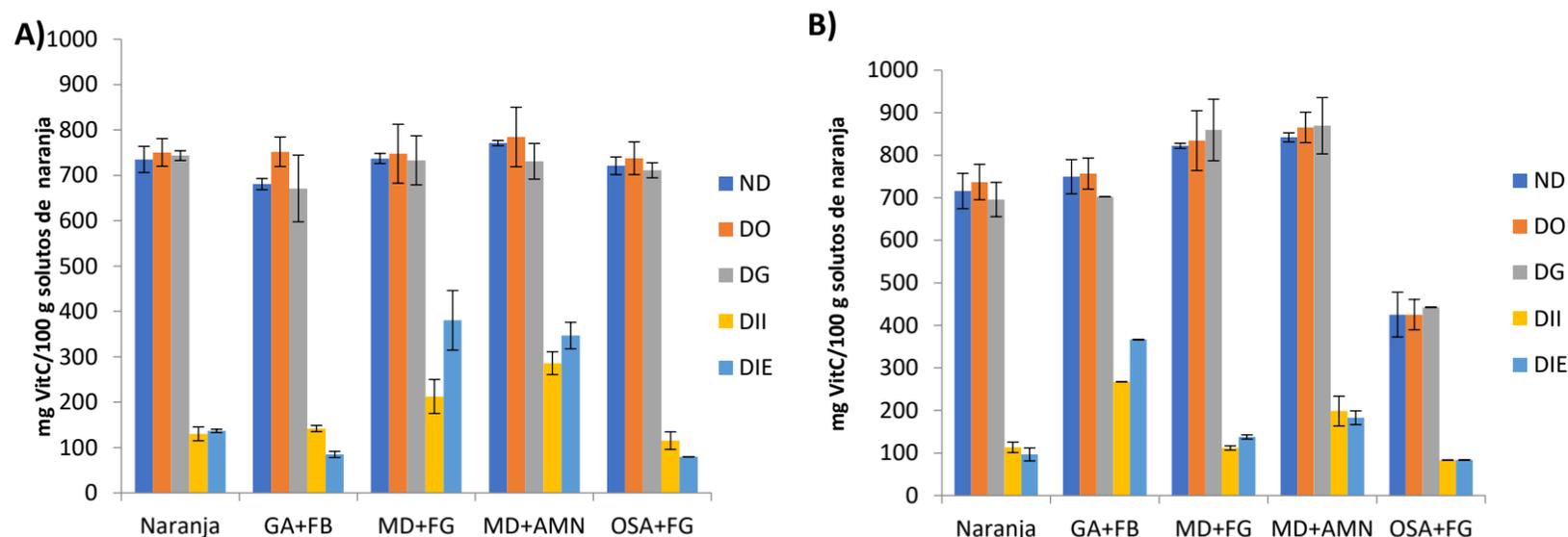


Figura 3: Contenido en vitamina C en las diferentes etapas de digestión *in vitro* de las distintas formulaciones antes de liofilizar (A) y de los productos liofilizados (B). La nomenclatura asignada a las muestras (eje X) se corresponde con los diferentes biopolímeros utilizados en cada formulación (ver Tabla 2). Leyenda: muestra no digerida (ND) y después de la digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal interna (DII) y digestión intestinal externa (DIE).

En la tabla 4 se puede observar el contenido en carotenoides totales presentes en cada uno de los purés formulados y en los correspondientes productos liofilizados antes de digerir (ND_F y ND_L, respectivamente), así como en la parte externa tras la digestión intestinal. En las digestiones oral, gástrica e intestinal interna no se detectó este compuesto bioactivo, posiblemente debido a que su concentración se encontraba por debajo del límite de detección del método analítico utilizado para su cuantificación. Otros autores también observaron la inestabilidad de los carotenoides bajo las condiciones ácidas de la fase gástrica, sufriendo principalmente reacciones de oxidación y cambios estructurales que afectan a la longitud de onda a la que absorben (Rodríguez-Roque *et al.*, 2013a). En dicha investigación tampoco observaron estos compuestos en la fracción dializada. Sólo una parte muy reducida de carotenoides se encontrarían disponibles para ser absorbidos, ya que, al ser compuestos muy hidrofóbicos, resulta difícil su dispersión en el medio acuoso del tracto digestivo. Por otra parte, su absorción también se ve dificultada por el hecho de que se trata de sustancias que tienen baja capacidad para liberarse de la matriz alimentaria y de solubilizarse (Fernández *et al.*, 2009). En otros estudios se ha comprobado que su ingesta junto con otros alimentos ricos en grasa favorece su absorción (Unlu *et al.*, 2005). En caso contrario, forman micelas, quedando los carotenoides potencialmente biodisponibles atrapados en el interior de las mismas (Quesada, 2018). Además, el epitelio del intestino posee otros constituyentes que no están en la membrana de diálisis modelo empleada (como receptores de membrana, enzimas y proteínas) que facilitan la absorción de los compuestos liposolubles (Fernández-García *et al.*, 2012). En cuanto a los resultados obtenidos en este trabajo, destaca el mayor contenido en carotenoides en la fracción duodenal de las muestras con maltodextrina, especialmente cuando se combina con la fibra de guisante (muestra MD+FG), y el menor en las muestras de naranja sin biopolímeros. En la fase intestinal, las enzimas pancreáticas y biliares ayudan a emulsionar las sustancias liposolubles facilitando su solubilización y su posterior absorción en el intestino grueso.

