

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



**UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**VALORIZACIÓN DE LA BIOMASA RESULTANTE DEL EXPRIMIDO DE LA
FRUTA EN LA INDUSTRIA DE ZUMOS CÍTRICOS. RECUPERACIÓN DEL
FLAVONOIDE HESPERIDINA Y APLICACIÓN DE LA FIBRA PARA
ALIMENTACIÓN HUMANA.**

TESIS DOCTORAL

Roger Marqués Cardete

Dirigida por:

Dra. Nuria Martínez Navarrete

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Departamento de Tecnología de los Alimentos.

Valencia, Julio de 2020.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nuria Martínez Navarrete directora de esta Tesis. Sin su gran capacidad de asesoramiento, orientación y sentido del trabajo bien hecho, esta Tesis no hubiera podido llegar a su fin. Gracias.

A Carlos Artigues y Juanjo Server, Consejero Delegado y Director General respectivamente de Zumos Valencianos del Mediterráneo S.A. De ellos recibí desde el primer día su total apoyo para llevar a cabo este proyecto y sin duda han sido los grandes facilitadores para que esta empresa pudiera llevarse a cabo.

Al Dr. Paco Valle, y las horas que ha dedicado conmigo estos años a estudiar los flavonoides en los cítricos, sin ti esto hubiera sido mucho más complejo. A la Dra. Arancha Gurrea, pieza clave del equipo investigador, así como Ivan Bolos y Ana Belen Roger, los otros componentes claves del equipo de trabajo; su buen hacer y solvencia profesional han hecho posible en parte que este proyecto sea posible.

A las Dras. Celia Bañuls y Neus Bosch y al Dr. Antonio Hernández del Hospital Universitario Doctor Peset, así como al Dr. Carlos Bald, y las Dras. Clara Talens y Saioa Álvarez de AZTI, fue una suerte que nuestros caminos profesionales se encontraran y agradezco las experiencias y aprendizaje que hemos compartido.

A mi padre y mi madre Manolo y Cloti, profesores y científicos de profesión y vocación. Desde siempre nos enseñaron a Ausias, Olga, Joel, Jordi, Júlia y a mí que el estudio era fundamental durante toda la vida de las personas. Mis agradecimientos también a mis hermanos y hermanas.

Y, sobre todo, este trabajo lo dedico a Ana, mi esposa, compañera, amiga, y madre de mis hijas. Ana, sin tu apoyo, paciencia, comprensión este proyecto hubiera sido sólo un sueño. Muchas gracias, los esfuerzos que haces por mí son impagables. Y como no mil gracias a mis pequeñas Joana y Emma por la alegría que me habéis dado este tiempo cuando lo necesitaba y la paciencia con papá cada vez que estaba en el despacho trabajando.

RESUMEN

La citricultura española produce cerca de 7 millones de toneladas de cítricos al año situando esta cifra a nuestro país entre los 5 ó 6 principales productores a nivel mundial, pero sobre todo es reconocida por ser el principal exportador de cítricos de mesa. De hecho, más del 52% del volumen anual producido se destina a terceros países para consumo en fresco. El actual marco legal y normativo establece unas estrictas normas de comercialización al sector de fruta en fresco por el cual, cada año, se genera entre un 10 y 20% de fruta de destrío. Ésta no puede ser comercializada para su consumo en fresco por presencia de defectos, principalmente de tipo visual, como son calibres inapropiados o defectos de color en la piel. En las últimas décadas, ha surgido una industria de transformación, principalmente de zumos, que procesa estos volúmenes de destríos y que, a su vez, debe de dar salida al momento por el carácter perecedero de la fruta. No obstante, de todo el volumen de cítricos que se recepciona en la industria de transformación, más del 50% es biomasa formada por cortezas y membranas del endocarpio que generalmente se termina destinando al sector de la alimentación animal y por la cual se le consigue dar un valor comercial residual, cuando no inexistente. Este volumen de biomasa es rico en compuestos de gran interés tanto para la industria alimentaria, por su riqueza en determinados nutrientes como pueda ser la fibra dietética, así como para el sector nutracéutico y farmacéutico, por la alta riqueza en flavonoides. En base a esto, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue investigar la posible valorización de las distintas corrientes de biomasa generadas en los procesos de fabricación de zumos cítricos para su uso en alimentación humana.

Para abordar este objetivo, el primer paso fue la caracterización de los flavonoides cítricos de mayor interés, bien por su abundancia, o bien por el interés que despiertan para las ciencias de la salud, en las distintas corrientes de biomasa que resultan de la industria de fabricación de zumos, y que son, el propio zumo, las cortezas y las membranas del endocarpio. Los flavonoides seleccionados fueron la hesperidina, narirutina, diosmina, nobiletina, tangeretina y sinensetina y se cuantificaron en 6 variedades de naranja (*Citrus sinensis*) y otras 6 de mandarina (*Citrus reticulata*). De esta caracterización se llegó a la conclusión que la flavanona hesperidina era, con gran

diferencia, la más abundante, representando más del 60% de los flavonoides cuantificados en todas las variedades cítricas estudiadas. Además, más del 70% de esta flavanona se concentra en la corteza del fruto. Asimismo, otro resultado destacable de los trabajos de caracterización fue el hecho de que las flavonas polimetoxiladas sinensetina, nobiletina y tangeretina presentaron una concentración mucho más alta en la corteza de las variedades de mandarina híbridas Nadorcott, Ortanique y Orri que en el resto de las variedades de naranja y mandarina estudiadas.

A continuación, se procedió a ensayar dos procedimientos de recuperación de hesperidina a partir de la corriente de cortezas generadas tras el exprimido industrial de zumos. Ambos procedimientos se basaban en una extracción sólido-líquido, el primero de ellos utilizando una relación corteza agua 1:2 y el segundo 1:0,25. De los resultados obtenidos se concluyó que, si bien el primer procedimiento daba lugar a una mayor cantidad de extracto recuperado y de mayor pureza, al calcular el rendimiento del proceso como masa de hesperidina pura recuperada por unidad de masa de corteza procesada, se comprobó que no había diferencias significativas. Asimismo, el estudio de viabilidad económica de ambos procedimientos confirmó que los costes asociados al mayor consumo de agua del procedimiento con relación corteza:agua 1:2, así como los derivados de la depuración de los vertidos generados por esa agua, lo hacían inviable.

Finalmente, siguiendo en el mismo contexto de valorización de coproductos de la industria de transformación de zumos cítricos, se realizó un ensayo de aplicación de fibra procedente de la corteza de cítricos a un zumo de naranja hasta aumentar su contenido en fibra dietética de 0,2% a 1,4%. Se realizó un ensayo clínico con voluntarios para comprobar la respuesta metabólica del zumo enriquecido con fibra frente al placebo, a través de un estudio del metabolismo hidrocarbonado y de tests de sensación de saciedad. De este ensayo se comprobó una mejor respuesta en las curvas de glucosa e insulina de los voluntarios al inicio de la fase de absorción del zumo enriquecido con la fibra. Asimismo, las pruebas demostraron un efecto significativo en la contribución a la sensación de saciedad y plenitud tras la ingesta del zumo enriquecido con fibra.

RESUM

La citricultura espanyola produeix prop de 7 milions de tones de cítrics a l'any, situant esta xifra al nostre país entre els 5 o 6 principals productors a nivell mundial, però sobre tot és reconeguda per ser el principal exportador de cítrics de taula del món. De fet, més del 52 % del volum produït anualment es destina a tercers països per al consum en fresc. L'actual marc legal i normatiu estableix unes estrictes normes de comercialització al sector de fruita en fresc pel qual cada any es genera entre un 10% i 20% de fruita de rebuig que no pot ser comercialitzada per al seu consum en fresc a causa de la presència de defectes principalment de tipus visual, como poden ser calibres inadequats o defectes de coloració a la pell. A les últimes dècades, ha sorgit una indústria de transformació principalment de suc, que processa estos volums de fruita de rebuig i que, al mateix temps, se'ls ha de donar eixida al moment pel seu caràcter perible. No obstant, de tot el volum de cítrics que es recepciona a la indústria de transformació, més del 50% és biomassa formada per les corfes i membranes de l'endocarp que generalment s'acaben destinant al sector d'alimentació animal i per la qual se li aconsegueix donar un valor comercial residual quant no inexistent. Este volum de biomassa és ric en compostos químics de gran interès tant per a la indústria alimentaria per la seua riquesa en determinats nutrients com ara la fibra dietètica, així como per al sector nutricional i farmacèutic per la alta riquesa en flavonoides. En base a tot això l'objectiu general de la present tesi doctoral va consistir en la valorització dels distints corrents de biomassa generats als processos de fabricació de suc cítrics per al seu ús en l'alimentació humana.

Per a abordar este objectiu, el primer pas va ser la caracterització dels flavonoides cítrics de major interès, be per la seua abundància, o be per l'interès que han despertat per a les ciències de la salut, als distints corrents de biomassa que resulten de la indústria de fabricació de suc, i que són ,el propi suc, les corfes i les membranes de l'endocarp. Els flavonoides seleccionats van ser la hesperidina, narirutina, diosmina, nobiletina, tangeretina y sinensetina i es quantificaren en 6 varietats de taronja (*Citrus sinensis*) i en altres 6 de mandarina (*Citrus reticulata*). D'esta caracterització es va arribar a la conclusió que la flavanona hesperidina era, amb gran diferència, la mes abundant

representant més del 60% dels flavonoides quantificats a totes les varietats cítriques estudiades. A més, més d'un 70% d'esta flavanona es concentra a la corfa del fruit. Així mateix, un altre resultat destacable dels treballs de caracterització va ser el fet de que les flavones polimetoxiladas sinensetina, nobiletina i tangeretina presentaren una concentració molt més alta en la corfa de les varietats de mandarines híbrides Nadorcott, Ortanique i Orri que en la resta de varietats de taronja i mandarina estudiades.

A continuació es va procedir a assajar procediments de recuperació de hesperidina a partir del corrent de corfes generades amb l'operació d'exprimit de suc industrial. Tots dos procediments es basaven en una extracció del tipus sòlid-líquid, el primer del quals es requeria una relació corfa:aigua del 1:2, mentre que el segon era tan sols de 1:0,25. Dels assajos realitzats es va concloure que si bé el primer procediment donava com a resultat una major quantitat d'extracte recuperat i de major puresa, no obstant això, al calcular el rendiment del procés com a masa d'Hesperidina pura obtinguda per unitat de masa de corfa processada, es va comprovar que no hi havia diferències significatives. A més a més, l'estudi de viabilitat econòmica d'ambdós procediments va confirmar que els costos associats al major consum d'aigua del procediment amb relació corfa:aigua 1:2 així com els derivats de la depuració dels abocaments generats per eixa aigua de procés, el feien inviable.

Finalment, seguint amb el mateix context de valorització de coproductes de la indústria de transformació de sucs cítrics, es va realitzar un assaig d'aplicació de fibra procedent de la corfa de cítrics a un suc de taronja fins a augmentar el seu contingut en fibra dietètica des de 0,2% fins a 1,4%. Es va realitzar un assaig clínic amb voluntaris per a comprovar la resposta metabòlica de suc enriquit amb la fibra front al placebo, a través d'un estudi del metabolisme hidrocarbonat i de tests de sensació de sacietat. A este assaig es va comprovar una millor resposta a les corbes de glucosa i insulina dels voluntaris a l'inici de la fase d'absorció del suc enriquit amb fibra. Així mateix, les probes demostraren un efecte significatiu a la contribució de la sensació de sacietat i plenitud després de la ingesta del suc enriquit amb fibra.

ABSTRACT

The Spanish citrus sector produces about 7 million tons of citrus per year. This figure places our country among the 5 or 6 main producers worldwide, but the most important fact is that Spain is recognized as the main exporter of citrus for fresh consumption. In fact, more than 52% of the annual volume produced is exported to third countries for fresh consumption. The current legal and regulatory framework establishes strict marketing standards for the fresh fruit sector. Because of this, between 10 and 20% of the total citrus fruits produced do not meet those market standards and are finally classified as rejects. This kind of fruits cannot be marketed for fresh consumption due to the presence of defects, mainly of a visual nature, such as inappropriate sizes or colour defects on the skin. In recent decades, a transformation industry has emerged, mainly citrus juices producers, which process these volumes of rejects and that, at the same time, have the duty to collect this fruit immediately from the production centres due to the perishable nature of the fruits. However, more than 50% of the entire volume of fruits that are received in the processing sites, is represented by the biomass formed by endocarp membranes and fruit peels that generally ends up being destined for the animal feed sector and for which the industry perceives a residual and even sometimes non-existent economical value. This volume of biomass is rich in chemical compounds of great interest both for the food industry, due to its richness in certain nutrients such as dietary fiber, as well as for the nutraceutical and pharmaceutical sector, due to its high richness in flavonoids. Based on this, the general objective of this Doctoral Thesis was to investigate the recovery options of certain substances of the different biomass streams generated during the citrus transformation at the fruit juice industry, for their subsequent application in human nutrition.

To accomplish this objective, the first step was the characterization of the citrus flavonoids of greatest interest, either because of their abundance, or because of the interest they represent for health sciences, in the different biomass streams that result from the manufacture of juices, and that are, the juice itself, the membranes of the endocarp and the peels. The selected flavonoids were hesperidin, narirutin, diosmin, nobiletin, tangeretin and sinensetin and were quantified in 6 varieties of orange (*Citrus*

sinensis) and another 6 of mandarin (*Citrus reticulata*). From this characterization, it was concluded that hesperidin flavanone was by far the most abundant, representing more than 70% of the total flavonoid content and in addition, this flavanone is concentrated in the rind of the fruit. Likewise, another remarkable result of the characterization work was the fact that the polymethoxylated flavones sinensetin, nobiletina and tangeretin presented a much higher concentration in the peel of the hybrid mandarin varieties Nadorcott, Ortanique and Orri.

Then, two hesperidin recovery processes were tested from the rind stream generated after industrial juicing. Both procedures were based on a solid-liquid extraction, the first one using a 1: 2 peel-to-water ratio and the second 1: 0.25. From the results obtained it was concluded that, although the first procedure lead to a greater quantity of recovered extract and of higher purity, when calculating the yield of the process as mass of pure hesperidin recovered per unit mass of processed peel, it was found that there were no significant differences. Likewise, the economic feasibility study of both procedures confirmed that the costs associated with the higher consumption of water in the procedure with a peel: water ratio 1: 2, as well as those derived from the treatment of the waste water generated, made it unviable.

Finally, continuing in the same context of by-products valorisation from the citrus juice transformation industry, an application trial of fiber from citrus peel to an orange juice was carried out until its dietary fiber content increased by 0.2 % to 1.4%. A clinical trial was carried out with volunteers to verify the metabolic response of the fiber-enriched juice compared to placebo, through a study of carbohydrate metabolism and tests fullness feeling. From this test, a better response was found in the glucose and insulin curves of the volunteers at the beginning of the absorption phase of the fiber-enriched juice. Likewise, the tests showed a significant effect on the contribution to the feeling of satiety and fullness after the intake of the fiber-enriched juice.

1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Particularidades de la producción española de naranjas y mandarinas	15
1.2. Descripción nutricional de los frutos cítricos y sus zumos. Aspectos saludables de interés	19
1.3. Flavonoides presentes en naranjas y mandarinas	22
1.4. La industria de extracción de zumos críticos	28
1.4.1. Descripción de los procesos de extracción de zumos cítricos	28
1.4.2. Coproductos asociados a los procesos de extracción de zumos cítricos	39
1.4.3. Corrientes líquidas de biomasa potencialmente valorizables	47
1.4.4. Corrientes sólidas de biomasa potencialmente valorizables	51
2. OBJETIVOS	53
2.1. Objetivo General	53
2.2. Objetivos específicos	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS	54
3.1. Materia prima	54
3.2. Análisis de flavonoides	56
3.2.1. Extracción de flavonoides	57
3.2.1.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas	57
3.2.1.2. Preparación de patrones	58
3.2.1.3. Preparación de muestras de zumo	59
3.2.1.4. Preparación de muestras corteza y membrana	59

3.2.2. Cuantificación de flavonoides	60
3.2.3. Análisis estadístico	60
3.3. Recuperación industrial de hesperidina a partir de la corteza de cítricos	60
3.3.1. Procedimiento de recuperación	61
3.3.2. Análisis de la pureza del extracto de hesperidina obtenido	64
3.3.3. Análisis de otros componentes presentes en el extracto de hesperidina.....	65
3.3.4. Valoración técnico-económica de los procedimientos de extracción de hesperidina	67
3.4. Valor funcional del zumo de naranja enriquecido con fibra a partir de las cortezas.....	69
3.4.1. Formulación del zumo	69
3.4.1.1. Materia prima	69
3.4.1.2. Zumo enriquecido con la fibra	71
3.4.2. Ensayos clínicos	73
3.4.2.1. Estudio hidrocarbonado	75
3.4.2.2. Sensación de saciedad	76
3.4.3. Análisis estadístico	76
4. RESULTADOS	78
4.1. Caracterización de los principales flavonoides de las variedades de naranja y mandarina	78

4.2. Recuperación industrial de hesperidina a partir de la corteza resultante del exprimido de frutos cítricos	98
4.3. Valoración a nivel industrial de los procedimientos de obtención de hesperidina a partir de la corteza resultante del exprimido de frutos cítricos	102
4.4. Eficiencia industrial de la recuperación de hesperidina como coproducto.....	109
4.5. Valor funcional del zumo de naranja con fibra obtenida a partir de sus cortezas	111
5. CONCLUSIONES	117
6. REFERENCIAS	120
7. ANEXOS	128

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Particularidades de la producción española de naranjas y mandarinas.

La producción de cítricos a nivel mundial ha seguido en continuo crecimiento durante las últimas décadas (Figura 1.1). En mayor o menor medida, los cerca de noventa países productores de cítricos han aumentado sus volúmenes de producción dando lugar a unos números crecientes a nivel mundial incluso, a pesar del fuerte receso que ha supuesto enfermedades devastadoras como el *citrus greening* en regiones líderes del globo como son Florida o Brasil.