Tabla 4 : Contenido en carotenoides totales (media y desviación estándar) expresado como mg β-Caroteno/100g solutos de naranja, de todas las formulaciones elaboradas antes de liofilizar (ND_F), en los productos liofilizados (ND_L) y en las respectivas digestiones intestinales externas (DIE_A, DIE_B).

Muestras	Naranja	GA+FB	MD+FG	MD+AMN	OSA+FG
ND _F	58 ±6	55,1± 0,5	70±4	68,6±1,8	56±3
DIE _F	29,8 ±1,5	31± 4	57±3	53,8 ±0,9	48±2
ND _L	39 ± 3	37±4	30±3	29±3	54±7
DIE _L	6 ± 3	8±4	28±7	19,0±1,9	23±4

En las figuras 4 y 5 se muestra la AAO analizada por los métodos FRAP y DPPH, respectivamente, en las diferentes etapas de la digestión *in vitro* de las distintas formulaciones antes de liofilizar y de los productos liofilizados. La AAO de las frutas depende de la concentración de sustancias antioxidantes, como vitaminas, compuestos fenólicos y carotenoides. Distintos estudios afirman que la AAO de los cítricos es principalmente debida a la fracción hidrofílica, esto es a la vitamina C y a muchos de sus fenoles (Rodríguez Roque *et al.*, 2013a). Puesto que

dicha actividad es debida a reacciones sinérgicas entre distintos compuestos, es recomendable emplear más de un método para medir correctamente dicha actividad (Thaipong *et al.*, 2006). Las comparaciones entre resultados de capacidad antioxidante solo se pueden realizar para un mismo método puesto que el mecanismo antioxidante estudiado es diferente (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Así, el método FRAP se basa en el poder que tiene una sustancia para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} , mientras que con el método DPPH se estudia la capacidad de una sustancia para reducir al radical DPPH.

Para los productos antes de liofilizar se observó que las formulaciones con maltodextrina mantuvieron su AAO medida por el método FRAP durante las etapas DO y DG, respecto a las correspondientes formulaciones sin digerir. Sin embargo, en las muestras sin biopolímeros y en aquellas que contenían GA+FB y OSA+FG, la AAO disminuyó en estas etapas de la digestión (Fig. 4A). Esta disminución también se observó en todas las muestras cuando la AAO se midió con el método DPPH (Fig. 5A). Este comportamiento está relacionado con los cambios en la estabilidad de los compuestos fenólicos y vitamina C observados durante estas etapas de la digestión. Los productos liofilizados con biopolímeros en general mantuvieron la AAO durante estas etapas (Fig. 4B y 5B), debido al efecto protector de los mismos sobre los compuestos con actividad antioxidante.

Por otra parte, la disminución de la capacidad antioxidante de las muestras medida por ambos métodos en la etapa intestinal podría deberse a la acción ya comentada de las enzimas y del pH durante esta etapa sobre la estructura química de algunos compuestos bioactivos (Bouayed *et al.*, 2011; Torá, 2015). En este sentido, el cambio de algunas estructuras químicas y/o la formación de complejos con otras sustancias presentes en la muestra pueden suponer una disminución, no solo de la concentración, sino también de la actividad antioxidante de dichos compuestos. En cuanto a la AAO de DIE y DII, en ambas fracciones estuvo bastante equilibrada, entre los biopolímeros podría destacarse que la AAO en el dializado fue mayor que en la fase duodenal en las muestras con GA+FB.

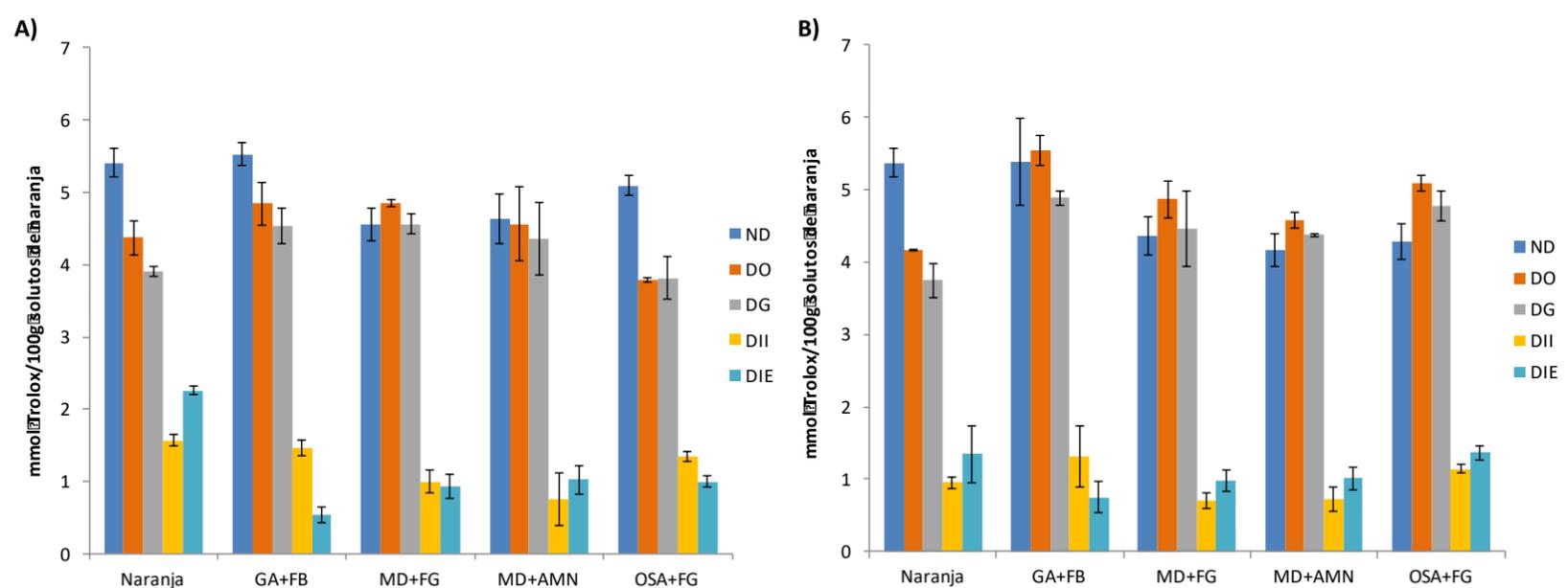


Figura 4 : Actividad antioxidante medida mediante el método FRAP en las diferentes etapas de digestión in vitro de las distintas formulaciones antes de liofilizar (A) y de los productos liofilizados (B). La nomenclatura asignada a las muestras (eje X) se corresponde con los diferentes biopolímeros utilizados en cada formulación (ver Tabla 2). Leyenda: muestra no digerida (ND) y después de la digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal interna (DII) y digestión intestinal externa (DIE).

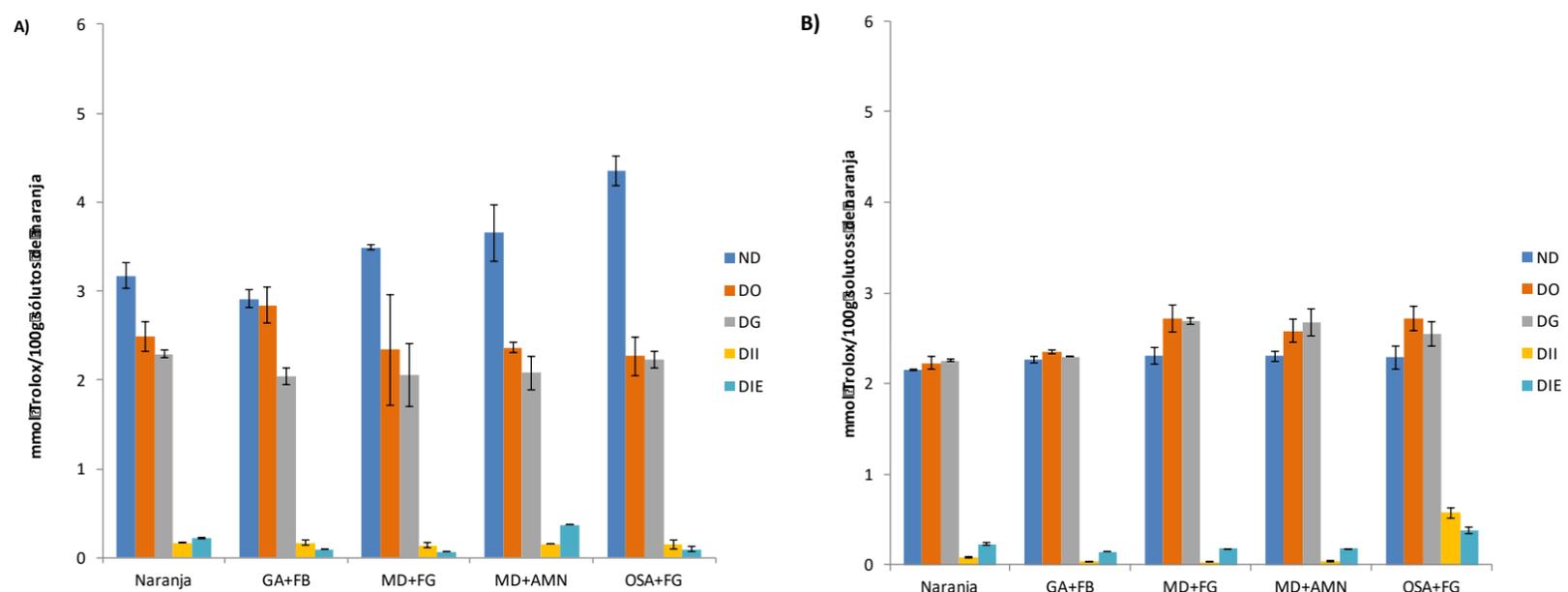


Figura 5: Actividad antioxidante medida mediante el método DPPH en las diferentes etapas de digestión *in vitro* de las distintas formulaciones antes de liofilizar (A) y de los productos liofilizados (B). La nomenclatura asignada a las muestras (eje X) se corresponde con los diferentes biopolímeros utilizados en cada formulación (ver Tabla 2). Leyenda: muestra no digerida (ND) y después de la digestión oral (DO), digestión gástrica (DG), digestión intestinal interna (DII) y digestión intestinal externa (DIE).