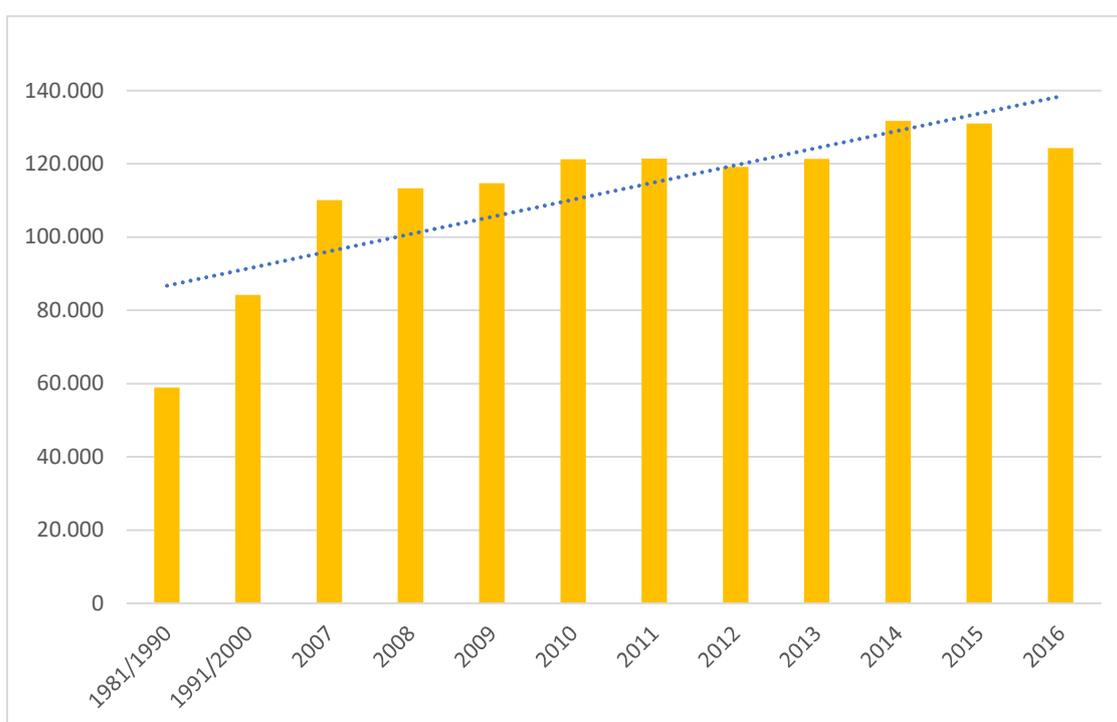


Figura 1.1. Producción mundial de cítricos (miles de t) (FAO, 2015 y 2016)

Los cítricos son los frutos más producidos a nivel mundial tanto en el hemisferio norte como en el sur. Dos son los principales factores que hacen esto posible; por un lado, porque sus propiedades físicas les confieren unas cualidades inmejorables para la conservación y transporte a cualquier lugar del globo y, por otro, porque se trata de uno de los pocos frutos de invierno que además crece por igual en ambos globos.

Si además se tiene en cuenta la producción cítrica que va destinada exclusivamente a industria, encontraríamos una tercera razón adicional de porqué el volumen de cítricos, y muy especialmente el de naranja, ha experimentado un crecimiento sostenido durante los últimos años. Según el informe de mercado correspondiente al año 2018 de la *Association of the Industry of Juices and Nectars of the EU* (A.I.J.N., 2018), en los cinco países más poblados de la Unión Europea, el zumo de naranja fue el principal sabor demandado por los consumidores suponiendo el 38,3% del volumen de ventas con respecto a la totalidad de sabores. Este dato incluye la categoría de zumos, zumos procedentes de concentrado y néctares. Si nos centramos solamente a la categoría de zumos directos o zumos *NFC* (por sus siglas en inglés *Not From Concentrate* es decir, aquellos no procedentes de concentrado) la naranja representa el 49,8% de los zumos comercializados en estos países correspondiendo la otra mitad de zumos a la suma del resto de frutas (manzana, piña, melocotón, frutas del bosque, etc.).

De entre todos los cítricos la naranja es el fruto más producido en todo el mundo principalmente porque es el fruto más robusto desde la etapa de producción y a su vez sus propiedades físicas lo hacen muy favorable para ser transportado por todo el mundo. Del volumen de producción mundial de cítricos alrededor del 54% corresponde a la naranja. A continuación, le sigue la mandarina con un 27% del total y, finalmente, el 20% restante corresponde a la suma de limón, lima y pomelo (Figura 1.2).

El cultivo de la mandarina, a diferencia del de naranja, presenta dificultades adicionales. Además, la fragilidad propia de este fruto hace más compleja y limitada su comercialización. No obstante, a pesar de estos hechos, la producción mundial de mandarinas en el mundo puede considerarse creciente según muestran los datos de FAO de 2016 (Tabla 1.1).

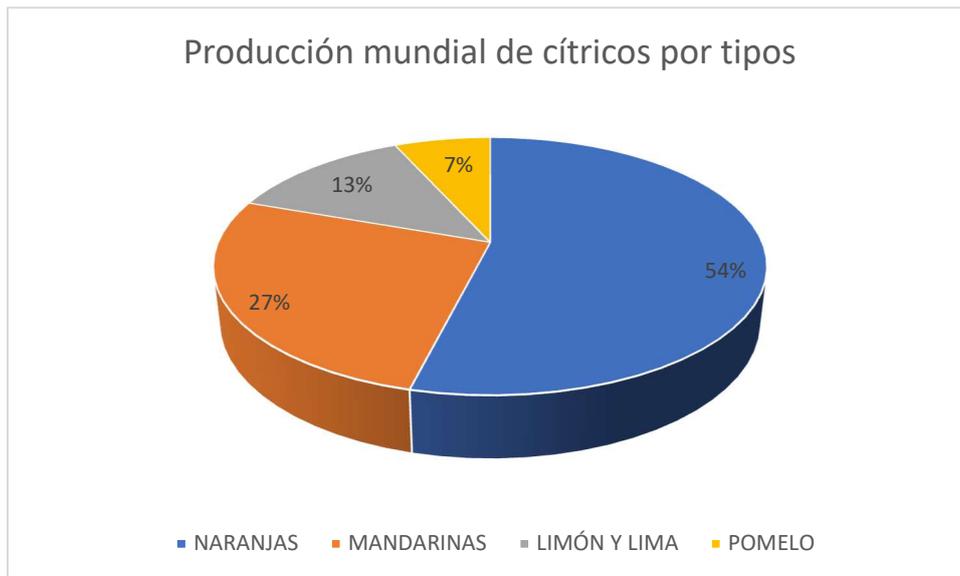


Figura 1.2. Producción mundial de cítricos por tipos (FAO, 2016)

Ambas especies botánicas representaron el 80% de la producción de cítricos mundial, motivo por el cual estos dos frutos van a ser el objeto de la presente tesis doctoral.

En la actualidad España es el quinto productor mundial de cítricos, siendo esta producción en 2016, según datos de FAO, de 6,88 millones de t, disputándose el puesto con México (6,63 millones de t). Por delante tienen, en orden decreciente a China (32,7 millones de t), Brasil (16,55 millones de t), India (9,75 millones de t) y Estados Unidos (7,82 millones de t). A diferencia de otras regiones líderes en el mundo como es el caso de Brasil o Florida donde su producción va destinada mayormente a fines industriales, la citricultura española está destinada en su práctica totalidad a fruta de mesa para consumo en fresco. España es reconocida mundialmente por la calidad de sus cítricos para consumo en fresco, especialmente las naranjas (*Citrus sinensis*) y mandarinas (*Citrus reticulata*) y actualmente es el principal exportador mundial de naranjas y mandarinas de mesa. Este hecho lo confirman los datos del último informe del CGC (2017) según el cual, durante la campaña 2016-2017 se produjo un total de 7,2 millones de t de cítricos en España de los cuales 3,7 millones de t fueron destinados a exportación suponiendo esta cifra el 52,4% de la producción nacional. Estos números ponen a España en cabeza en el ranking mundial de exportaciones, muy por delante de los países que le

siguen que fueron, para ese mismo año, Turquía con 1,71 millones de t y Sudáfrica con 1,70 millones de t.

Tabla 1.1. Producción de mandarinas (en miles de t) (FAO, 2016)

Región	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Total mundial	23.376	24.951	26.477	31.278	33.078	34.529	37.708	38.306	32.969
Hemisferio Norte	21.199	22.680	24.085	28.861	30.828	32.250	35.309	35.912	30.609
Hemisferio Sur	2.177	2.271	50.562	60.140	63.906	66.779	73.017	74.217	63.578

En el contexto de la Unión Europea, los mercados agrarios comunitarios están regulados por el Reg. (UE) 543/2011, que a su vez define unas Normas de Comercialización, donde se recogen para algunos productos de especial interés comercial, como en el caso de cítricos, unos requisitos mínimos de calidad: los frutos deben estar enteros, sin heridas, sanos, exentos de daños causados por plagas, de señales de desecación o de heladas, etcétera, además de un diámetro mínimo y máximo. Dependiendo de la campaña, pueden no cumplir estos requisitos entre un 10 y un 20% de la cosecha y ésta es la fruta que será destinada a la industria de los zumos y otras conserveras. Esta fruta debe retirarse y ser conducida a industria por un doble motivo. El primero, es que se trata de una fruta perecedera que, de no existir una industria asociada a la producción de fruta de mesa, en pocos días se alteraría y pasaría de ser producto valorizable a convertirse en un residuo orgánico a gestionar en la correspondiente planta de tratamiento de residuos. Como segundo motivo, estaría el rol de la industria española de zumos como agente regulador que equilibra la oferta y demanda de cítricos frescos, evitando el desplome del precio de la fruta cuando se dan situaciones de excesos de oferta. Este papel de la industria es sumamente estratégico dentro del sector citrícola y su función, a la hora de descongestionar mercados y valorizar segundas calidades de fruta, es necesaria para la fortaleza de este sector agrícola. En los últimos años la salida industrial de la fruta se ha vuelto necesaria para poder regular el mercado citrícola, a la vez que lo consigue dando una salida de primer nivel y sostenible por ser la más ecológica posible para una parte muy relevante de las cosechas anuales. En la campaña 2016/2017 según

los datos publicados por el CGC en octubre de 2017, el volumen de naranjas destinado a industria fue de 705.800 t lo cual supuso un 19,34% de la producción nacional de ese año y, para el caso de las mandarinas, la parte destinada a transformación alcanzó los 294.600 t lo cual supuso un 12,3% del volumen nacional anual.

1.2. Descripción nutricional de los frutos cítricos y sus zumos. Aspectos saludables de interés.

Los zumos cítricos de naranja y mandarina son ampliamente consumidos a nivel mundial por su carácter refrescante y agradable sabor, pero el gran valor de ambos productos radica en su composición nutricional. La incorporación a la dieta de una ración diaria de zumo de naranja o mandarina supone un aporte de macro y micronutrientes que son necesarios para la salud como agua, vitaminas, minerales, fibra, aunque a su vez presentan contenidos bajos de otros nutrientes como las grasas y proteínas (Tablas 1.2 y 1.3). En función de la especie botánica de que se trate su valor energético va a oscilar entre las 40 kcal/100 ml para el caso del zumo de naranja y las 48 kcal/100ml para el zumo de mandarina. El contenido energético más alto de la mandarina es consecuencia de una mayor cantidad de azúcares naturalmente presentes que, por lo general, contienen las principales variedades comerciales de esta especie.

Tabla 1.2. Componentes mayoritarios de las mandarinas, las naranjas y sus zumos (g/100g) (ANSES-CIQUAL, 2017)

Producto	Agua	Hidratos de carbono	Azúcares totales	Proteína	Grasa	Fibra total	Contenido mineral
Zumo de naranja	88,2	9,6	9,6	0,6	0,1	0,3	0,2
Naranja fruta	86,9	7,9	7,9	1,1	0,4	2,2	0,2
Zumo de mandarina	88,0	10,6	10,0	0,7	0,1	0,2	0,2
Mandarina fruta	86,3	9,7	9,7	0,7	0,3	1,5	0,2

Del análisis de estos datos mostrados en la Tabla 1.2 rápidamente se desprende que el agua es el principal componente en relación porcentual al peso tanto para el zumo como para la fruta. A continuación, el nutriente en mayor proporción en peso son los hidratos de carbono, especialmente los azúcares solubles los cuales vienen a representar entre el 8 y 10% en el zumo y fruta para ambas especies. Los azúcares presentes en los cítricos son principalmente el disacárido sacarosa y los monosacáridos glucosa y fructosa.

El contenido proteico de los cítricos no es relevante desde el punto de su impacto en la dieta y además las proteínas que pueden aportar son más bien de carácter funcional al tratarse mayormente de enzimas. Asimismo, el contenido en lípidos es muy bajo llegando a ser despreciable (nivel de trazas) en el caso del zumo por lo que no contribuye a penas en el valor calórico del producto.

Según los datos expuestos en la Tabla 1.2, la gran diferencia nutricional entre las naranjas y sus zumos radica en el contenido en hidratos de carbono no aprovechables, que constituyen la fibra dietética. En la fruta vamos a encontrarla en valores que rondan el 2% en peso para las naranjas y mandarinas, fundamentalmente en forma de fibra soluble que estaría constituida por las pectinas. En los zumos de naranja y mandarina, el contenido de fibra disminuye rondando valores del 0,2% y pudiendo ser algo superior (hasta el 0,7%) en aquellos zumos comerciales a los que se les ha restituido las celdillas y tienen un contenido de pulpa centrifugable más elevado. El consumo de fibra dietética está asociado con beneficios para la salud y prevención de enfermedades crónicas como son los trastornos metabólicos (obesidad y diabetes mellitus tipo 2), enfermedades cardiovasculares o cáncer (Tungland et al., 2002). No obstante, a pesar de estos beneficios, los estudios epidemiológicos demuestran que la ingesta de fibra está por debajo de las cantidades diarias recomendadas, principalmente por el escaso consumo de frutas y verduras (Holmboe-Ottensen et al., 2012, Lanza et al., 1987). Por ello, el enriquecer un zumo de naranja con fibra de la propia fruta podría, además de contribuir a disminuir el volumen de residuos generados, proporcionar un producto funcional muy interesante. En este sentido, en la industria de alimentos y bebidas, la adición de fibras industrializadas como los fructooligosacáridos (FOS), la inulina y o la polidextrosa son

una tendencia emergente como alternativa para contribuir a lograr los niveles recomendados de ingesta de fibra (Anderson et al., 2009).

En el apartado de los micronutrientes tanto los frutos cítricos como sus zumos van a despertar gran interés, principalmente por su aporte en vitaminas entre las cuales destaca esencialmente la vitamina C, el ácido fólico (vitamina B9) y la provitamina A (betacaroteno), tal y como muestra la Tabla 1.3. Entre los minerales, el mayoritario con diferencia es el potasio que, para el caso del fruto entero, supone alrededor del 70% de la materia mineral llegando a representar sobre el 80% del total de los minerales en el caso de los zumos.

Tabla 1.3. Contenido en vitaminas, carotenoides y minerales por cada 100g de los frutos cítricos y sus zumos (ANSES-CIQUAL, 2017)

Producto	Vitamina C (mg)	Ácido Fólico (µg)	Provitamina A (µg)	Contenido mineral (mg)	Potasio (mg)
Zumo de naranja	37,0	30,0	26,2	196	165,0
Naranja fruta	57,0	38,1	71,0	212,7	151,0
Zumo de mandarina	17,6	19,0	30,0	155,1	123,0
Mandarina fruta	26,7	18,5	155,0	204,2	137,0

Esta capacidad de los frutos cítricos y sus zumos de proporcionar nutrientes, así como otros compuestos bioactivos, contribuirá al mantenimiento de la salud y a la prevención de enfermedades, si son incorporados de forma regular y equilibrada en la dieta. Es numerosa la bibliografía científica que vincula a las dietas ricas en frutas y vegetales con beneficios para la salud (Cámara et al., 2003), apuntando algunas fuentes a la disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e incluso de ciertas formas de cáncer (Martínez et al., 2001). En este sentido, recientes estudios revelan el rol que desempeñan otros constituyentes saludables, presentes en los alimentos vegetales en general y en los frutos cítricos en particular, y que la comunidad científica ha venido a denominar *compuestos bioactivos* o también *fitoquímicos*. Dentro de los

fitoquímicos el grupo más importante, tanto por la cantidad como por las distintas especies que contiene, es el de los compuestos polifenólicos. Los polifenoles son grupos moleculares que aportan a los frutos características como color, olor y sabor, algunos de ellos se caracterizan por ejemplo por conferir sabores amargos a los vegetales. Pero, la importancia que recientemente han despertado para las ciencias de la salud es por su función como agentes protectores de enfermedades en las que intervienen radicales libres como el cáncer y las enfermedades de tipo cardiovascular. En este sentido, los cítricos y sus zumos presentan una alta carga antioxidante resultado de su riqueza en polifenoles como es el caso de la flavanona hesperidina y otros compuestos como la vitamina C o los carotenoides, la combinación de los cuales hacen del cítrico un producto muy completo para ser ingerido diariamente y contribuir de esta forma a la mejora de la salud.

1.3. Flavonoides presentes en naranjas y mandarinas.

Los flavonoides de las plantas son un enorme grupo de compuestos de naturaleza ubicua pues se encuentra en todo el reino vegetal (Lopez, 1995). Se trata de metabolitos secundarios de las plantas y químicamente (Figura 1.3) se caracterizan por presentar un mismo esqueleto común (representado por cadenas C6-C3-C6) formado por dos anillos aromáticos benzénicos (A y B) los cuales están conectados a través de un anillo denominado comúnmente anillo C que consiste en un anillo pirano para el caso de las flavonas o dehidropirano para el caso de la flavanona (Gattuso et al., 2007).

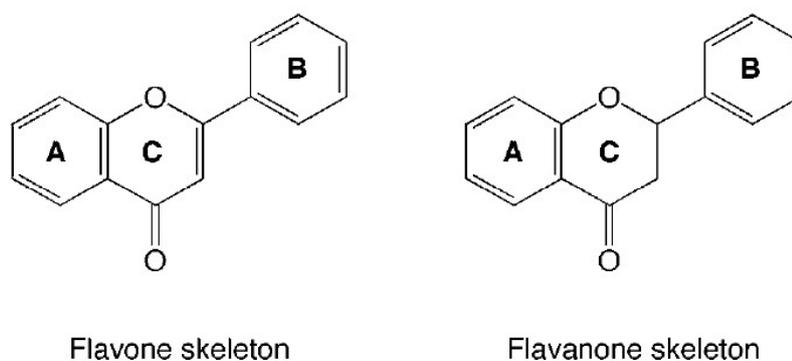


Figura 1.3. Esqueleto de la flavona y la flavanona

Dentro del grupo de las flavonas recibe el nombre genérico de Flavonas Polimetoxiladas (FPM) una familia química de las mismas que presentan un número de grupos metoxilos igual o superior a cuatro según se ilustra en la Figura 1.4 (Green et al. 2007). Estos compuestos son, además, prácticamente exclusivos de los cítricos (Ooghe et al., 1994).