4.2. Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos

A partir de los contenidos en fenoles totales y vitamina C analizados tras la etapa de digestión intestinal interna y la presente en la muestra no digerida, se calculó la bioaccesibilidad de dichos compuestos en las diferentes formulaciones (Ec. 2), tanto antes como después de liofilizar (Figuras 6 y 7, respectivamente). Asimismo, se comprobó el posible efecto de la liofilización en la bioaccesibilidad, para cada formulación. Respecto a esto último, no se observaron diferencias significativas ni en el caso de la muestra sin formular, ni en el de la formulación con OSA+FG. Las muestras con maltodextrina mostraron menor bioaccesibilidad de la VC después de su liofilización ($p < 0.05$, Figuras 7). En cambio, en las muestras con GA+FB aumentó la bioaccesibilidad tanto de FT como de VC en las muestras liofilizadas ($p < 0.05$, Figuras 6 y 7).

Por su parte, las muestras formuladas antes de liofilizar formaron 3 grupos, según la bioaccesibilidad, para ambos analitos. Los productos formulados con maltodextrina presentaron la menor bioaccesibilidad de fenoles totales ($p < 0.05$, Figura 6) y la mayor de vitamina C ($p < 0.05$, Figura 7), en relación con las otras muestras formuladas, destacando para este último analito la formulación MD+AMN. La naranja no formulada presentó una bioaccesibilidad intermedia para fenoles totales, mientras que se agrupó con OSA+FG y con GA+FB presentando menor bioaccesibilidad de VC ($p < 0.05$). Sin embargo, respecto a la comparación entre los productos liofilizados de las distintas formulaciones, GA+FB presentó una bioaccesibilidad significativamente mayor ($p < 0.05$) al resto, tanto para FT como VC.

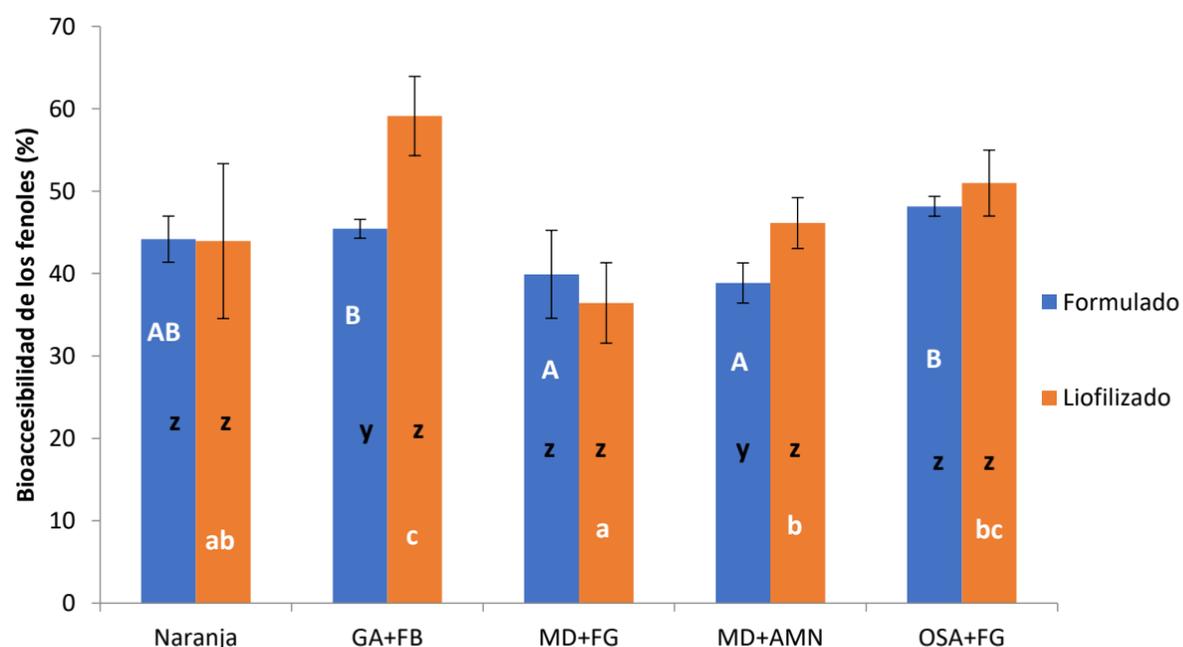


Figura 6: Bioaccesibilidad de los compuestos fenólicos (Ec. 2) en las diferentes formulaciones para los productos formulados y liofilizados. Letras diferentes, mayúsculas (A, B) y minúsculas (a, b, c), indican diferencias significativas ($p < 0.05$) para los productos formulados antes y después de liofilizar, respectivamente. Las letras z e y indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el producto formulado y el producto liofilizado de cada formulación.

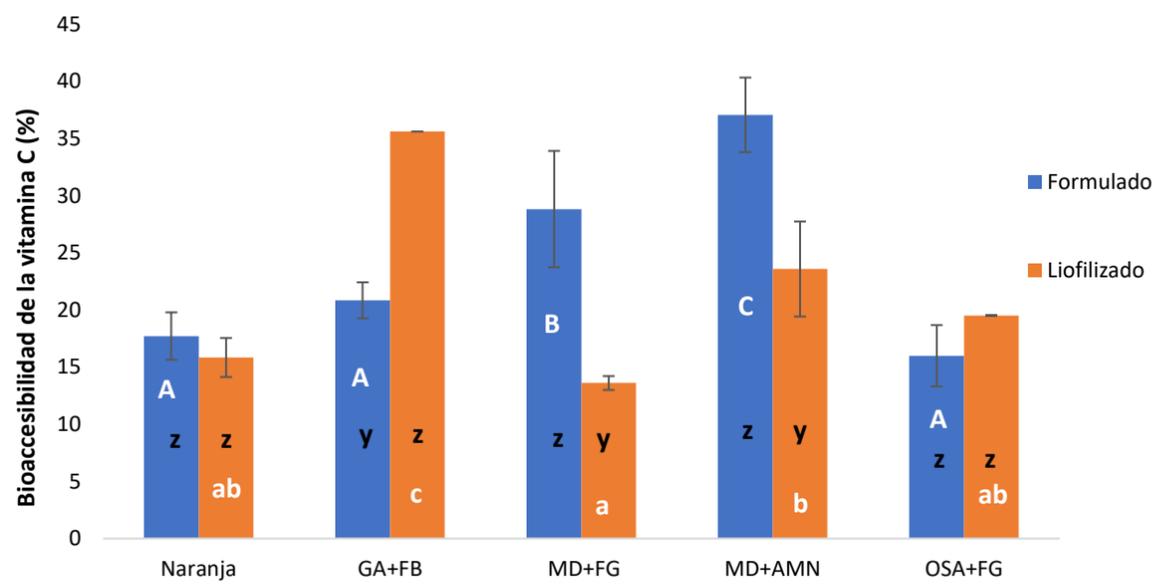


Figura 7: Bioaccesibilidad de la vitamina C (Ec. 2) expresada en porcentaje en las diferentes formulaciones para los productos formulados y liofilizados. Letras diferentes, mayúsculas (A, B) y minúsculas (a, b, c), indican diferencias significativas entre las muestras por el ANOVA ($p < 0,05$), para los productos formulados y liofilizados, respectivamente. Las letras z e y indican diferencias significativas por el ANOVA ($p < 0,05$) entre el producto formulado y el producto liofilizado de cada formulación.

5. CONCLUSIÓN

Se ha observado la influencia de las enzimas y del pH del medio en cada etapa de la digestión *in vitro* sobre la concentración de los compuestos bioactivos, especialmente de los carotenoides, y consecuentemente, sobre la actividad antioxidante. Se percibieron diferencias en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos en función de la formulación y de si el producto estaba liofilizado o no. En concreto, y como respuesta al objetivo planteado en este estudio, la combinación de biopolímeros goma Arábica y fibra de bambú es la que más favoreció la absorción de los compuestos fenólicos y de la vitamina C durante la digestión *in vitro*, sobre todo en el producto liofilizado, lo cual garantiza un excelente aporte nutricional y supone una ventaja adicional del consumo de fruta en este formato tipo snack.

6. BIBLIOGRAFÍA

AGUDELO, C; IGUAL, M; CAMACHO, MM, MARTÍNEZ-NAVARRETE. (2016). "Effect of process technology on the nutritional, functional, and physical quality of grapefruit powder" en *Food Science and Technology International* 23(1), pp. 61-74.

AOAC (1990). Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15th Edition.

APPELQVIST, I. A. M., & DEBET, M. R. M. (1997). "Starch biopolymer interactions" en *Food Review International*, 13, pp. 163–224.

ARAUJO DE VIZCARRONDO, C; MARIELA RINCÓN, A; PADILLA, F. (2004). "Caracterización del almidón nativo de *Dioscorea bulbifera* L." en *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54 (2).

ARAVENA ABARZÚA, G.A. (2014). *Bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos timol y carvacrol, presentes en el orégano y tomillo, al ser incorporados en matriz farinácea bajo diferentes condiciones de procesamiento*. Tesis. Valdivia-Chile: Universidad Austral de Chile.

BALL, G. F. M. (2006). "Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability" en *International Journal of Food Properties*, 9(4), pp. 927-928.

BARBA, A. O.; HURTADO, M. C.; MATA, M. S.; RUIZ, V. F.; DE TEJADA, M. L. S. (2006). "Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β - carotene in vegetables" en *Food Chemistry*, 95(2), pp.328-336.

BARBOSA-CÁNOVAS, G.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. (2005). "Food powders: physical properties, processing and functionality" en *Kluwer Academic/Plenum Publisher New York*, 372.

BENZIE, I.F.F. AND STRAIN, J.J. (1999). "Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay: Direct Measure of Total Antioxidant Activity of Biological Fluids and Modified Version for Simultaneous Measurement of Total Antioxidant Power and Ascorbic Acid Concentration" en *Methods in Enzymology*, 299, pp. 15-27. < [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)>.

BERK, Z. (2013). *Freeze drying (lyophilization) and freeze concentration*. Cap.23, pp.567-581. < <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-415923-5.00023-X>> [Consulta: 23 de mayo de 2019]

BERMEJO, M.V. (1999). Seminario liofilización. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia.

BHANDARI, B.R; SNOUSSI, A; DUMOULIN, E.D; LEBERT, A. (1993). "Spray drying of concentrated fruit juices" en *Drying Technology*, 11 (5), pp. 1081-1092.