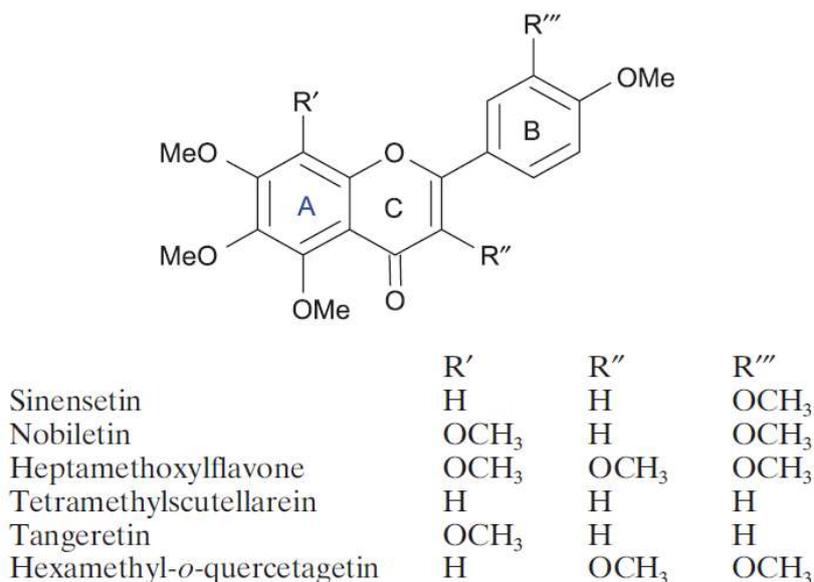
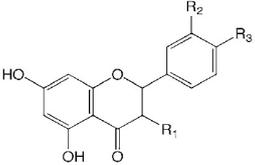
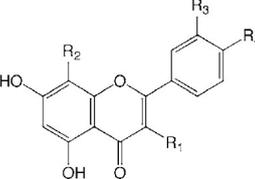
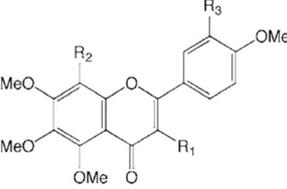


Figura 1.4. Estructura química de las flavonas polimetoxiladas.

En el caso de los frutos cítricos y sus zumos, los flavonoides están principalmente presentes en forma de glucósidos, es decir unidos a un azúcar. Las agliconas (formas flavónicas que no van unidas a un azúcar) ocurren con menor frecuencia y son especialmente escasas en el caso de los zumos puesto que su naturaleza lipofílica las hace poco solubles en el agua. En los cítricos y sus zumos en general, existe una tipología elevada de flavonoides resultado de gran variedad de combinaciones entre agliconas polihidroxiladas con mono y disacáridos. Las moléculas de azúcar más típicas en estas uniones son los monosacáridos D-glucosa y L-ramnosa. Los glucósidos son principalmente O-glucósidos con el azúcar unido generalmente al grupo hidroxilo de la aglicona en C-7 o en algunos casos en C-3. En las Tablas 1.4 y 1.5 se describen las principales formas de flavonoides agliconas y glucósidos, respectivamente, que describe la bibliografía para la naranja (*C. Sinensis*) y la mandarina (*C. Reticulata*) tanto en partes

sólidas del fruto como sus zumos. (Gattusso et al., 2007, Manthey et al., 1996; Abad García et al., 2014 y López, 1995).

Tabla 1.4. Flavanonas y flavonas agliconas detectadas en naranjas y mandarina.

GRUPO	ESQUEMA	COMPUESTO	<i>C. Sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>
FLAVANONAS AGLICONAS		Hesperinitina	X	
		Naringenina	X	
FLAVONAS AGLICONAS		Acacetin		X
		Apigenina	X	
		Diosmetina	X	
FLAVONAS POLIMETOXI LADAS		Quercetogenin		X
		3,3',4',5,6,7,8-heptamethoxyflavona	X	X
		Nobiletina	X	X
		Sinensetina	X	X
		Tangeretina	X	X
		Tetrametilscutellareina	X	

Las flavanonas agliconas aparecen de forma reducida, si no anecdótica, y la presencia de compuestos como naringenina o hesperetina, en ocasiones es resultado de procesos de hidrólisis glucosídica que tienen lugar durante la transformación de los cítricos. Así, Manthey et al. (1996) observaron que al obtener licor de prensado de corteza o melazas aparecían estos dos compuestos, cuando el análisis de la corteza de esa fruta no dio presencia de estos originariamente.

Tabla 1.5. Glucósidos de flavonas y flavanonas detectadas en naranjas y mandarinas

GRUPO	ESQUEMA	COMPUESTO	<i>C. Sinensis</i>	<i>C. reticulata</i>
FLAVANONAS-O-GLUCOSIDOS		Didimin	X	X
		Eriocitrina	X	X
		Hesperidina	X	X
		Narirutina	X	X
		Neoriocitrina	X	X
		Poncirina	X	
FLAVONAS (C y O glucósidos)		Vicenina-2	X	X
		Lucenina-2 4'-metil eter		X
		Luteolina 7-O-rutinosido		X
		Scoparina		X
		Rutina		X
		Rhoifolina	X	
		IsoRhoifolina	X	X
		Diosmin	X	X
Neodiosmin	X			

Por su parte, los datos analizados en la bibliografía muestran que los glucósidos de flavanona son los presentes en mayor concentración de todos los flavonoides en las distintas variedades de naranjas y mandarinas, estando la hesperidina a la cabeza con gran diferencia con respecto a los otros. La riqueza en hesperidina presenta ciertas variaciones según la fuente bibliográfica consultada oscilando entre el 55% y 85% del total de flavonoides tanto para naranjas como mandarinas.

La hesperidina, también denominada Hesperetina-7-rutinósido, químicamente es el 7-ramnoglucósido de la hesperetina y su fórmula $C_{28}H_{34}O_{15}$ (Figura 1.5). Se trata de la flavanona que se encuentra en mayor concentración en los tejidos de naranja y mandarina, así como en sus zumos.

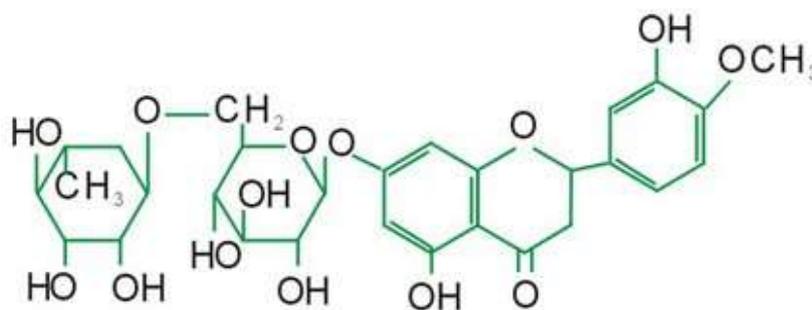


Figura 1.5. Molécula de Hesperitina-7-rutinósido (hesperidina).

La hesperidina en sí tiene cierto interés para la industria de zumos desde el punto de vista de calidad del producto porque su presencia en el zumo contribuye a la opacidad o *Cloud* de este. No obstante, un exceso de este compuesto en el zumo puede relacionarse con el empleo de inapropiadas técnicas de exprimido que den lugar una cantidad inaceptable de componentes del albedo en el zumo. Esto se visualizaría con la formación de pequeños precipitados de hesperidina al fondo del vaso.

Por otra parte, en cuanto a la citricultura de mesa, cuando los frutales sufren heladas en invierno, días después ocurre la formación de cristales característicos de hesperidina en las paredes de los gajos. Este defecto, denominado por los agricultores valencianos "*Llemenas*", por lo general va asociado a procesos de formación de sabores amargos en el fruto, aunque estos no son causados directamente por la hesperidina si no que los producen otro tipo de compuestos denominados limonoides.

Por otra parte, son numerosos los estudios científicos que describen las propiedades de la hesperidina en la prevención de determinadas enfermedades. Algunos autores como Lopes et al. (2013) apuntan a que flavanonas como la hesperidina podría estar detrás de los cambios favorables que se evidencian en marcadores de inflamación y los de factor de riesgo cardiovascular después de la ingesta de zumo de naranja. En este mismo campo de las enfermedades cardiovasculares Chanet et al. (2012), recopilan datos de varios estudios clínicos que evalúan la relación de la presión sanguínea con una la

ingesta de zumos enriquecidos con hesperidina o directamente de suplementos de hesperidina, resultando de ellos que tras días de ingesta la presión diastólica se veía reducida de forma significativa. Asimismo, estudios con animales (Bigoniya et al., 2014) apuntan al potencial efecto de la hesperidina en la prevención de úlceras en el tejido de la mucosa estomacal. Otros ensayos preclínicos, como los llevados a cabo por Tanaka et al. (2012) con animales, evidenciaron que la hesperidina contenida en la pulpa y zumo de mandarinas satsumas tenían un efecto inhibitor de la carcinogénesis en diversos tejidos. El aspecto en común de todos estos estudios, además de sus esperanzadores resultados relacionados con la prevención y/o tratamiento de determinadas enfermedades, es el objetivo compartido de encontrar nuevos agentes para tratar enfermedades, muy especialmente en el campo de los antiinflamatorios. Según Benavente-García et al. (2008) actualmente hay suficientes evidencias tanto en investigaciones *in vitro* como de ensayos clínicos para fomentar el empleo de flavonoides cítricos como la hesperidina y diosmina, como agentes antiinflamatorios, tanto por estar disponibles a un menor coste que otras drogas antiinflamatorias actuales, como también porque, según los autores, han demostrado una ausencia total de efectos secundarios e intolerancias.

Entre los actuales usos de la hesperidina, el más importantes de ellos es su aplicación en el sector farmacéutico, para la formulación de medicamentos que actúan como agentes venotónicos y vasoprotectores, es decir actuando sobre el sistema del retorno venoso, dando lugar a un aumento de resistencia de los vasos y disminución de su permeabilidad, produciendo en el corto plazo alivio para casos de piernas con varices y la hinchazón producida por las hemorroides. Algunos ejemplos de estas aplicaciones son los descritos por los medicamentos Daflon® o Diosmina Kern® 500mg, entre otros. Ambos medicamentos están formulados a base de 50 mg de hesperidina y 450 mg de diosmina. Directamente relacionado con este segundo flavonoide, se encuentra el principal uso industrial que desde hace décadas tiene la hesperidina, que es el de materia prima para la síntesis química de la Diosmina (5,7,3'trihidroxi 4'metoxiflavona, 7rutinosido) que ha resultado ser una molécula más activa que otros flavonoides como puede ser la propia hesperidina, por lo que, desde hace ya algunos años (Voigtländer, 1977) y todavía en la

actualidad, esta molécula es la más utilizada para combatir la permeabilidad capilar o como antihemorrágico. La diosmina se encuentra también en los cítricos, pero en muy baja cantidad, podría decirse que, en concentraciones insignificantes, por lo que la única fuente que dispone la industria farmacéutica para garantizar el suministro de esta sustancia es a través de su fabricación a partir de la hesperidina por procesos de oxidación con yodo o por dehidrogenaciones con dióxido de selenio (Voigtländer, 1977).

1.4. La industria de extracción de zumos cítricos.

1.4.1. Descripción de los procesos de extracción de zumos cítricos.

Tal y como se ha explicado en el apartado 1.1, en España el cultivo de la naranja y mandarina va destinado mayoritariamente al consumo en fresco destinándose entre un 10 y 20% del volumen producido a la fabricación de zumos. A nivel mundial existen dos tipos de industrias de zumos: la de los zumos directos o no procedentes de concentrado (también denominados NFC por sus siglas en inglés *Not From Concentrate* y la de los zumos concentrados. En España, la industria de transformación de naranjas y mandarinas para fabricación de zumos es mayormente del primer tipo, es decir, zumos directos que no van a concentrarse por lo que el proceso que se describirá en las próximas líneas corresponderá a esta categoría de producto.

El proceso industrial de fabricación de zumos cítricos en nuestro país va a estar muy condicionado por las características de la materia prima. El primer aspecto a destacar es el carácter multivarietal de la campaña española, lo cual va a suponer que la planta de transformación tenga que procesar alrededor de 15 variedades distintas de naranja y 25 de mandarinas a lo largo del año. Cada variedad va a tener unas características de calibre, grosor de piel y parámetros fisicoquímicos, lo que a su vez va a influir en etapas concretas del proceso de fabricación como la de calibración previa de la fruta o la configuración de los componentes de extracción de las máquinas exprimidoras. Asimismo, esta tipología de fruta dentro de la misma especie va a producir una gran variabilidad de parámetros fisicoquímicos y de los aspectos sensoriales en el producto obtenido a lo largo de la campaña, por lo que la industria deberá prever instalaciones

para almacenar y hacer mezclas con el fin de conseguir un zumo estandarizado que satisfaga los requisitos de mercado.

A su vez, cuando se habla de fabricación de zumos cítricos en nuestro país, hay que tener en cuenta que el origen de la fruta puede ser de dos tipos (Bombal et al.; 2011):

- Del almacén de confección de fruta: en este caso la fruta vendrá lavada y con tratamientos de postcosecha.
- Del campo: la fruta es recolectada directamente del árbol y transportado a la industria sin ningún tratamiento previo.

Finalmente, el transporte y recepción de la fruta va a verse afectado por el tipo de fruta de que se trate. Las naranjas pueden transportarse a granel sin inconveniente alguno pues sus características de dureza de la piel y consistencia del endocarpio le confieren unas propiedades excelentes para el transporte a granel a largas distancias. En el lado opuesto estarían las mandarinas del tipo *easy peelers*, es decir aquellas de fácil pelado a mano, como puede ser el subgrupo de las clementinas. Éstas, por su fragilidad y consistencia endeble, requieren que el transporte se realice necesariamente en cajones por lo que la industria deberá estar dotada de sistemas de volteado de cajones o box palets. De lo contrario, si esta operación se hace a granel, el producto sufre aplastamiento y agrietado llegando a la industria en condiciones sanitarias y de calidad no aptas para su transformación. A continuación, en la Figura 1.6 se describe el esquema de una planta de fabricación de zumo directo de naranja.

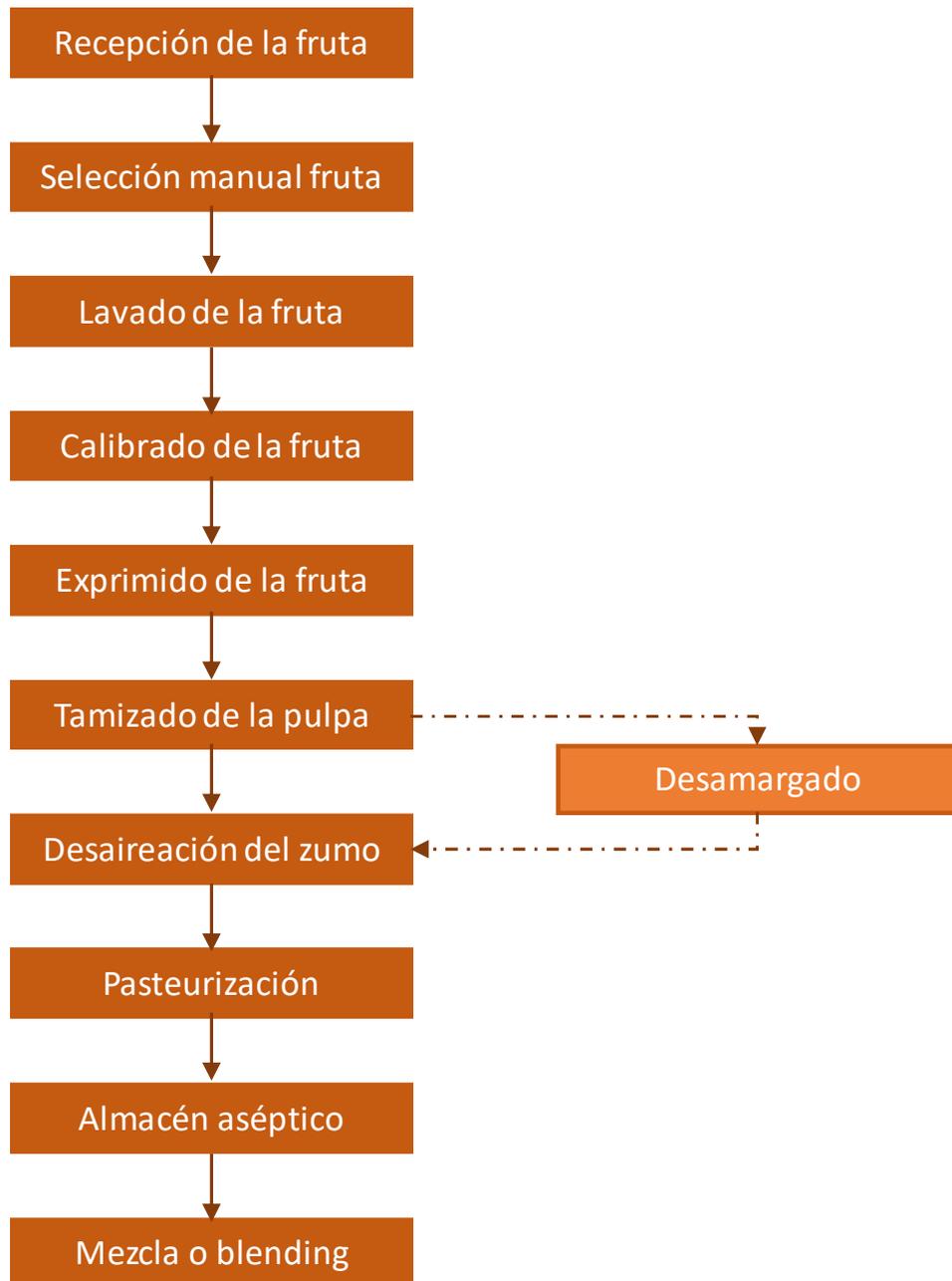


Figura 1.6. Diagrama de flujo del proceso de fabricación de zumos cítricos directos.

El procesado de los cítricos para la obtención del zumo comienza con la recepción de la fruta. Ésta se descarga en la zona de recepción de fruta de la de la industria. En esta zona, y previo a la operación de descarga, es donde la industria aplicará los controles de calidad para comprobar aspectos tales como estado sanitario de la fruta, los parámetros fisicoquímicos o el rendimiento en zumo de cada partida. Una vez realizados los controles se realiza de forma inmediata la descarga de la fruta. Si ésta llega a granel, la descarga se realiza mediante la inclinación del remolque con algún sistema hidráulico de elevación para descargar la fruta por la parte trasera del vehículo. La fruta, una vez cae por gravedad, puede hacerlo sobre un sistema de balsas que amortigüen la caída a la vez que realizan el primer tramo de transporte hasta llegar a las cintas transportadoras. En otras industrias, la fruta que se vacía del camión cae sobre unas tolvas que viertan la fruta directamente a una cinta transportadora. En ambos casos, la fruta se transporta a un silo. El silo no es un sistema de almacenamiento en sentido estricto, sino que hace una función de *buffer* o pulmón para garantizar la continuidad del proceso de exprimido y que éste no esté expuesto a posibles paradas en caso de retrasos logísticos en el aprovisionamiento de fruta. La fruta no debe permanecer almacenada en los silos más de 24 horas y hasta un máximo de 48 horas. De lo contrario la contrapartida sería doble; por un lado, la probabilidad de aparición de fruta dañada o enmohecida va a aumentar a medida que se prolongue el tiempo en el silo y por el otro, el rendimiento en zumo tras el exprimido va a disminuir a medida que los tiempos de almacenamiento en silo aumenten.

En el caso de las mandarinas éstas serán, por lo general, transportadas en cajas o box-palet de plástico y por ello esta fruta no necesitará almacenarse en silos, sino que los propios box o cajas se apilarán y harán de pulmón de almacenamiento. A la hora del procesado, la industria deberá estar provista de algún sistema de volteado de la fruta en las balsas de recepción que puede ir desde robots que voltean columnas enteras de box-palets con túnel de lavado de estos tras el vaciado, hasta sistemas más manuales consistentes en carretillas elevadoras con pala volteadora para vaciar el contenido de un box sobre la balsa.

La fruta puede tener distintos requisitos de tratamiento previo en función de si ésta viene directamente de la recolección en campo o si procede de la central hortofrutícola. La fruta que viene directamente de campo, con frecuencia lleva asociados elementos como hojas, ramas e incluso en ocasiones piedras. Escenario muy distinto es el de la fruta que procede de almacén donde es menos frecuente la presencia de cuerpos extraños, aunque no es descartable la presencia de restos de pallets, tacos de box, etc. Es por ello, que es conveniente que la instalación, tras la descarga de la fruta esté dotada de ruladas para eliminación de cuerpos extraños como piedras, hojas o terrones de tierra. En el proceso de preparación previa de la fruta, el elemento clave va a ser la mesa de selección manual o también denominadas mesa de *tría*. Esta etapa está ubicada normalmente a la salida del almacenamiento en silos y previo al lavado de la fruta y consiste en una rulada o cinta de transporte donde la fruta avanza a una velocidad adecuada para que una serie de operadores puedan eliminar manualmente cuerpos extraños que vinieran asociados a la fruta, así como aquellas piezas que pudieran presentar defectos de rotura o incluso enmohecimiento si se diera el caso. Es conveniente que las mesas de *tría* tengan una iluminación y altura adecuada para facilitar la operación de los trabajadores.

La siguiente etapa será el lavado de la fruta. La fruta de campo, con frecuencia, puede estar sucia siendo frecuente que presente una capa de polvo ambiental o incluso tierra. La fruta de almacén, por el contrario, suele estar lavada y limpia, pero, no obstante, presenta una capa de cera en su superficie que se aplica en las centrales hortofrutícolas para prolongar su vida útil que, de no ser eliminada, aunque sea parcialmente, quedaría pegada en las cintas de transporte. Por ello, el lavado de la fruta previo al exprimido es una etapa fundamental en el proceso de elaboración del zumo. Con este proceso se va a conseguir eliminar la suciedad y conseguir una reducción microbiana en la superficie de la fruta, a la vez que se va a eliminar parte de las ceras de almacén. Finalmente, un tercer objetivo de esta etapa es reducir el nivel de pesticidas, tanto de campo como de almacén, que pueda haber en la piel de la fruta. La etapa de lavado consiste en la aplicación de unas cortinas de agua a la fruta mientras ésta gira sobre unos potentes cepillos rotativos (Kimball, 2002). El agua suele estar clorada debidamente y las duchas

con frecuencia llevan asociada la aplicación de algún tipo de detergente neutro. Una consecuencia adicional del lavado va a ser el humedecimiento de la fruta que facilitará su transporte por las cintas previas al exprimido.

Tal y como se mencionaba al inicio de este apartado, la campaña citrícola española se constituye de numerosas variedades de naranja y mandarina, cada una de ellas con unas características particulares en cuanto a morfologías y tamaños. Asimismo, el hecho de que la industria se aprovisione de los destríos de la producción de fresco donde son descartados los calibres más pequeños y los más grandes, incrementan todavía más la variabilidad de calibres en la fruta utilizada para la transformación de zumos. Por ello, antes de proceder al exprimido es conveniente que la fruta sea separada en calibres diferenciados para poder adaptarla al tamaño de las copas de extracción de las máquinas exprimidoras. Esta operación se realizará en máquinas calibradoras donde un sistema de rodillos con separaciones ajustables clasifica la fruta. A continuación, la fruta clasificada se dirige por tamaños a través de una cinta de transporte a las bandejas de alimentación de las extractoras correspondientes.

En la industria española de zumos cítricos la tecnología de exprimido que se ha impuesto es el sistema *in-line* (Figura 1.7). En otras regiones del mundo como los Estados Unidos, se puede encontrar el sistema *Brown* de piña y alveolo, aunque éste es prácticamente inexistente en el continente europeo a nivel industrial por lo que centraremos este apartado en las exprimidoras tipo *in-line* de sistema de doble copa.

Las exprimidoras de zumo tipo *in-line* constan, en función de la capacidad requerida, de entre tres y ocho cabezales, cada uno formado por pares de copas, una inferior y otra superior (Figura 1.8). La fruta se coloca en la copa inferior de manera que la superior baja, ejerce presión sobre el fruto produciéndose el exprimido. Las copas presentan un orificio cada una en la parte central; en éste un anillo cortante, denominado *cortador*, practica un orificio de 2,5 cm en la parte inferior y superior



Figura 1.7. Extractor de zumos cítricos EXCEL (<https://www.bucherexzel.com/>; 2020).

De esta manera, durante el exprimido, la parte interior de la fruta se fuerza a través del orificio inferior hasta el tubo perforado denominado *tubo filtro*, tal cómo se observa en la Figura 1.8. Este tubo filtro perforado se estrecha en su parte inferior generando presión sobre la parte pulposa de la fruta que ha entrado en el mismo y produce la salida del zumo a través de los orificios del tubo y cual es recogido en el colector de zumo (Kimball, 2002).

Desde el punto de vista de la calidad del zumo, una de las claves del éxito de los sistemas de extracción *in-line* consiste en la rápida separación del zumo de los otros componentes de la fruta, concretamente membranas, corteza y semillas. De no ser así, determinados compuestos como son limonoides asociados a las membranas y semilla o los terpenos de la corteza, podrían migrar al zumo alterando negativamente sus propiedades sensoriales, dando lugar a pérdida de frescura y presencia de notas amargas entre otros defectos sensoriales (Bombal et al., 2011). Por ello, la operación de exprimido transcurre

a alta velocidad, pudiendo una máquina exprimidora *in-line* dar un total de 100 golpes por minuto, rindiendo una capacidad nominal de exprimido de 3.500 kg/h.

Para que los extractores de tipo *in-line* funcionen de forma óptima es importante el correcto calibrado de la fruta y su clasificado para que cada tamaño de fruta se ajuste a la copa que tenga las dimensiones adecuadas. De no hacerse bien, si la fruta es demasiado grande, la copa superior troceará la fruta en lugar de exprimirla, y de lo contrario, si es demasiado pequeña se romperá en lugar de exprimirla penalizando tanto la calidad del zumo como el rendimiento obtenido.

El zumo que sale de las extractoras lleva consigo las celdillas o pulpa flotante formada por las vesículas que almacenaban al zumo antes del exprimido del fruto. Estas celdillas deben separarse del zumo, para lo cual se utilizan los equipos *finisher* o afinadores. El *finisher* es un sistema de tamizado por el cual se pasa el zumo empujado por unas palas (existe también de tornillo) y se le hace atravesar los orificios de una malla de acero perforada produciéndose aquí la separación de la pulpa flotante del zumo.

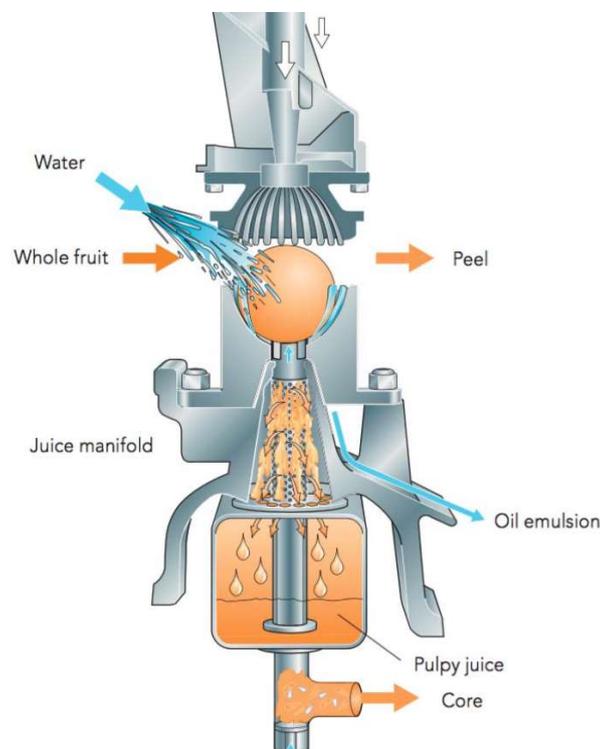


Figura 1.8. Detalle de las copas de extracción y del exprimido del fruto en el sistema *in-line* (Tetra Pak, 2017).

En las sucesivas operaciones mecánicas del proceso, especialmente el exprimido y el tamizado, el aire entra en contacto con el zumo, de manera que el zumo que llega a los pasteurizadores está normalmente saturado de oxígeno disuelto. Durante el almacenamiento aséptico del zumo, el oxígeno disuelto y las posibles burbujas de aire pueden destruir una cantidad importante de la vitamina C disponible por oxidación. Por ello, es recomendable incluir una etapa de desaireación previa al proceso de pasteurización cuando se produce zumo directo. La desaireación consiste básicamente en hacer pasar el zumo por una cámara de vacío, allí, las burbujas de aire libre expanden y salen fácilmente del zumo. De esta manera se consigue reducir el contenido de oxígeno disuelto de entre 8 – 9 mg/L a tan sólo 1 mg/L en el zumo pasteurizado garantizando así sus propiedades organolépticas de sabor, pero sobre todo de color, así como su contenido en Vitamina C durante el periodo de almacenamiento aséptico (Tetra Pak, 2017).

En el procesado de zumos cítricos el tratamiento de pasteurización persigue un doble objetivo, el primero de ellos es la inactivación de enzimas causantes de la clarificación del zumo, considerado un defecto de calidad según los actuales estándares de mercado, y el segundo, asegurar la estabilidad microbiana durante la vida útil del zumo. Los pasteurizadores pueden ser de dos tipos, de placas o tubulares y la elección de uno u otro sistema va a depender del contenido de fibras. Cuando el zumo presente un nivel de fibras elevado, como es el caso de los zumos cítricos, es recomendable el pasteurizador tubular.

Los valores de tratamiento térmico que utiliza la industria oscilan entre los 70 y 98 °C durante 30-15 segundos. Algunos organismos reguladores como la FDA, incluso fijan los tratamientos térmicos mínimos que debe aplicar la industria de zumos para garantizar la seguridad alimentaria de los zumos pasteurizados, estableciendo que el tratamiento térmico mínimo debe ser de 71,1 °C durante 3 segundos con el fin de conseguir una reducción de 5-log (es decir 100.000 ufc/ml) de microorganismos patógenos en el zumo, basándose en los estudios publicados por Mazzotta (2001). Con cualquiera de estas combinaciones de tiempo y temperatura, la estabilidad microbiana va a estar por lo general garantizada pero no así la enzimática. Si lo que se desea es además garantizar la

materia opaca y la viscosidad para tener siempre un zumo con cuerpo y visualmente opaco, hay que inactivar la enzima *pectin metil esterasa* (PME). Para ello las temperaturas mínimas de tratamiento térmico han de ser considerablemente superiores a los 70 °C mencionados anteriormente, dado que la PME presenta una resistencia térmica muy superior a la de las células vegetativas tal y como se aprecia en la Figura 1.9. En este caso, habrá que asegurar un tratamiento térmico entre 95 y 98 °C durante 10 – 30 segundos (Tetra Pak, 2017).

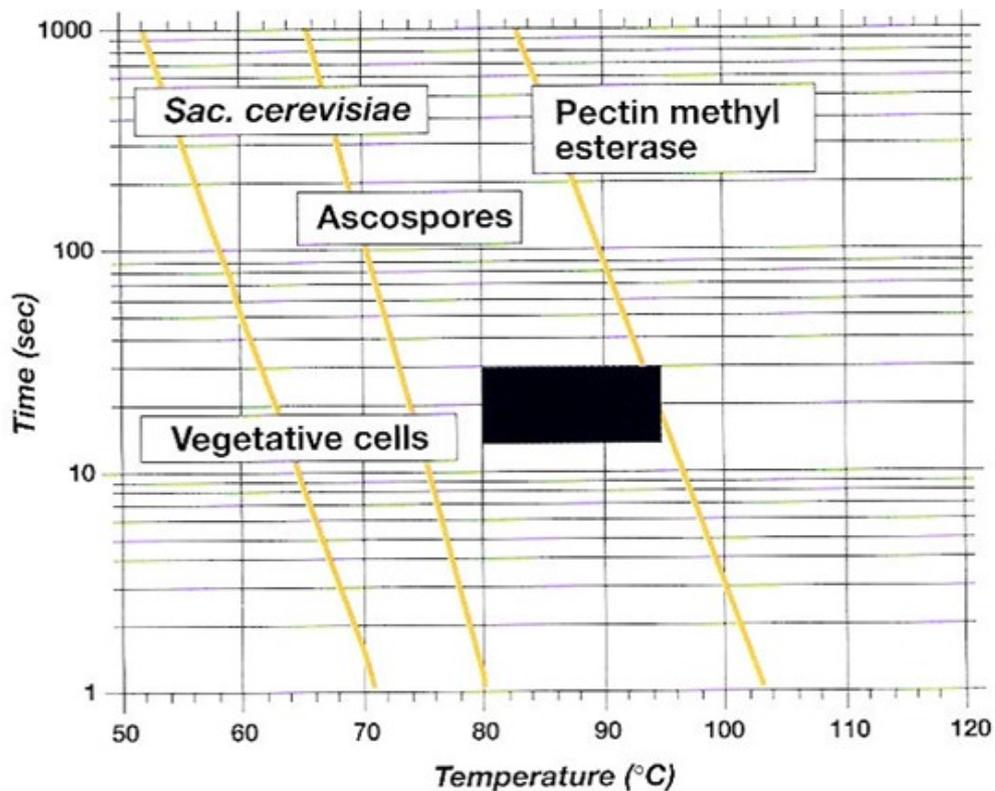


Figura 1.9. Curvas de destrucción térmica de pectin metil esterasa, ascosporas y células vegetativas.

Tras el tratamiento térmico, en la industria de fabricación de zumos cítricos directos o *NFC*, es frecuente que éstos se almacenen en tanques asépticos. Los tanques asépticos pueden ser de varios tipos, desde tanques de acero inoxidable con un rango de capacidades de 50 a 500 m³, hasta macrotanques asépticos con capacidades de hasta 6.000 m³ fabricados con acero al carbono a los que se les aplica un recubrimiento epoxi

especial en su superficie interior. Estos tanques son esterilizados con alguna solución desinfectante como el ácido peracético para, a continuación, ser llenados con el zumo aséptico que sale del proceso de pasteurización. Las temperaturas de almacenamiento de estos tanques están alrededor de los 0 y 2 °C y a su vez se suelen presurizar con nitrógeno manteniendo una sobrepresión de este gas inerte en el espacio de cabeza del tanque para minimizar los fenómenos de oxidación y pérdida de vitamina C durante el almacenamiento. Otra opción de almacenamiento aséptico alternativo a los tanques es el almacenamiento del zumo en bolsas asépticas de 1.000 L dentro de un contenedor tipo bin. Los bins sobre los que descansa la bolsa aséptica pueden ser de infinidad de materiales: plástico con forma cúbica, cartón cúbico, cartón en forma de octobin, etc. Estos bins se almacenarán también en condiciones de refrigeración. Para el almacenamiento durante largos periodos de tiempo (superiores a 6 meses) es recomendable emplear bolsas asépticas de polietileno que tengan alta barrera al oxígeno. Por lo general este tipo de bolsas consiguen la alta barrera incluyendo entre sus múltiples capas una lámina de algún polímero impermeable al oxígeno como es el EVOH.

Las fábricas de procesado de cítricos para fabricación de zumos van a destinar su producto a las plantas envasadoras que embotellan el producto, bien para las marcas privadas o bien para las marcas de la distribución. Estas plantas de embotellado lo único que van a hacer es un acondicionado leve del zumo, mezclando con otros tipos de zumo e incluyendo fibras o vitaminas o restituyendo aromas naturales que se hayan podido perder en los procesos de transformación, para volver a pasteurizarlo y finalmente envasarlo principalmente en brik de cartón, botella de PET o de vidrio. Estos envases van dirigidos al consumidor final, por lo que los estándares de mercado requieren que el zumo tenga un perfil sensorial constante y más o menos lineal a lo largo del año. Por ello, dada la gran variabilidad varietal que tiene la campaña citrícola española, es necesario que las fábricas que exprimen la fruta dispongan de sistemas de mezclado para garantizar un zumo estándar antes de ser expedido a la planta de envasado. Las instalaciones de mezclado o *blending*, no es otra cosa que tanques de acero inoxidable, generalmente provistos con camisa de glicol para mantener la temperatura del producto

siempre por debajo de 4 °C y dotados de agitadores. En estos tanques, que estarán ubicados antes del punto de expedición del zumo en la cisterna, la industria exporta el zumo de distintos tanques o bins asépticos, cada uno de ellos de una variedad o momento concreto de la campaña. A continuación, lo somete a una agitación suave durante un periodo superior a 15 - 30 minutos y de esta manera, el zumo estandarizado puede finalmente ser exportado a la cisterna para abastecer las plantas de envasado donde en última instancia el zumo volverá a ser desaireado y pasteurizado. En el caso en que la planta de envasado esté vinculada a la propia industria de exprimido, de los tanques de mezcla se puede bombear directamente el zumo a la sala de embotellado.

1.4.2. Coproductos asociados a los procesos de extracción de zumos cítricos.

Según la base de datos de variedades de cítricos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), las variedades de naranja y mandarina que se cultivan en España tienen un contenido de zumo que oscila entre 45% y 58% en función de la variedad. Por tanto, el proceso de transformación de los frutos cítricos para obtención de zumos genera una cantidad de biomasa sólida, en torno al 50% (w/w) del peso del fruto, con un contenido en humedad superior al 85% (w/w) característica que la hace altamente deteriorable debido a los rápidos procesos de alteración microbiana que sufre si no se estabiliza inmediatamente tras el procesado.

Tradicionalmente, la corteza de cítricos resultante tras el exprimido del zumo se utilizaba en fresco para la alimentación animal, principalmente destinado a especies ganaderas de rumiantes. No obstante, esta práctica llevaba asociados dos problemas de consideración para la industria. Por un lado, la corteza y el resto de biomasa sólida son productos rápidamente alterables debido a la acción de microorganismos alterables, por lo que debían ser retirados de forma inmediata por los ganaderos para evitar putrefacciones, contaminaciones y riesgos de plagas en la industria. Por otro lado, la corteza genera una gran cantidad de lixiviados lo cual dificulta el almacenamiento o creación de zonas de transferencia debido al impacto ambiental de este vertido por su alta carga orgánica contaminante del medio acuoso.

El incremento del volumen de fruta a procesar que ha registrado la industria de zumos en España ha llegado a situarse en la zona próxima al millón de toneladas año en las últimas décadas según datos del CGC (2017). Esto hace imposible que la ganadería local próxima a los grandes centros de transformación de zumos pueda asumir tales volúmenes, sobre todo teniendo en cuenta que éstos no se distribuyen a lo largo del año si no que hay una fuerte estacionalidad en el sector cítrico, centrándose la generación de la mayor parte de estos residuos en los meses de invierno.