BOUAYED, J; HOFFMANN, L; BOHN, T. (2011). "Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastrointestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake", en *Food Chemistry*, 128(1), pp. 14-21.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M.E; BERSET, C. (1995). "Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity" en *Food Science and Technology*, 28(1), pp. 25-30.

BRUNO, R.S.; LEONARD, S.W.; ATKINSON, J.; MONTINED, T.J.; RAMAKRISHNANE, R.; BRAY, T.M.; TRABERA, M.G. (2006). "Faster plasma vitamin E disappearance in smokers is normalized by vitamin C supplementation" en *Free Radical Biology and Medicine*, 40(4), pp. 689-697.

CABRERA GÓMEZ, A. (2016). *Identificación de las etapas de secado durante el proceso de liofilización*. Trabajo Fin de Grado. Valencia: Universitat Politècnica de València.

- CAMACHO, M.M; IGUAL, M; MARTÍNEZ-LAHUERTA, J.J; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2018). Bioavailability of freeze-dried and spray-dried grapefruit juice vitamin C. Valencia: Universitat Politècnica de València.
- CARVAJAL DE PABÓN, LUZ MARINA; TURBAY, SANDRA; ROJANO, BENJAMIN; ÁLVAREZ, LIZETH MARELLY; LUZ RESTREPO, SARA; ÁLVAREZ, JULIE MARITZA; BONILLA, KARLA CRISTINA; OCHOA O, CLARA; SÁNCHEZ, NELLY. (2011). "Algunas especies de Passiflora y su capacidad antioxidante" en *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), pp. 354-363.
- CASTAÑETA, H; GEMIO, R; YAPU, W; NOGALES, J. (2011). "Microencapsulación, un método para la conservación de propiedades fisicoquímicas y biológicas de sustancias químicas" en *Revista Boliviana de Química*, 28 (2) pp.135-140.
- CHONGTHAM, N; SINGH BISHT, M; HAORONGBAM, S. (2011). "Nutritional Properties of Bamboo Shoots: Potential and Prospects for Utilization as a Health Food" en *Food Science and Food Safety*, 10 (3).
- CORONADO H, MARTA; VEGA Y LEÓN, SALVADOR; GUTIÉRREZ T, REY; VÁZQUEZ F, MARCELA; RADILLA V, CLAUDIA. (2015). "Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana" en *Revista Chilena de Nutrición*. Vol. 42, N°2.
- DELGADO OLIVARES, L; BETANZOS CABRERA, G; SUMAYA MARTÍNEZ, MA. TERESA. (2010). "Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo" en *Investigación y ciencia*, 18 (50), pp. 10-15.
- FERNÁNDEZ, E; CARVAJAL, I; PÉREZ, A. (2009). "In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency" en *Nutrition Research*, 29(11), pp.751-60.
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; JARÉN-GALÁN, M.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; PÉREZ-GÁLVEZ, A.; HORNERO-MÉNDEZ, D. (2012). "Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities" en *Food Research International*, 46, pp. 438-450.
- Fundación Española de la Nutrición. (2011). Naranja. Dirección URL: <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/naranja.pdf> [Consulta 3 jul. 2019].
- GIL-IZQUIERDO, A; GIL, M I.; FERRERES, F; TOMÁS-BARBERÁN, F A. (2001). "In Vitro Availability of Flavonoids and Others Phenolics in Orange Juice" en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1035-1041.
- GÓMEZ H, HE; PARRA R, FJ; SANTOS A, JM; RENÉ, F. (2003). "Modelo computacional para la liofilización de alimentos de geometría finita" en *e-Gnosis*, 11(11).
- GORINSTEIN S.; MARTIN-BELLOSO O.; PARK Y-S., HARUENKIT R.; LOJEK A.; CIZ M.; CASPI A.; LIBMAN I.; TRAKHTENBERG S. (2001). "Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruit" en *Food Chemistry*, 74, pp. 309-315.
- HAMMAMI C, RENÉ F, MARTIN M. (1999)." Process-quality optimization of the vacuum freeze-drying of apple slice by the response surface method" en *International Journal of Food Science and Technology*, 34, pp. 145-60.
- HEDRÉN, E., DIAZ, V. & SVANBERG, U. (2002). "Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an *in vitro* digestion method" en *European Journal Of Clinical Nutrition*, 56(5), pp. 425-430.
- HUANG, X., SHI, L., CAO, J., HE, F., LI, R., ZHANG, Y., MIAO, S., JIN, L., QU, J., LI, Z., LIN, X. (2014). "La quinasa tao estéril de tipo 20 controla la homeostasis de los tejidos al regular la vía del hipopótamo en el intestino medio adulto de *Drosophila*. J" en *Molecular Genetics and Genomics*, 41 (8), pp. 429-438.
- HU, B; LUI, X; ZHANG, C; ZENG, X. (2017). "Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols" en *Journal of Food and Drug Analysis*, 25, pp.3-15.
- Informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas.
- IGUAL, M., GARCÍA-MARTÍNEZ, E., CAMACHO, M.M., MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2011). "Changes in flavonoids content of grapefruit juice by thermal treatment and storage" en *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12, pp. 153-162.
- JARNSTROM, L., LASON, L., RIGDAHL, M., & ERIKSON, U. (1995). "Flocculation in kaolin suspensions induced by modified starches. II. Oxidized and hydrophobically modified oxidized starch-in comparison with poly (vinyl alcohol) and carboxymethylcellulose" en *Colloids and Surfaces*, 104, pp. 207-216.
- JENEY-NAGYMATE, E. & FODOR, P. (2008). "The stability of vitamin C in different beverages" en *British Food Journal*, 110(3), pp. 296.