Por esto, la industria de zumos cítricos ha tenido que implementar nuevos procesos para transformación de la biomasa sobrante del exprimido de los frutos cítricos, con el doble fin de reducir su impacto medioambiental y de mejorar la cuenta de resultados a través de la comercialización de los coproductos obtenidos, en lo que ha venido a denominarse en los últimos tiempos *Modelos de Economía Circular de la Industria Agroalimentaria* (Martínez-Navarrete *et al.*, 2019).

Los frutos cítricos están compuestos por las distintas partes que se describen en la Figura 1.10.

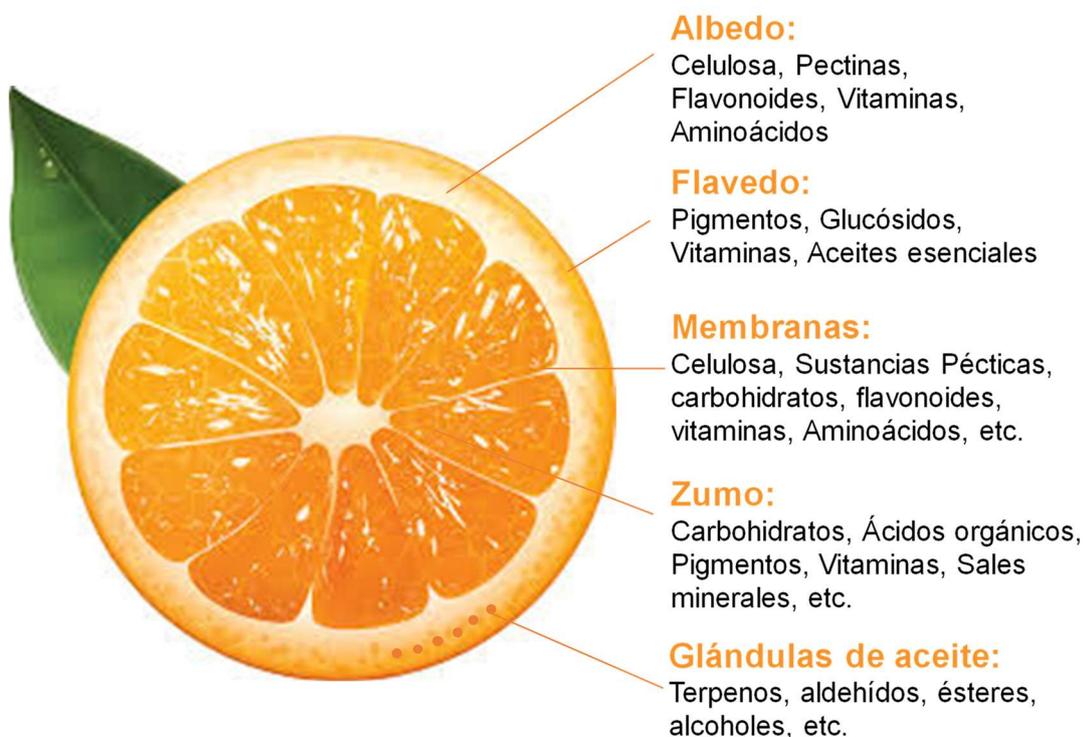


Figura 1.10. Principales partes de los frutos cítricos y su composición mayoritaria (López, 1995)

Desde el punto de vista de su transformación industrial, tras el exprimido, la parte de biomasa sólida restante viene a suponer entre el 48-57,5 % w/w de la fruta, que a su vez se puede dividir en los siguientes dos grandes bloques: el de la corteza o piel (40,7 – 49% w/w) y el de la pulpa (2,6 -6,6% w/w) (Primo et al., 1972).

En la actualidad, en mayor o menor grado, la industria española de zumos cítricos tiene implementados procesos para la valorización de toda o una parte de la biomasa sólida restante tras la operación de exprimido del zumo. A continuación, se detallan algunos de los procesos de valorización más habitualmente extendidos en el sector y que a su vez se resumen en el esquema de la Figura 1.11.

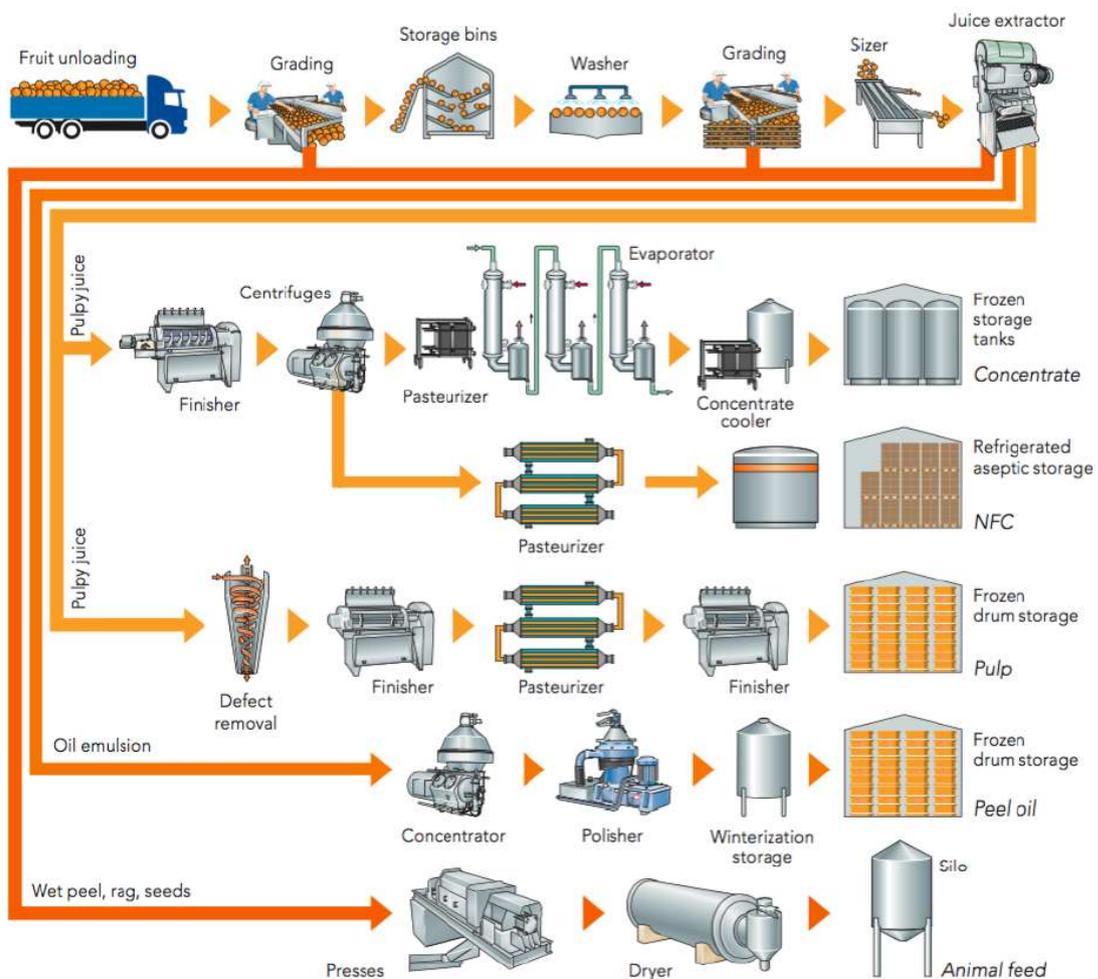


Figura 1.11. Diagrama de producción de zumos cítricos con aprovechamiento de coproductos (Tetra Pak, 2017).

a) Recuperación de aceites esenciales por prensado en frío.

Las glándulas oleíferas del flavedo de la corteza son ricas en lo que se viene a denominar *aceites esenciales de cítricos*, que son una mezcla de terpenos (entre ellos el principal es el *d-limoneno*), compuestos oxigenados (como aldehídos, cetonas, ésteres y alcoholes) y cierta cantidad de compuestos no volátiles (ceras y parafinas). Los aceites esenciales de cítricos son ampliamente utilizados tanto en alimentación, como en la industria química y cosmética, por lo que cada vez con más frecuencia la industria de zumos ha ido implementando procesos para su recuperación tras la operación de exprimido de los frutos, iniciándose el proceso de recuperación en la misma exprimidora industrial.

En esencia el proceso de recuperación de los aceites esenciales consiste en una compresión o raspado inicial de la corteza tras el exprimido, que permite la liberación del aceite de las glándulas del flavedo. Acto seguido este líquido obtenido de la corteza es lavado mediante aspersion con agua formándose una emulsión de agua y aceites esenciales que a su vez arrastrará otros fragmentos sólidos de la corteza como compuestos pécticos, celulosas, etc. A continuación, esta emulsión inicial también denominada emulsión pobre, se lleva a algún equipo de filtración, tipo afinador o *finisher*, para eliminar los fragmentos sólidos. La emulsión es ahora conducida a una centrífuga deslodadora, a velocidades del orden de 8.000 rpm, donde se separarán los lodos, que son fragmentos sólidos de la corteza de los cítricos, y una corriente denominada fase pesada que básicamente está constituida por el agua que llevaba la emulsión original. La corriente obtenida de esta etapa de centrifugación se denomina emulsión rica y viene a tener un contenido de aceite esencial superior al 90%. La emulsión rica se suele someter a un segundo tratamiento de centrifugación en pulidoras (~16.000 rpm) donde se le elimina la fase pesada que en su mayoría es agua y como resultado se obtiene el aceite pulido. En ocasiones, este aceite pulido se almacena a temperaturas de congelación durante 30 o más días en lo que se conoce como etapa de *Winterización* para favorecer la precipitación de las ceras disueltas y obtener un aceite con un mayor grado de transparencia y brillo (Kimball, 2002).

b) Obtención de aceites destilados al vapor.

La corriente de agua denominada fase pesada obtenida tras la primera etapa de centrifugación del proceso descrito en el apartado anterior, contiene cierta cantidad de aceite residual (entre 0,5 – 1%) y, en ocasiones, en lugar de ser enviado directamente a la planta de tratamiento de aguas residuales, es separado utilizando equipos de destilación para la recuperación del aceite residual. Estos equipos de recuperación lo que hacen es calentar la corriente de aguas amarillas o fase pesada hasta evaporar una mezcla de vapor de agua y d-limoneno en cámaras de evaporación *flash* o rápidas. Seguidamente el vapor es condensado y tras una decantación de este condensado se recupera la fracción terpénica que hay en ella. Algunos diseños más eficientes eliminan los efectos tipo *flash* e incorporan columnas de fraccionamiento que van enriqueciendo en d-limoneno el vapor a lo largo de su ascenso (Tetra Pak, 2017).

c) Recuperación de celdillas o pulpa

Las celdillas o pulpa flotante, es el material membranoso principalmente formado por los sáculos que contenían el zumo en el fruto y que se separan en los afinadores o *finisher* tras el exprimido. En la pulpa flotante encontramos también fragmentos de las membranas de los segmentos.

En un pasado próximo, la industria de transformación española destinaba mayormente esta pulpa para alimentación animal sin obtener apenas rendimiento económico por este producto. Sin embargo, las nuevas tendencias del mercado van en la dirección de ofrecer al consumidor zumo final con cierto contenido de pulpa flotante y, cada vez más, esta cantidad de pulpa aumenta en las referencias de mercado. Con esto se consigue conferirle mayor naturalidad sensorial al producto final, a la vez que se mejoran las propiedades nutricionales del mismo al incrementar el contenido de fibra. Esta tendencia ha llevado cada vez más a los transformadores a recuperar la pulpa de los *finisher* tras el proceso de exprimido para tales usos comerciales en el propio sector de los zumos.

Durante el proceso de exprimido de la fruta, tanto los segmentos como los sáculos se rompen en trozos pequeños debido a la acción mecánica de los componentes de extracción de las exprimidoras industriales. Por ello, cuando la industria va a recuperar este producto, los componentes de extracción utilizados deben tener el diseño adecuado para que la fuerza de cizalla aplicada a la pulpa sea menor y ésta resulte más íntegra y con un tamaño de fibra mayor.

No obstante, algunos defectos como la presencia de semillas o fragmentos de albedo y flavedo, con frecuencia, van a pasar a la pulpa recuperada durante el proceso de exprimido. La ausencia de defectos en el producto final es un importante parámetro de calidad por lo que se tienen que eliminar de la corriente de zumo y pulpa. Por ello, es necesario dotar a la instalación de equipos de eliminación de defectos, el primero de los cuales va a consistir en una serie de ciclones para tratar la corriente de zumo pulposo que sale de la exprimidora. El funcionamiento de los hidrociclones está basado en una separación por gravedad y elimina los defectos que tienen mayor densidad que la pulpa. En la Figura 1.12 se muestra el comportamiento de las corrientes líquidas y los sólidos dentro del ciclón. La corriente de alimentación se introduce tangencialmente en el cono y se mueve hacia abajo con un movimiento vorticial sobre la pared del ciclón. Parte del líquido saldrá por la salida inferior del cono arrastrando consigo las partículas de mayor densidad como son los defectos, y el resto del fluido cambia la dirección y se dirige hacia la parte superior del ciclón, esto es lo que se denomina la corriente limpia del zumo pulposo (Tetra Pak, 2017). A continuación, la corriente de zumo pulposo pasa a un *finisher* o equipo afinador que a su vez puede ser de palas o de tornillo, donde se separa la pulpa del zumo teniendo como resultado de esta etapa una corriente de salida de zumo sin pulpa flotante y otra corriente con la pulpa concentrada que arrastra consigo apenas un 10 – 20% de zumo.

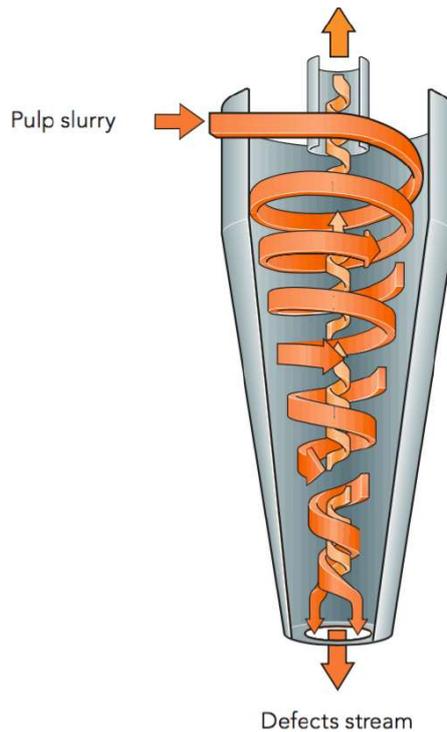


Figura 1.12. Funcionamiento del ciclón para eliminación de defectos en pulpa. (Tetra Pak, 2017)

Algunas plantas incluyen una segunda etapa de eliminación de defectos a la corriente de pulpa concentrada mediante tecnologías de visión artificial, lo cual permite eliminar pequeños defectos de menor densidad como son las semillas embrionarias de menor tamaño o fragmentos de la corteza pequeños.

Finalmente, la corriente de pulpa o celdillas concentrada debe estabilizarse microbiológica y enzimáticamente. El tratamiento térmico que se le dé a la pulpa va a depender de la aplicación que se le vaya a dar finalmente a ésta y las condiciones de almacenamiento previstas. Cuando la pulpa vaya a almacenarse de forma no aséptica y en congelación, no es necesario garantizar la destrucción de todos los microorganismos por lo que se suele dar un tratamiento de “estabilización” consistente en 90-100 °C durante 30 segundos. Si la pulpa va a almacenarse en refrigeración dentro de contenedores asépticos, en estos casos, se suele hablar de “esterilización” de la pulpa y el tratamiento es algo más intenso, siendo habitual superar los 100 °C.

d) Corteza deshidratada para alimentación animal.

Las industrias de zumo con mayores volúmenes de producción, con frecuencia disponen de instalaciones de deshidratación de la corteza con el fin de estabilizar la parte de fruta no aprovechable para alimentación humana y reducir su volumen para aumentar así la capacidad de almacenamiento de la misma. De esta manera se evita depender de la retirada de la corteza fresca en tiempo real por parte del sector ganadero, lo cual, en caso de no estar garantizado en un determinado momento, obligaría a parar la actividad de exprimido de la industria.

La corteza de cítrico deshidratada se destina a la alimentación de especies ganaderas de rumiantes, principalmente ganado vacuno y ovino de leche y carne. En las instalaciones de secado, el primer paso es el prensado de la corteza para eliminarle alrededor de un 10-12% de agua por efecto mecánico. Para facilitar esta reducción de agua por prensado, con frecuencia se alcaliniza la corteza añadiéndole entre un 0,15 y 0,25 de cal 15 minutos antes del prensado. La cal produce la desmetoxilación de las pectinas de la corteza reduciendo la viscosidad de esta y facilitando en consecuencia la eliminación de agua.

De la etapa de prensado se obtendrán dos caudales: la torta prensada y el licor de prensado. La torta prensada servirá para alimentar el secador y los licores de prensado se mandarán a un evaporador de energía residual (o WHE de *Waste Heat Evaporator*) para ser transformado en melazas. El equipo WHE consiste en un evaporador cuya característica fundamental es que el calor necesario para iniciar la concentración se obtiene de los gases parcialmente saturados de vapor de agua, procedentes del secador de cortezas. Ello permite concentrar los licores de prensado prácticamente sin consumo de vapor. La concentración de licor de prensa que se obtiene en el equipo WHE se denomina melazas cítricas y suele tener una concentración de entre 40 y 50 °Brix. Esta melaza, se reincorporará a la torta prensada, confiriéndole al pienso final un mayor valor energético y aumentando la palatabilidad por el ganado al que va destinado.

Finalmente, la corriente de torta prensada junto a la melaza concentrada se deshidrata en un secador rotativo o trómel y se enfría. Dada la gran cantidad de finos que tiene la corteza deshidratada y su baja densidad aparente, con frecuencia la corteza es

transformada en gránulos o pellets con lo cual se gana densidad y se elimina o reduce al máximo la fracción de polvo que, a su vez, es un impedimento para que resulte atractivo como alimento para especies ganaderas como el ovino.

1.4.3. Corrientes líquidas de biomasa potencialmente valorizables.

Tanto en el proceso industrial del exprimido de frutos cítricos como en los procesos de recuperación de subproductos asociados, se van a generar una serie de corrientes líquidas intermedias o de vertido que, por su composición química, pueden tener interés para el estudio de opciones de valorización de su carga en flavonoides. Tales corrientes son principalmente las tres que se describen a continuación:

✓ ***Vertidos de los procesos de limpieza industriales mediante ciclos de C.I.P.:***

Dadas las características del proceso de extracción de zumos en el que el producto se mantiene continuamente en el interior de tuberías sin existir contacto con el exterior, la limpieza de mayor importancia que tiene lugar en este tipo de industria es la del interior de elementos como tuberías, bombas, intercambiadores y depósitos. Los sistemas de limpieza de interiores se denominan C.I.P. Esta palabra proviene de las siglas en inglés de "*Clean in Place*" y su traducción sería "*Limpieza in situ*". Son sistemas automáticos que realizan la limpieza de toda la instalación partiendo de los tanques de limpiantes que poseen. Los procesos C.I.P. en una industria como la de zumos, en que el producto tiene pH ácido, constan de 3 etapas diferenciadas:

- a) Fase de aclarado con agua fría:** Su función es retirar los restos de producto que hayan quedado impregnando la tubería. Por lo general, el agua resultante de este aclarado inicial suele ir a vertido.