KUSKOSKI, E. M; ASUERO, A.G., TRONCOSO, A.M., MANCINI-FILHO, J; FETT, R. (2005). "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos" en *Food Science and Technology*, 25(4), pp. 726-732.

LEITON-RAMIREZ, Y; MOSQUERA-VIVAS, E; OCHOA-MARTÍNEZ, C; AYA-APONTE, A. (2017). *Evaluación de propiedades físico-químicas en secado de naranja (Citrus sinensis) using the freeze-drying process: influence of thickness*. <<https://www.researchgate.net/publication/313342071>> [Consulta: 7 de junio de 2019].

LJUBICA DOKI_C A; VELJKO KRSTONO_SI_C B; IVANA NIKOLI_C A. (2012). "Physicochemical characteristics and stability of oil-in-water emulsions stabilized by OSA starch" en *Food Hydrocolloids* 29, pp. 185-192.

LLANCARI, A., MATOS, A. (2011). Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria. Universidad Peruana, Congreso Nacional de Investigación, pp. 2-4.

LUPO PASIN, B; GONZÁLEZ AZÓN, C; MAESTRO GARRIGA, A. (2012). "Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones" en *Revista venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 3 (1), pp. 130-151.

LOPERA, S (2009). "Development and characterization of folic acid microparticles formed by spray-drying with gum Arabic and maltodextrin" en *Revista Vitae de la facultad de química farmacéutica*, 10 (1), pp. 55-65.

MAPA (2017). Distribución de la superficie en producción de NARANJO, MANDARINO y LIMONERO según estratos de edad. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Dirección URL: https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/citricos_tcm30-499066.pdf [Consulta 3 jul. 2019].

MARTÍNEZ-NAVARRETE, N; CAMACHO VIDAL, M.M; MARTÍNEZ LAHUERTA J.J. (2008). "Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud" en *Actividad Dietética* (2), pp. 64-8.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., VICARIO, I.M., HEREDIA, F.J. (2004). "Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides" en *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), pp. 149-155.

MCKEE, L Y LATNER, T. (2000). "Underutilized sources dietary fiber: A review" en *Plant Foods for Human Nutrition*, (55), pp. 285-304.

MICHALCZYK, M; MACURA, R; MATUSZAK, I. (2009). "The effect of air-drying, freeze-drying and storage on the quality and antioxidant activity of some selected berries" en *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, pp. 11-21.

MILLER DD , SCHRICKER BR , RASMUSSEN RR , VAN CAMPEN D. (1981). "An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals" en *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10) pp. 2248-56.

MINEKUS M; ALMINGER M; ALVITO P; BALLANCE S; BOHN T; BOURLIEU C; CARRIÈRE F; BOUTROU R; CORREDIG M; DUPONT D; DUFOUR C; EGGER L; GOLDING M; KARAKAYA S; KIRKHUS B; LE FEUNTEUN S; LESMES U; MACIERZANKA A; MACKIE A; MARZE S; MCCLEMENTS DJ; MÉNARD O; RECIO I; SANTOS CN; SINGH RP; VEGARUD GE; WICKHAM MS; WEITSCHIES W; BRODKORB A. (2014). "A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus" en *Royal Society of Chemistry*, 5(6), pp. 1113-24.

MONTAÑA C; CORTES M.; TORIJA M. (2008). Agrobiodiversidad y salud. Madrid. Consultado en: www.revistaambienta.es

OLSON JA. (1999). "Carotenoids and human health" en *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 49(15), pp.711.

PARRA HUERTAS, R. A. (2010). "FOOD MICROENCAPSULATION: A REVIEW" en *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2), pp. 5669-5684.

PEARSON, J.F.; PULLAR, J.M.; WILSON, R.; SPITTLEHOUSE, J.K.; VISSERS, M.C.M.; SKIDMORE, P.M.L.; WILLIS, J.; CAMERON, V.A.; CARR, A.C. (2017). "Vitamin C Status Correlates with Markers of Metabolic and Cognitive Health in 50-Year-Olds: Findings of the CHALICE Cohort Study" en *Nutrients*, 9 (8), pp. 831.

PÉREZ-VICENTE, A; GIL-IZQUIERDO, A; GARCÍA-VIGUERA, C. (2002). "In Vitro Gastrointestinal Digestion Study of Pomegranate Juice Phenolic Compounds, Anthocyanins, and Vitamin C" en *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (8), pp. 2308-2312.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M.E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F. (2008). "Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results" en *Food Research International*, 41(3), pp. 274-285.

PUUPPONEN-PIMIA, R; HAKKINEN, ST; AARNI, M; SUORTTI, T; LAMPI, A.M; EUROLA, M; PIIRONEN, V; NUUTILA, A.M; OKSMAN-CALDENTY, K-M. (2003). "Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways" en *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, pp. 1389-1402.