- b) Fase de limpieza básica:** En ella se aprovecha el poder limpiante de la sosa caliente (>75 °C). A este poder se añade el efecto mecánico producido por unos caudales elevados que generan un flujo turbulento en las tuberías y con ello dicho efecto. Su misión es la de eliminar los restos de suciedad que hayan podido quedar adheridos en las paredes y preparar la instalación para el proceso de

esterilización. La sosa utilizada posee aditivos con objeto de rebajar su tensión superficial y mejorar el poder humectante de la misma.

- c) **Fase de aclarado de sosa:** Se pasa agua para eliminar los restos de sosa de la instalación y, si la instalación pertenece a un proceso aséptico, se deja preparada para su esterilización. Esta etapa va a durar hasta que deje de detectarse restos de detergente en el agua de aclarado. Las comprobaciones de ausencia de desinfectante son generalmente automáticas (instrumentación dotada de sondas de conductividad), aunque suele ir además acompañada de una comprobación por parte de los operarios también del pH. El agua de esta fase por lo general no se suele verter si no que se recupera en un depósito para ser utilizado como agua de la fase de aclarado inicial en el próximo ciclo de limpieza C.I.P.

Por tanto, del proceso de limpieza C.I.P. va a generar vertido solamente de la primera etapa de aclarado inicial con agua. De la caracterización de esta agua se confirma que está altamente diluida, tiene $< 0,5$ °Brix, carga orgánica media (10.000 mg/L DQO) y en cuanto al contenido en flavonoides no llega siquiera a 50 mg/L de hesperidina. Estos niveles de flavonoides hacen el vertido no viable para platear técnicas de recuperación de este tipo de compuestos bioactivos que pueda ser rentable.

- ✓ ***Vertidos de regeneración de las resinas de adsorción empleadas en los procesos de desamargado del zumo.***

Un gran obstáculo que presenta la industrialización de naranjas del grupo varietal Navel, es el desarrollo de sabores amargos en sus zumos. El principal responsable del sabor amargo desarrollado en los zumos cítricos es la *limonina*. Los zumos procedentes de las naranjas del grupo Navel tienen un sabor agradable tras el exprimido, pero amargan horas después de su extracción o, incluso, de forma inmediata si el zumo es sometido a un tratamiento de pasterización como suele ocurrir en la industria de transformación.

El amargor propio que confiere la limonina supone una dificultad a la hora de procesar naranjas del grupo Navel, puesto que tiene poca aceptación por los consumidores. Un

zumos de naranja que presente notas amargas no tiene aceptación comercial lo cual es un problema para el sector de los zumos. Por ello, la industria ha tenido que implementar soluciones técnicas para eliminar los compuestos amargos del zumo.

Lo que se ha implantado en la industria, de forma general, para dar solución a la formación de limonina en el zumo es el empleo de tratamientos con resinas adsorbentes. Estas resinas son muy selectivas y eliminan físicamente la limonina del zumo. El lecho de resinas está formado por gránulos de muy pequeño tamaño hechos a partir de polímeros como el poliéster o divinilbenzeno, que tienen gran cantidad de microporos para aumentar su superficie de contacto. Estas resinas eliminan selectivamente la limonina del zumo sin modificar otros constituyentes naturales del mismo, mejorando considerablemente la calidad de los mismos.

Después de cada ciclo de trabajo con resinas, éstas se saturan por lo que es necesario proceder a una limpieza de regeneración. La regeneración de las resinas consiste en realizarle lavados con soluciones alcalinas (generalmente NaOH al 2%) enjuagados con agua abundante. Estos procesos de regeneración de resinas adsorbentes dan lugar a un vertido considerable, que si bien es en continuo, tiene tres etapas diferenciadas: un primer enjuague con agua que elimina restos groseros de fibras y sólidos solubles que hayan quedado retenidos entre las partículas de la resina, una segunda etapa de vertido alcalina que eliminará todos los compuestos que hayan quedado retenidos en las posiciones adsorbentes de los poros de las resinas y, finalmente, una fase de vertido de agua con el objetivo de neutralizar la solución acuosa en la que queda sumergido en estado de conservación el lecho de resinas.

De la caracterización de este vertido se concluye que la parte central del mismo, cuando se inicia la fase alcalina tiene una carga orgánica elevada próxima a los 10.000 mg/L de DQO lo cual es lógico puesto que, es en esta fase cuando se eliminan de las posiciones adsorbentes del poro de la resina las sustancias retenidas, entre las cuales se incluyen compuestos limonoides y flavonoides llegando a ser el contenido de hesperidina puntual de 1.000 mg/L. No obstante, hay que considerar el vertido de este proceso industrial en su totalidad y, al hacerlo se comprueba la carga orgánica de todo el vertido

homogeneizado es de entre 3.000 – 40.000 mg/L de DQO y el contenido de hesperidina del conjunto del vertido es inferior a los 400 mg/L. Por tanto, si bien, la parte central del vertido de regeneración es interesante por su carga flavónica, el volumen de esta fracción del vertido es demasiado reducido por lo que quizá haya otras corrientes o fuentes de flavonoides más interesantes en esta industria a la hora de hacer una inversión industrial.

✓ ***Licor de prensado resultante del proceso de deshidratación de la corteza.***

En el último punto de apartado 1.4.2. de esta introducción se explica el proceso de deshidratación de la corteza para obtención de pellets como fuente de fibra para alimentación animal. En éste, se explicaba que una etapa intermedia de este proceso es el prensado de la corteza para eliminarle alrededor de un 10-12% de agua por efecto mecánico. Como resultado de este prensado se extrae un jugo de corteza que se denomina licor de prensado. Este licor de prensado, que actualmente, previa concentración, se incorpora a la torta prensada obtenida de la corteza, va a tener unas características en cuanto a composición química como para valorar su potencial propio para aprovechar determinados compuestos que puedan contener, entre ellos flavonoides. Esta corriente de elevada carga orgánica presenta un contenido en terpenos elevado, siendo el valor de d-limoneno próximo a los 2.000 mg/L, y la carga en hesperidina va a rondar los 1.000 mg/L. Además, si se analizan los flujos de materia de la industria de zumos y sus coproductos en su totalidad, la corriente de licor de prensado va a suponer un volumen de entre el 6% y el 7% de la fruta que entra al proceso de exprimido, lo cual representa una cantidad de biomásas muy considerable. Este gran volumen de materia junto con la riqueza en compuestos orgánicos de interés como son flavonoides o terpenos convierten esta corriente en muy interesante para el estudio de procesos de recuperación de compuestos de valor añadido.

1.4.4. Corrientes sólidas de biomasa potencialmente valorizables.

Tras el exprimido de frutos cítricos se van a generar dos corrientes sólidas biomasa, la de la corteza (albedo y flavedo) y la de la pulpa o celdilla que se describen a continuación:

✓ **Corteza.**

Se trata de la principal corriente sólida de biomasa que resulta del proceso de exprimido suponiendo alrededor del 55% de la fruta que entra al proceso. Está compuesta principalmente por el albedo y flavedo que conforman la cáscara o corteza del fruto, pero también tienen una parte considerable de los segmentos o membranas. Esta corriente presenta un contenido de agua muy elevado, del $87\pm 2\%$. El siguiente nutriente en cantidad son los hidratos de carbono, que van a suponer un $9\pm 1\%$ de los cuales el 8% son azúcares. Los constituyentes que siguen en importancia son la proteína (0,6%) y la fibra dietética total (0,5%), la cual va a estar constituida principalmente por celulosa, aunque cabe destacar en este apartado el alto contenido en sustancias pécticas, siendo la concentración de pectinas totales de unos 900 mg/kg. Asimismo, el albedo es la parte del fruto que mayor concentración de flavonoides va a presentar y muy particularmente de la flavanona hesperidina pues la concentración media de este compuesto es de unos 6.000 mg/kg.

Actualmente, la industria de transformación de cítricos para obtención de zumos destina las cortezas, bien en fresco o bien deshidratadas, a la alimentación animal, obteniendo escasos rendimientos económicos por esta fuente de biomasa. La importancia en volumen de éstas y el alto contenido de nutrientes de interés, fibras, pero sobre todo compuestos bioactivos como la hesperidina, hacen de este subproducto una corriente muy interesante para el estudio de otras oportunidades de valorización de mayor rentabilidad con respecto a las que usualmente tienen lugar en la industria.

✓ **Celdillas.**

La siguiente corriente sólida en importancia que se genera en la industria de zumos cítricos tras el exprimido es la de las celdillas. Ésta se genera en los equipos *finisher* tras

la operación de separación de la pulpa flotante del zumo y viene a suponer entre el 7±2% del peso de la fruta que entra en el proceso industrial y su composición tal y como se describe en el apartado 1.4.2. es básicamente material membranoso del endocarpio junto con una proporción de zumo intersticial que puede suponer entre un mínimo del 5% y un máximo del 20% en función de la presión y velocidad de estrujado que ejerza el equipo *finisher*. En cuanto a sus principales componentes el más abundante es el agua con un 86±2% y le siguen los azúcares con un 8,5±1%, motivo por el cual en algunas industrias de otras regiones del mundo se les realiza un lavado con agua para posteriormente proceder a su concentrado. Contiene además entre un 3 – 4 % de fibra total y su contenido en flavonoides es considerable siendo la riqueza en hesperidina de entre 5.000 a 10.000 mg/kg aproximadamente.

Por lo general, hoy en día, la práctica totalidad de la industria de transformación de cítricos ya está recuperando las celdillas como ingrediente rico en pulpa suspendida para la industria de envasado de zumos, tras la eliminación de los posibles defectos mediante el empleo de hidrociclones (ver en el apartado 1.4.2.). Como resultado de la etapa de eliminación de defectos de la pulpa, la fracción finalmente aprovechable para la industria ronda el 4-5%, mientras que la parte no aprovechable es tan sólo del 1-2% por lo que esta corriente de biomasa ve reducido enormemente su impacto desde el punto de vista del volumen total. En las industrias de zumos de otras regiones del mundo donde los zumos suelen concentrarse, como es el caso de Florida, con esta pulpa de rechazo que tiene mayor número de defectos, se realiza un lavado en continuo con agua para recuperar los sólidos solubles que esta pulpa contiene. Este líquido de lavado a continuación es concentrado y mezclado con el zumo de cítrico concentrado.

En la industria española de zumos, donde el diseño industrial va orientado mayormente a hacer zumos directos de alta calidad y, por tanto, no suelen tener lugar procesos de concentración, esta corriente de celdillas no puede ser aprovechada para aplicación en zumos y bebidas debido a su elevado nivel de defectos, por lo que es muy habitual que se termine juntando con la corriente cortezas y reciban ambas el mismo destino final, que por lo general será el empleo como materia prima para alimentación animal.

2. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo General

El objetivo general de la presente tesis es la valorización de las corrientes de biomasa generadas en los procesos de fabricación de zumos cítricos para su uso en alimentación humana.

2.2. Objetivos específicos

Para alcanzar este objetivo general se plantearon cuatro objetivos específicos:

1. Identificar los principales flavonoides presentes en naranjas y mandarinas, así como su distribución entre las distintas partes del fruto.
2. Determinar, a nivel de la industria de zumos cítricos, que corriente de biomasa es la idónea para plantear un proceso de recuperación del flavonoide hesperidina.
3. Desarrollar un proceso innovador y viable para recuperar la flavanona hesperidina como un coproducto de gran valor asociado al proceso industrial de exprimido de zumo de naranjas y mandarina.
4. Conocer el valor funcional de zumos formulados con fibra procedente de la corteza de naranja generada durante el proceso de exprimido industrial.

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Materia prima

La primera parte del trabajo consistió en caracterizar el contenido en flavonoides de las principales variedades comerciales de naranjas (*Citrus sinensis*) y mandarinas (*Citrus reticulata*). Las distintas variedades objeto de estudio se citan en la tabla 3.1.

Dentro de este segundo grupo, en la citricultura española ha tenido relevancia histórica las variedades que comercialmente han venido a denominarse clementinas por sus especiales propiedades organolépticas (Kimball, 2002). Asimismo, en los últimos años ha experimentado una gran expansión el cultivo de las variedades denominadas como híbridos de mandarina. Su presencia lleva años consolidada a nivel mundial para el caso concreto de las variedades Ortanique y Nadorcott que, en ambos casos, se trataría de híbridos entre *Citrus reticulata* Blanco x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Cottin, 2002). También, en este grupo de los híbridos, destaca por su rápida implantación comercial el caso de *C. reticulata* var. Orri, esta última obtenida por la irradiación de yemas de la variedad Orah que a su vez se trataría de un híbrido entre el híbrido Temple y la mandarina Dancy (Citrus ID, 2010).

Tabla 3.1. Variedades de naranja y mandarina utilizadas para la caracterización de los flavonoides.

Variedades de naranja	Variedades de mandarina	
	Clementinas	Híbridos
Navelina	Oronules	Orri
Salustiana	Clemepons	Ortanique
Navel	Clemenules	Nadorcott
Navel-Late		
Navel-Lane-Late		
Sanguinelli		

Las muestras de fruta fueron facilitadas por el operador hortofrutícola FONTESTAD S.A. (Museros, Valencia). De las 12 variedades mencionadas en la Tabla 3.1, se recibieron 2 muestras de 25 kg de cada una, una al inicio del periodo de recolección de la variedad (fruta temprana) y otra al final de su periodo de recolección y comercialización (fruta tardía). Así, el total de muestras a ensayar fue de 24. Cada una de las muestras fue separada en dos partes una de 5 kg y otra de 20 kg y con estas dos porciones se procedió como sigue:

a) Muestra de 5 kg: Con ella se procedió a realizar un exprimido con un equipo doméstico (*Philips – Citrus Press HR2737/70*). A continuación, el zumo fue filtrado con una malla de 20 mesh (*JBT Quickfiber Device®*). De esta manera, de cada muestra, se separaron las siguientes tres partes diferenciadas del fruto: zumo filtrado, tejidos membranosos (segmentos y celdillas) y corteza (albedo y flavedo). A partir de la muestra de zumo se realizaron los análisis fisicoquímicos básicos para determinar la calidad del fruto en cada momento. Estos análisis fueron: °Brix (refractómetro *Atago RX 5000-α*), acidez (g/L) obtenida por titulación potenciométrica con solución estándar de NaOH hasta un valor de pH = 8,1, según el método analítico internacional IFU3 (2015), y rendimiento en zumo (g zumo /100 g fruta). Asimismo, se procedió al cálculo del Índice de Madurez (IM) obtenido como resultado del cociente entre la medida del °Brix refractométrico y la acidez expresada en g/L.

Por otra parte, se procedió al análisis de los flavonoides en cada una de las tres fracciones del fruto, corteza, zumo y membranas. La metodología para su determinación por LC-UV (*Liquid chromatography with ultraviolet detection*) se describe en el apartado 3.2.

b) Muestra de 20 kg: El objeto de esta muestra fue comprobar si el perfil flavónico del zumo podía variar significativamente en función de la técnica de exprimido utilizada. La muestra fue introducida en una extractora industrial *in-line Excel (Bucher-Excel)* para su exprimido. A continuación, el zumo obtenido se filtró con un tamiz de 20 mesh. Con el zumo despulpado se

procedió al análisis de flavonoides siguiendo el método descrito en el apartado 3.2.

3.2. Análisis de flavonoides

La caracterización de flavonoides se realizó para todas las variedades cítricas mencionadas en la Tabla 3.1 y se centró básicamente en dos grupos:

El primero, formado por las flavanonas **Hesperidina**, **Narirutina** y la flavona **Diosmina**. El motivo de incluir en el estudio la Hesperidina y Narirutina es porque estas dos especies flavónicas son las más abundantes tanto en naranjas como mandarinas (Gattuso *et al.*, 2007). Asimismo, en esta primera categoría se incluyó también la Diosmina que, si bien no se va a hallar en cantidades elevadas como las dos primeras (Gattuso *et al.*, 2007), el elevado interés comercial de este compuesto hace necesario revisar las posibilidades de recuperación que podría tener en el marco de la industria de transformación de cítricos.

El segundo grupo, estaría formado por algunos compuestos incluidos dentro de la categoría de las flavonas polimetoxiladas, concretamente la **Sinensetina**, **Tangeretina** y **Nobiletina**. Si bien las revisiones bibliográficas ya indican que todas ellas van a encontrarse en cantidades pequeñas (Gattuso *et al.*, 2007 y Manthey *et al.*, 1996), su inclusión en este estudio ha sido motivada por el elevado interés que han despertado para las ciencias biomédicas por su potencial quimiopreventivo del cáncer (Meiyanto *et al.*, 2012; Benavente-García *et al.*, 2008; Walle, 2007).

3.2.1. Extracción de flavonoides

3.2.1.1. Instrumentación y condiciones cromatográficas

El equipo de cromatografía líquida que se empleó fue un *Shimadzu* compuesto por una bomba de alta presión LC-20AD, un desgasificador DGU-20As, un detector de red de diodos de UV-Visible SPD-M20A y un horno CTO-10AS VP.

La columna cromatográfica utilizada fue una *Prontosil (Scharlau)*, de fase reversa C18, de 250x4,6 mm de longitud, 5 µm de tamaño de partícula y 100 Å de tamaño de poro. Se trabajó con una precolumna *Kromaphase* de fase reversa C18, de 30x4 mm 5 µm de tamaño de partícula y 100 Å de tamaño de poro. Las condiciones cromatográficas se optimizaron en función de los criterios indicados por Sun *et al.*, 2010; Yang *et al.* 2014; Kanaze *et al.* 2003 y Calabro *et al.* 2004. Éstas fueron las siguientes:

- Temperatura columna: 40°C
- Velocidad de flujo: 1,2 mL/min
- Volumen de inyección: 20 µL
- Fase móvil: A: acetonitrilo / B: agua, en gradiente. Las condiciones iniciales fueron B al 90% durante 1 min, en 2 min se pasó a 74% de B, en 7 min se llegó a 70% de B y, a continuación, a 35% de B en 8 min, que se mantuvo constante durante 4 min. Por último, en 30 s, se volvió a las condiciones iniciales.
- Tiempo de análisis: 30 min
- Temperatura de la celda del detector PDA: 40°C
- Según los espectros UV-Vis de los distintos flavonoides de interés se seleccionaron como longitudes de onda para la medición de las áreas los siguientes máximos de absorción: nobiletina, sinensetina y tangeretina 325 nm; hesperidina y narirutina 282 nm y diosmina 346

nm. Los tiempos de retención a los que aparecieron estos analitos fueron 9,45; 9,6; 10,1; 20,2; 21,4; 22,8 min para narirutina, diosmina, hesperidina, sinensetina, nobiletina y tangeretina, respectivamente.