QUESADA CHAVES, D.R. (2018). *Efecto del procesamiento en el contenido y bioaccesibilidad de carotenoides presentes en un colado de pejibaye, tomate y ayote, para infantes de 6 meses de edad en adelante*. Trabajo final de graduación. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

QUIÑONES, M; MIGUEL, M; ALEIXANDRE, A. (2012). "Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludable sobre el sistema cardiovascular" en *Nutrición hospitalaria*. 27(1), pp. 76-89.

RAMÍREZ NAVAS, J.S. (2006). "Liofilización de alimentos" en *Revista Revisión de la Ciencia, Tecnología e Ingeniería de los Alimentos*. Programa doctoral en Ingeniería con énfasis en Ingeniería de Alimentos. Universidad del Valle, Cali (Colombia).

RESTREPO B, LUIS FERNANDO; URANGO M, LUZ AMPARO; DEOSSA R, GLORIA CECILIA. (2014). "Conocimiento y factores asociados al consumo de frutas por estudiantes universitarios de la ciudad de Medellín, Colombia" en *Revista chilena de nutrición*, 41(3), pp. 236-242.

RIGHETTO, A.M., NETTO, F.M., 2005. "Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola" en *International Journal of Food Properties*, 8 (2), pp. 337-346

RINCÓN, A.M; VÁSQUEZ, A; PADILLA, M; C, FANNY. (2005). "Composición química y compuestos bioactivos de las harinas de cascara de naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*) y toronja (*Citrus paradisi*) cultivadas en Venezuela" en *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 55(3), pp. 305-310.

RIVAS MONTOYA, E. (2014). *Desarrollo de un prototipo simulador del tracto gastrointestinal mediante reactores químicos automatizados*. Tesis doctoral. Málaga: Universidad de Málaga.

RODRÍGUEZ, L; LOPEZ, L; GARCÍA, M. (2015) *Determinación de la composición química y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia, mora (Rubus glaucus B.), maracuyá (Passiflora edulis S.), guayaba (Psidium guajava L.) y papayuela (Carica cundinamarcensis J.)*. < <https://www.researchgate.net/publication/267918189> > [Consulta: 17 de julio de 2019]

RODRÍGUEZ-ROQUE, M., ROJAS-GRAÜ, M., ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. (2013a). "Changes in Vitamin C, Phenolic, and Carotenoid Profiles Throughout *in Vitro* Gastrointestinal Digestion of a Blended Fruit Juice" en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), pp. 1859-1867.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M.J.; ROJAS-GRAÜ, M.A.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. (2013b). "Soy milk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion" en *Food Chemistry*, 136 pp. 206–212.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M.J. (2014). *In vitro bioaccessibility of health-related compounds from beverages based on fruit juice, milk or soy milk: Influence of food matrix and processing*. Tesis doctoral. Lleida: Universitat de Lleida.

ROOS, Y; KAREL, M. (1991). "Applying state diagrams to food processing and development" en *Food Technology*, 45 (12), pp. 66-71.

ROSS, J.A.; KASUM, C.M. (2002). "Dietary Flavonoids: Bio-availability, metabolic effects, and safety" en *Revista Nutrición*, 22, pp. 19-34.

SANCHEZ-MORENO, C; PLAZA, L; ANCOS, B; CANO, M.P. (2003). "Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices" en *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, pp. 430-439.

SILVA, M.A. (2015). *Estudio del comportamiento reológico de zumo de fruta obtenido a partir de pomelo liofilizado*. Tesis de Máster. Universitat Politècnica de València.

SIMPSON KL. (1983). "Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A" en *Proceedings of the Nutrition Society*. 42(1), pp. 7-17.

TELIS, V.R.N.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2009). "Collapse and colour changes in grapefruit juice powder as affected by water activity, glass transition and addition of carbohydrate polymers" en *Food Biophysics*, 43, pp. 44–751.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. (2006). "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts" en *Journal of food composition and analysis*, 19, pp.669-675.

TORÁ GIL, R. (2015). *Modelo de digestión in vitro de extractos de co-productos de la industria agroalimentaria*. Trabajo Fin de Grado. Elche: Universidad Miguel Hernández de Elche.

TRUONG, V; BHANDARI, B.R; HOWES, T. (2005). "Optimization of co-current spray drying process of sugar-rich foods. Part I – moisture and glass transition temperature profile during drying" en *Journal of Food Engineering*, 71 (1), pp. 55-65.

UNLU, N. Z.; BOHN, T.; CLINTON, S. K.; SCHWARTZ, S. J. (2005). "Carotenoid absorption from salad and salsa by humans is enhanced by the addition of avocado or avocado oil" en *Journal Nutrition*, 135, pp. 431-436.

VANAMALA, J.; COBB, G.; TURNER, N. D.; LUPTON, J. R.; YOO, K. S.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. (2005). "Bioactive compounds of grapefruit (Citrus paradisi Cv. Rio Red) respond differently to postharvest irradiation, storage, and freeze drying" en *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), pp. 3980-3985.

VETTER, K; GUTSCHLAG, H; SCHMOZ, G; KASCHUBE, I; LÜDER, W. (1984). "Estado nutricional del síndrome de malabsorción después de cirugía gastrointestinal" en *Wiley Online Library*, 28(4).