3.2.1.2. Preparación de patrones: Para la preparación de patrones utilizaron los siguientes patrones y reactivos:

Narirutina, tangeretina, nobiletina y sinensetina del fabricante *Extrasynthèse* (Genay, Francia). Hesperidina de *Sigma- Aldrich* (St. Louis, Estados Unidos). Diosmina de *Alfa Aesar* (Kalsruhe, Alemania). Metanol grado HPLC y Dimetil Sulfóxido (DMSO) grado análisis de *Sharlab* (Sentmenat, España). Acetonitrilo y agua, ambos de HPLC de *VWR Chemicals* (Fontenay-sous-Bois, Francia).

La preparación y concentración de los patrones stock de los distintos analitos fueron:

- Hesperidina 5.000 mg/L en dimetil sulfóxido
- Narirutina 400 mg/L en metanol/dimetil sulfóxido (1:1)
- Sinensetina 100 mg/L en metanol
- Tangeretina 100 mg/L en metanol
- Nobiletina 100 mg/L en metanol
- Diosmina 5 g/L en dimetil sulfóxido

Para la preparación de la curva de calibrado se preparó una batería de disoluciones de patrones de cinco concentraciones diferentes se analizaron por triplicado. La curva de calibrado se construyó en función del área de pico obtenida respecto a la concentración conocida del analito.

Los ensayos indicaron una linealidad para un intervalo de concentración de 0,1 a 5 mg/L de diosmina con R^2 0,9977, de 1 a 50 mg/L de narirutina con R^2 0,9995, entre 10 y 250 mg/L para la hesperidina con R^2 0,9998 y entre 0,02 y 1,0 mg/L para sinensetina ($R^2=0,9927$), nobiletina ($R^2=0,9971$) y tangeretina ($R^2=0,9996$). El límite

de detección y el límite de cuantificación se definen como la relación señal/ruido de 3:1 y 10:1, respectivamente. En este caso los límites de detección fueron 0,21; 0,053; 0,058; 0,003; 0,0045, 0,0033 mg/L para la diosmina, narirutina, hesperidina, sinensetina, nobiletina y tangeretina, respectivamente. Los límites de cuantificación fueron 0,65; 0,161; 0,167; 0,0093; 0,013; 0,011 mg/L para los respectivos flavonoides.

La precisión del método fue determinada por el análisis de cinco inyecciones consecutivas usando una mezcla de los patrones en una concentración de 2,5; 20; 50; 0,5; 0,5; 0,5 mg/L de diosmina, narirutina, hesperidina, sinensetina, nobiletina y tangeretina, respectivamente. Los valores de desviación estándar relativa (%RSD) de las áreas de cada pico variaron entre 0,6 y 0,9%.

3.2.1.3. Preparación de las muestras de zumo: La preparación de la muestra para los zumos fue similar a la utilizada por Mouly *et al.* (1998). A 1 mL de muestra homogénea de zumo, se le añadieron 1 mL de H₂O y 2 mL de dimetil sulfóxido en un frasco de vidrio de 25 mL, se agitó vigorosamente y se introdujo en el baño a 60 °C durante 2 horas. Posteriormente la disolución se centrifugó a 4200 rpm durante 10 min, se recogió el sobrenadante con una jeringa y se filtró con un filtro de polipropileno de 0,2 µm de (Sharlab. Sentmenat, España), recogiénose el filtrado en un vial de 2 mL previo a su inyección en el cromatógrafo.

3.2.1.4. Preparación de las muestras de corteza y membranas: La preparación de la muestra en el caso de la corteza y celdillas está basada en el método de extracción utilizado por Tomas-Barberán *et al.* (2000), con alguna pequeña modificación. Aproximadamente 100 g de corteza/membranas se deshidrataron mediante el secado durante 48 h en un horno a 110 °C. El sólido deshidratado se trituró durante 4 minutos hasta conseguir un polvo amarillo oscuro lo más fino posible.

A 10 mg de muestra seca, pesada en báscula de precisión Ohaus Pioneer PA114 (Distrilab, Murcia), se le añadieron 5 ml de DMSO y 4 mL de agua para las muestras de corteza seca, ó 4 ml de DMSO y 3 mL de agua para las de las membranas secas. Se agitó vigorosamente y se introdujo en un baño a 60 °C durante 24 horas. Posteriormente la disolución se centrifugó a 4.200 rpm durante 10 min, se recogió el sobrenadante con una jeringa y se filtró con un filtro de 0,2 micras, recogándose el filtrado en un vial de 2 mL previo a su inyección en el cromatógrafo.

3.2.2. Cuantificación de flavonoides.

Los flavonoides contenidos en las distintas partes estudiadas de los frutos cítricos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención y de los espectros de UV-Vis respecto de los patrones de referencia. Una vez identificados los flavonoides se procedió a cuantificar el área de cada pico obtenida, la cual está relacionado con su concentración y se puede calcular mediante la correspondiente curva de calibrado.

3.2.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA) multifactoriales. Para la determinación de las diferencias entre las muestras se aplicó el test LSD (Fisher's least significant difference) con un nivel de significación del 95%, utilizando para ello el software *Statgraphics Centurion XVI.II*.

3.3. Recuperación industrial de la hesperidina a partir de la corteza de cítricos.

En el presente apartado tras el estudio de caracterización de flavonoides realizado con las diferentes variedades de naranjas y mandarinas, se propone optimizar un proceso industrial de obtención de flavonoides cítricos a partir de alguna de las fracciones

sólidas del fruto. El proceso de recuperación se centró en la flavanona hesperidina por ser el flavonoide más abundante tanto en naranjas, como en mandarinas y sus híbridos comerciales.

Asimismo, la corriente de biomasa sólida a la que se decidió aplicar el proceso de recuperación de hesperidina fue la de las cortezas, que está compuesta principalmente por el albedo y flavedo del fruto con alguna porción menor de membranas. El motivo por el cual se seleccionó esta corriente es doble: por un lado, por ser la parte del fruto más rica en hesperidina, así como del resto de flavonoides de interés descritos en el apartado 3.2. El otro gran motivo es que la corriente de biomasa que representa las cortezas que salen de los equipos industriales de exprimido, vienen a representar el 55% en peso de la fruta que entra en las plantas de exprimido y que, a día de hoy, tienen unas opciones de valorización muy limitadas. Así, sus opciones de comercialización quedan actualmente relegadas a la alimentación animal de rumiantes, lo cual supone un escaso rendimiento económico para las industrias de transformación a la vez que se pierde valor añadido dados los numerosos compuestos bioactivos que se alojan en las cortezas de las naranjas y mandarinas.

3.3.1. Procedimiento de recuperación.

El método de recuperación se basó en el descrito por Hendrickson *et al* (1964) y López (1995), proponiendo algunas modificaciones para poder ajustarlo a un proceso en continuo sin alterar el resto de los procesos de una industria de transformación de zumos cítricos con recuperación de coproductos. Se prestó especial atención a que la naturaleza de los tratamientos a los que se sometiera la corteza cítrica permitiera extraer la hesperidina sin comprometer ni dificultar el proceso de obtención de piensos para alimentación animal, así como cualquier otro proceso auxiliar que tenga lugar en este tipo de industria aguas abajo.

El proceso de recuperación a escala piloto que se siguió en laboratorio partió de lotes de 1.000 g de corteza fresca de salida de extractoras siguiendo las etapas que se describen en el diagrama de flujo de la figura 3.1. Una de las principales

modificaciones con respecto a los procedimientos de obtención de hesperidina arriba mencionados, fue en la cantidad de agua utilizada para realizar las extracciones. La elevada cantidad de agua que proponían los autores revisados podría suponer dificultades tanto de proceso como medioambientales, ante un hipotético escalado industrial, por lo que se consideró interesante revisar los procedimientos con una menor dosificación de agua de extracción.

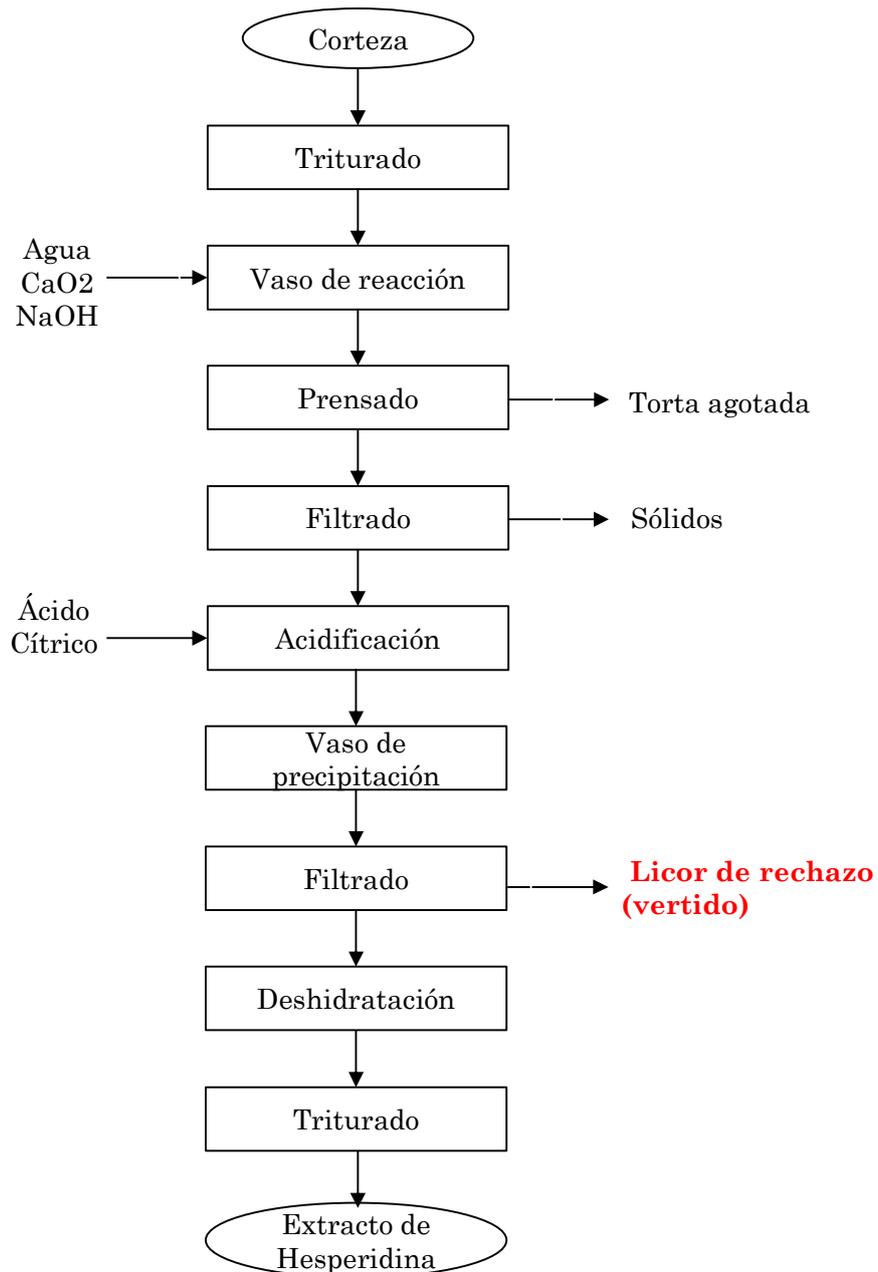


Figura 3.1. Diagrama de flujo del proceso de extracción de hesperidina en laboratorio

Por este motivo en el presente procedimiento de recuperación de hesperidina se propuso un diseño experimental en el que se realizara el proceso descrito en el diagrama de la Figura 3.1 pero utilizando dos volúmenes de agua distintos para la extracción:

- a) Por un lado, un primer procedimiento que incorporara una cantidad de agua estándar según bibliografía de manera que la proporción corteza:agua fuera de 1:2 (p/p).
- b) Y, por otro lado, un segundo procedimiento que realizara la extracción sin apenas adición de agua, solamente el mínimo para realizar la actividad de disolutor de los agentes alcalinos. En este caso la proporción corteza:agua fue de tan sólo 1:0,25 (p/p).

A continuación, se detallan las distintas etapas del proceso de recuperación de hesperidina ilustrado en la Figura 3.1:

1. Se partió de 1.000 g de corteza recogidos de la salida de las extractoras industriales de la planta de exprimido, que fueron triturados con la ayuda de una trituradora (Robot Coupe®).
2. A la muestra triturada, se le añadió el agua en diferente cantidad en función de las dos pruebas descritas: 2000 g ó 250 g. En esta etapa se añadían, junto al agua, los siguientes agentes alcalinos: 3,2 g de CaO y 12,5 g de NaOH al 50%. Se homogenizó la muestra muy bien con la ayuda de una espátula. El pH de la muestra debía quedar entre 11 y 11,8.
3. La hesperidina se dejó disolver en el medio básico durante una hora, agitando ocasionalmente.
4. Una vez terminado el proceso, se prensó al máximo la corteza basificada con la ayuda de una prensa manual, extrayendo así el licor de prensado.

5. El líquido extraído se pasó a través de un tamiz de 20 mesh y se le añadió 1 g de celulosa por litro de licor dejando en agitación durante 1 min.
6. A continuación, el líquido se filtró a vacío con un filtro de celulosa Whatman nº 4 utilizando un embudo Büchner.
7. Los sólidos fueron descartados y el líquido filtrado se acidificó con ácido cítrico hasta pH inferior a 5,5.
8. Se dejó reposar el extracto acidificado durante cuatro horas para que precipitara la hesperidina a temperatura ambiente.
9. Después del tiempo de precipitación, se filtró otra vez a vacío.
10. Por último, el extracto sólido filtrado se secó en estufa a 50 °C durante 24 horas.
11. Finalmente se analizó la pureza de la hesperidina obtenida mediante HPLC-UV, disolviendo entre el extracto en dimetilsulfóxido según el procedimiento descrito a continuación, en el apartado 3.3.2.

3.3.2. Análisis de la pureza del extracto de hesperidina obtenido.

Para el análisis se tomaron 10 g de extracto de hesperidina que se deshidrataron mediante el secado, durante 48 h, en una estufa (JP Selecta 2000210) a 110 °C. El sólido deshidratado fue triturado con un equipo doméstico Taurus (Aromatic 150W) durante 30 segundos aproximadamente hasta conseguir un polvo amarillento lo más fino posible. A continuación, se pesaron entre 10 y 20 mg, que fueron añadidos a un frasco de vidrio con 10 ml de DMSO. El frasco se agitó vigorosamente y fue introducido en un baño a 60 °C durante 6 horas. Posteriormente la disolución se centrifugó (Orto Alresa Digicen 21) a 4.200 rpm durante 10 min. Una vez centrifugado el extracto, 1 mL del sobrenadante fue inmediatamente diluido con 4 mL de DMSO y 5 mL de H₂O, agitando vigorosamente. Posteriormente, empleando una jeringa, se filtró la disolución (0,2 µm) previo a su inyección en el cromatógrafo. El equipo y las condiciones cromatográficas fueron las descritas en el apartado 3.2.1.

3.3.3. Análisis de otros componentes presentes en el extracto de hesperidina

Los extractos de hesperidina obtenidos según lo descrito en el apartado 3.3.1., además de presentar una concentración considerable de este flavonoide, podrían presentar otras flavanonas y flavonas polimetoxiladas. Asimismo, por el hecho de realizarse la extracción a partir del albedo y flavedo del fruto, presumiblemente van a estar presentes en el extracto recuperado otros componentes abundantes de esta parte del fruto, tales como pectinas, azúcares naturalmente presentes en los cítricos (sacarosa, glucosa, fructosa), fibras, proteínas y, por los reactivos utilizados durante la recuperación, habrá una cantidad de cenizas considerable principalmente formada por los iones calcio y sodio. Finalmente, si bien el extracto de hesperidina se somete a deshidratación en estufa al final del proceso, la deshidratación no es total por lo que también habrá cierto contenido de agua. El análisis de todos estos compuestos fue llevado a cabo en un laboratorio externo. No obstante, los procedimientos analíticos seguidos, según la información proporcionada por el propio laboratorio externo, se resumen a continuación.

Tabla 3.2. Relación de procedimientos analíticos llevados a cabo por el laboratorio externo para la caracterización de los extractos de hesperidina obtenidos.

Parámetro	Breve descripción	Método/Técnica instrumental
Proteínas (Nx6,25)	Digestión ácida y destilación Kjeldahl	UNE-EN ISO 20483:2014 UNE-EN ISO 8968-1:2014
Grasas totales	Digestión ácida y extracción shoxlet	ISO 1443:1973
Azúcares totales (Suma de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, lactosa)	Extracción y determinación por cromatografía líquida con detector índice de Refracción.	AOAC Official Method 977.20, 980.13, 982.14
Sodio	Digestión ácida en microondas y determinación por espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)	AOAC 984.27, ISO/DIS 17294
Cenizas	Calcinación en mufla y determinación por gravimetría	ISO 936:1998
Humedad	Desecación en estufa a vacío a 70 °C y gravimetría	UNE 34552-2:1972
Calcio	Digestión ácida en microondas y determinación por ICP-MS	AOAC 984.27, ISO/DIS 17294
Pectina total	Precipitación en alcohol de las pectinas totales y extracción con carabazol y ácido sulfúrico de sus fracciones medidas fotométricamente: pectina soluble en agua, oxalato o álcali.	IFU 26

3.3.4. Valoración técnico-económica de los dos procedimientos de extracción de hesperidina.

Tras el estudio de los dos procesos de recuperación de la hesperidina, una vez caracterizados debidamente los rendimientos y las purezas obtenidas en ambos casos, así como la tipología de impurezas que quedaba en cada uno de los productos obtenidos, se procedió realizar un análisis de costes y por tanto de viabilidad industrial ante un hipotético caso de escalado de ambos procedimientos para una industria tipo de fabricación de zumo. Este análisis de costes se realizó desde la perspectiva del impacto que tenía incrementar el consumo del recurso de agua potable en el procedimiento industrial.

Hipótesis planteada:

Industria de zumo de dimensiones medias con las siguientes capacidades:

- ✓ Industria con 14 máquinas extractoras tipo *in-line* modelo Excel del fabricante Bucher-Excel®.
- ✓ Características de la extractora: Equipo con 5 copas de 3", de 100 golpes por minuto, con capacidad nominal de 3.500 kg de fruta exprimida /hora.
- ✓ Producción horaria estimada de la industria: 50.000 kg de fruta exprimida /hora.
- ✓ Biomasa (corteza) generada como materia prima para el proceso de extracción de hesperidina: 25.000 kg/h.

Con este escenario planteado se estudiaron los costes asociados a la diferente cantidad del agua de extracción utilizada, a partir de estas dos variables:

- a) Coste directamente asociado al mayor consumo de agua potable.
- b) Costes de depuración del licor de rechazo generado al final del proceso, una vez vertido a la EDARi con reactor biológico aerobio.

En este segundo análisis hubo que tener en cuenta, además de los volúmenes de vertido que generaban ambos procedimientos de extracción, la carga orgánica asociada a los mismos, expresada como Demanda Química de Oxígeno (DQO) en g O₂/L de vertido. Esto es así puesto que, ante un posible escalado del procedimiento, hay que tener en cuenta que la EDARi de la actividad industrial va a utilizar microorganismos para descomponer los compuestos orgánicos que generan esa DQO. Para ello las instalaciones utilizan reactores aerobios aireados con soplantes de gran consumo energético siendo los costes de depuración de un vertido directamente proporcionales a la carga orgánica que éste lleva.

Para el análisis de la DQO de los licores de rechazo obtenidos en cada procedimiento, se utilizó el método del dicromato de potasio, que consiste básicamente en la oxidación de la materia orgánica utilizando un oxidante fuerte como el dicromato de potasio. Éste es una sal de cromo hexavalente y tras la reacción con la carga orgánica se convierte en una forma trivalente de cromo de color verde opaco. El proceso de digestión tuvo lugar en un digestor Hatch Lange (MOD) donde reaccionan el oxidante junto con ácido sulfúrico, a 150 °C, durante dos horas. A continuación, para la cuantificación de la DQO se utilizó un método colorimétrico. Este método se basa en que tras la reacción hay un cambio en la absorbancia de la muestra, debido al distinto color del cromo trivalente (Cr⁺³) y el cromo hexavalente (Cr⁺⁶). Para la cuantificación final se utilizó un fotómetro Hatch Lange (Mod) para medir la absorbancia de las muestras a 420 nm expresando el equipo, en función de este valor, los resultados como g O₂/L.

3.4. Valor funcional de zumo de naranja enriquecido con fibra obtenida a partir de las cortezas.

3.4.1. Formulación del zumo.

3.4.1.1. Materia prima.

a) Zumo de naranja:

Para la preparación del zumo enriquecido en fibra se utilizó un zumo directo de naranja pasteurizado con una ratio ($^{\circ}$ Brix corregido/Acidez) superior a 14, por tratarse de un parámetro estándar de mercado y al cual está acostumbrado el paladar de la mayoría de los consumidores habituales del zumo de naranja NFC comercial. Este zumo se consiguió mediante la mezcla de lotes de fruta de principio de primavera, principalmente de la variedad Navel-lane-late, con variedades tardías como la valencia-late a razón del 50% de cada tipo. En la tabla 3.3 se detallan los principales parámetros fisicoquímicos del lote de zumo utilizado para la presente investigación.

Tabla 3.3. Parámetros fisicoquímicos del lote de zumo de naranja NFC seleccionado

Parámetros	Zumo de naranja	Valor de referencia (A.I.J.N)	Estándar de mercado
$^{\circ}$ Brix refractométrico	11,66 \pm 0,02	NA	
$^{\circ}$ Brix corregido	11,82	> 10	>10,50
Acidez expresada como ác. cítrico anhidro a pH 8,1 (g/100g)	0,80 \pm 0,02	NA	
Ratio ($^{\circ}$ Brix corr./acidez)	14,78 \pm 0,02	NA	13,5 - 15,5
pH	3,57 \pm 0,00	NA	< 4
Aceites esenciales (μ L/L)	200 \pm 10,2	Max. 300	
Limonina (mg/L)	2,5 \pm 0,3	NA	< 5
Vitamina C (mg/L)	555 \pm 9,9	Min. 200	

Para la caracterización de los principales parámetros fisicoquímicos del zumo se siguieron los siguientes métodos analíticos:

° **Brix refractométrico y °Brix corregido.** Se siguió el método IFU analysis N° 8 (2005) que consiste en la determinación de los sólidos solubles de una muestra estimada a partir de su índice de refracción referenciado al índice de refracción de una solución pura de sacarosa, para la medida se utilizó un refractómetro digital (ATAGO RX-5000). Este valor se corrige con la acidez de la muestra, según se indica en las tablas empíricas correspondientes.

Acidez expresada como g de ácido cítrico anhidro por 100 g de zumo medido hasta pH 8,1. El procedimiento que se siguió fue el *IFU Analysis N°3* (2015), basado en la medida del contenido de ácidos orgánicos y minerales determinados por titulación potenciométrica con un estándar volumétrico de hidróxido de sodio.

pH: la determinación se llevó a cabo potenciométricamente a 20°C siguiendo el procedimiento *IFU ANalysis N°11* (2015) y para ello se utilizó un pH-metro Crisson Basic, 20.

Vitamina C, expresado como mg de ácido L-ascórbico por cada L de zumo. Se utilizaron tiras reactivas y un Refleómetro RQ Flex™ 10 de Merck

Aceites esenciales: Fueron determinados por el método del bromato de Scott (IFU Analysis N° 45, 2005) por el cual se determinan los compuestos oxidables que hay en los aceites esenciales cítricos como especialmente el d-limoneno.

Limonina: Método analítico basado en la separación y detección según la técnica de HPLC-UV (Shimadzu), compuesto por bomba, inyector automático y detector de ultravioleta. Para la preparación de la muestra hubo que eliminarle los sólidos a través de la centrifugación a 1.500 g y a continuación empleando filtros de 0,25 µm. Para la cromatografía se utilizó un Columna cromatográfica Scharlau Kromaphase 100 C18 (5 µm) y finalmente en el detector se seleccionó la longitud de onda de 215 nm.

b) Fibra cítrica:

Para formular la bebida con alto contenido en fibra se utilizó un ingrediente a base de fibra cítrica facilitado por el centro tecnológico AZTI TECNALIA (Derio, Vizcaya) y obtenida en las instalaciones de planta piloto propias del citado centro tecnológico. Las fibras fueron extraídas por AZTI a partir de variedades de naranja de primavera-verano como Navel-lane-late y Valencia-late así como de variedades de invierno principalmente Navelina.

La fibra consistía en un polvo deshidratado de color anaranjado claro, con un tamaño de partícula $< 50\mu\text{S}$ y, según la información proporcionada por AZTI, presentaba las características nutricionales que se describen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Composición nutricional de la fibra empleada en el zumo enriquecido

	(g / 100g fibra)
Carbohidratos (g)	11,15
Azúcares (g)	8,85
Fibra alimentaria (g)	72,85
Insoluble (g)	32,3
Soluble (g)	40,4

3.4.1.2. Zumo enriquecido en fibra.

Para definir el contenido en fibra a incorporar a la bebida hubo que tener en cuenta varios *inputs*. El primero de ellos fue el contenido de fibra que típicamente contiene la parte comestible de la naranja puesto que, desde el punto de vista nutricional, la gran diferencia entre consumir una naranja o beber su zumo consiste en que en la segunda opción se reduce enormemente el contenido de fibra dietética ingerido. Puesto que el objeto de este trabajo era obtener un zumo más saludable a través de la incorporación de fibra cítrica, se quiso partir del dato que contiene la fruta para conseguir, al menos, aproximarse a este valor a través

del enriquecimiento en fibra del zumo. En la Tabla 3.5 aparece la composición nutricional de la naranja y, en ella, se puede ver que la naranja contiene alrededor de un 2% de fibra.

Asimismo, otro de los aspectos a tener en cuenta fue si, como consecuencia de la legislación vigente, concretamente el Reglamento CE nº 1924/2006, podía ser factible encontrar un nivel de dosificación de fibra que permitiera, a la bebida final, atribuirle una *declaración nutricional* relacionada con su contenido en fibra. Así, la citada norma en su ANEXO de Declaraciones Nutricionales y Condiciones que se les aplican, con relación al nutriente fibra, contempla las dos siguientes declaraciones:

- **Fuente de fibra:** cuando el producto contiene como mínimo 3 g de fibra por 100 g o también si este contenido de fibra es superior a 1,5 g de fibra por cada 100 kcal.
- **Alto contenido de fibra:** cuando el producto contiene como mínimo 6 g de fibra por cada 100 g o también, si el contenido en fibra es superior a 3 g por cada 100 kcal de producto.

Tabla 3.5. Composición nutricional de la parte comestible de la naranja (BEDCA, 2019).

Naranja (100 gramos)	Valor	Unidad	Vitaminas	Valor	Unidad
Energía	160 (38)	kJ (kcal)	Vitamina A	46	µg
Agua	88.6	g	Vitamina D	0	µg
Proteínas	0.8	g	Vitamina E	0.2	mg
Hidratos de Carbono	10.6	g	Folato	37	µg
Fibra dietética	2	g	Niacina	0.3	mg
Carbohidratos	8.6	g	Riboflavina	0.03	mg
Grasas	traza	g	Tiamina	0.1	mg
Monoinsaturados	0.055	g	Vitamina B-12	0	µg
Poliinsaturados	0.076	g	Vitamina B-6	0.06	mg
Saturados totales	0.028	g	Vitamina C (ácido ascórbico)	50	mg
Minerales					
Calcio	36	mg	Hierro	0.3	mg
Potasio	200	mg	Magnesio	12	mg
Sodio	3	mg	Fósforo	28	mg
Ioduro	2	µg	Selenio	1	µg
Zinc	0.18	mg			

Así pues, se decidió formular una bebida que contuviera el zumo de naranja mencionado en el apartado 3.4.1.1. junto con una cantidad de fibra añadida de 1,5 g por cada 100 g de bebida. De esta manera se conseguía un nivel de fibra algo más más próximo al de la fruta (2%), frente a los bajos contenidos que presentan los zumos comerciales (<0,3%,). A su vez, esta dosis sería de 1,5 g de fibra/38 kcal (Tabla 3.5), es decir 4 g de fibra/100 kcal. Por tanto, según la Norma, este zumo formulado podría utilizar tanto la alegación FUENTE DE FIBRA como ALTO CONTENIDO EN FIBRA.

3.4.2. Ensayos clínicos

Preparación del ensayo clínico: Para la realización de los ensayos clínicos se utilizó el zumo formulado enriquecido con fibra junto con otro zumo de naranja comercial que fue utilizado como placebo. Ambos se sirvieron con botellas de 250 mL que incluían un *sleeve* que protegía visualmente la bebida de manera que no pudiera diferenciarse por parte de los individuos participantes.

Los ensayos clínicos se realizaron en el Hospital Dr. Peset por parte del equipo investigador del Dr. Antonio Hernández Mijares. Se realizó un estudio aleatorizado, cruzado, ciego simple y controlado con placebo en 10 voluntarios sanos. Los criterios de inclusión fueron: individuos moderadamente activos, edad entre 18 y 45 años e índice de masa corporal (IMC) $\leq 30 \text{ kg/m}^2$. Se excluyeron los individuos con alteración del metabolismo hidrocarbonado, o glucemia basal mayor de 100 mg/dL, lactantes, embarazadas o condiciones de salud o medicación conocida que pudieran afectar a la regulación de la glucosa.

Cada individuo tomó una de las dos muestras (zumo estándar o zumo enriquecido con fibra) en días distintos. Entre ambas pruebas transcurrió un periodo de tiempo mínimo de 1 semana.

Previo a la realización de las pruebas los individuos participantes dejaron consentimiento informado por escrito y firmado. Asimismo, el estudio se realizó de

acuerdo con las prácticas deontológicas definidas en la *Declaración de Helsinki* sobre experimentación humana. El proyecto tuvo también la aprobación del Comité Ético del Hospital de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Doctor Peset. Asimismo, los datos de carácter personal recabados sobre los participantes en el estudio fueron tratados con la debida confidencialidad según las actuales leyes sobre protección de datos de carácter personal.

Realización de los ensayos: Durante las horas previas al ensayo, los individuos tuvieron que seguir algunas pautas generales como son:

1. Periodo de ayudas de, al menos, 12 horas antes del ensayo (es decir, desde la noche previa a la prueba).
2. Se les facilitó una dieta tipo de entre 1.500 y 2.000 kcal según individuos, cuyo objeto era evitar la ingesta de alimentos que pudieran interferir en la respuesta glicémica durante las 24 horas antes a la prueba.
3. Asimismo, en las 24 horas previas debían evitar el consumo de alcohol y bebidas con cafeína.

El producto enriquecido con fibra y el placebo (zumo comercial), fueron debidamente preparados para la ocasión envasados en botella de PET de 250mL e identificados con un código numérico para que el consumidor no asociara ningún concepto previo. Las botellas estuvieron conservadas en refrigeración hasta el momento de su consumo y justo antes fueron agitadas intensamente durante 1 minuto. Las muestras fueron bebidas en cada prueba por cada uno de los voluntarios de forma que la ingesta durara un periodo de tiempo de 5 minutos. Ambos productos embotellados (placebo y enriquecido) partían de la misma matriz de zumo, por lo que el contenido de carbohidratos y azúcares de partida era muy similar, siendo la principal diferencia el contenido de fibra entre ambos. Tal y como se observa en la Tabla 3.6, donde aparece la composición nutricional de los dos zumos estudiados, según los análisis externos realizados por Laboratorios Ecosur S.A., el contenido de fibra de los 250 mL de zumo enriquecido fue de 3,5 g frente a los 0,43 g del zumo convencional o placebo.

Tabla 3.6. Composición nutricional de los zumos administrados en el estudio (100 mL)

	Zumo de naranja enriquecido con fibra (A)	Zumo de naranja convencional (B)
Valor energético (Kcal/KJ)	47 / 197	47 / 198
Grasas (g)	0,07	0,11
Carbohidratos (g)	10,2	10,6
Azúcares (g)	9,5	9,7
Glucosa (g)	2,4	2,5
Fructosa (g)	2,5	2,5
Lactosa (g)	<0,4	<0,4
Maltosa (g)	<0,4	<0,4
Sacarosa (g)	4,6	4,7
Fibra alimentaria (g)	1,4	0,17
Proteínas (g)	0,66	0,78
Na (mg)	1,8	0,83

3.4.2.1. Estudio hidrocarbonado

La primera parte de la investigación consistió en un estudio del metabolismo hidrocarbonado de los participantes en el mismo. Para ello se obtuvieron los niveles de glucosa e insulina, tanto basales como tras la ingesta del zumo. La concentración de glucosa se determinó por el método enzimático de la hexoquinasa en un autoanalizador Beckman LX-20 (Beckman Coulter, La Brea, CA) y las de insulina se determinaron por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA insulina humana, Millipore Corporation, Billerica, MA), según lo descrito por Bosch-Sierra et al. (2019). Las mediciones tras la ingesta se realizaron a los tiempos 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min.

3.4.2.2. Sensación de saciedad

La segunda parte del trabajo consistió en un estudio de valoración de sensación de hambre y saciedad a través de cinco cuestiones que fueron valoradas a través de una escala visual analógica. Ésta se basó en pedir a los participantes que marcaran con una X distintas sensaciones, en una escala de 100 mm, siendo “0” la menor sensación y hasta 100 la máxima sensación. El cálculo de la puntuación se obtuvo midiendo la distancia en milímetros desde el principio de la escala hasta la X marcada por los individuos (de izquierda a derecha). Las preguntas a las que éstos debieron responder fueron las siguientes:

- I. *Saciedad: ¿Cuál es su sensación de saciedad?*
- II. *Hambre: ¿Cómo de hambriento se siente?*
- III. *Deseo de comer: ¿Cómo de intenso es su deseo de comer?*
- IV. *Plenitud: ¿Cómo de lleno se siente?*
- V. *Consumo prospectivo: ¿Cuánta comida piensa que sería capaz o le gustaría comer ahora?*

Estas valoraciones se realizaron de forma simultánea a las extracciones realizadas en situación basal (inmediatamente antes de la ingesta) y 15 minutos tras la ingesta, a los 60 minutos y 120 minutos.

3.4.3. Análisis estadístico.

Para el tratamiento estadístico de los datos clínicos, el equipo investigador del Hospital Dr. Peset utilizó el programa SPSS versión 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Se realizaron tests de Shapiro-Wilk para valorar la normalidad de variables continuas y los datos se ajustaron al patrón de una distribución normal. Las diferencias dentro de los grupos se analizaron mediante un análisis de la varianza con medidas repetidas (ANOVA). Las diferencias entre el Área Bajo la curva o AUC por las siglas en inglés de *Area Under the Curve*, entre los grupos del placebo y del zumo enriquecido con fibra, fueron analizadas utilizando un test de t-Student pareado, con un intervalo de confianza del 95% y las

diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$ (Bosch-Sierra et al., 2019).

4. RESULTADOS.

4.1. Caracterización de los principales flavonoides de las variedades de naranja y mandarina.

En las Tablas 4.1 y 4.2 se recogen los principales parámetros fisicoquímicos indicativos del estado de madurez del fruto de las distintas muestras en el momento del ensayo, donde se observa, por lo general, que aquella fruta que ha permanecido más tiempo en el árbol (fruta tardía) presenta un contenido en azúcares (expresado como °Brix) más elevado, así como menor acidez con respecto a aquella fruta que ha sido recolectada más pronto (fruta temprana). No obstante, el análisis estadístico de los factores °Brix y acidez para cada una de las dos especies botánicas confirmó la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) sólo en el caso de la acidez, como se muestra en el Anexo 0. Por su parte, el contenido en zumo no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la fruta recolectada tempranamente y la tardía.

Comparando los parámetros de las variedades de naranja de la Tabla 4.1 con la base de datos de cítricos del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA) de 2019, a partir de esta fuente se comprueba que, de forma general, los °Brix, acidez e índice de madurez están dentro de los límites habituales para cada una de las variedades estudiadas. Asimismo, se confirma que todas ellas, dentro de su periodo de recolección característico, lo inician presentando un brix más bajo que va aumentando a medida que la campaña avanza y los frutos permanecen más tiempo en el árbol, fenómeno que ocurre justo al contrario con el parámetro de la acidez cítrica que empieza con niveles más altos al inicio del periodo de recolección y lo finaliza con niveles de acidez más bajos. Finalmente, el parámetro índice de madurez, de forma análoga al °Brix, empieza con valores bajos y aumenta a lo largo que avanza la campaña. Por el contrario, este parámetro evoluciona durante la campaña de forma inversamente proporcional a la acidez lo cual es lógico puesto que este parámetro es el ratio entre el brix y la acidez expresada en g/100mL. Así, por ejemplo, la base de datos de IVIA muestra a la variedad Navelina como la que presenta mayor acidez de todas definiendo un intervalo de valores de entre 13 y 20 g/L según la fruta sea tardía o temprana respectivamente. En el grupo

de muestras analizadas en el presente trabajo de investigación fue precisamente la Navelina temprana la que dio mayores valores de acidez registrando un valor medio de 14,6 g/L. Asimismo, en dicha base de datos consultada aparece la variedad Navel-late como la que mayor rendimiento porcentual en zumo presenta de entre el grupo de variedades analizadas en este estudio, con valores de referencia entre 55 y 58 % de jugo. Entre las variedades de naranja analizadas en el presente trabajo, fue esta misma variedad una de las que mayor rendimiento en zumo dio, tanto para la muestra de recolección temprana como la tardía, estando este entorno al 50 %.

De forma análoga a la naranja, al comparar los datos de mandarinas (Tabla 4.2), se confirma la misma tendencia. Es decir, la fruta presenta menor contenido de azúcares al inicio del periodo de recolección que aumenta cuando la campaña avanza mientras que con la acidez ocurre lo opuesto, lo que hace aumentar el índice de madurez durante la campaña. Se confirma con la base de datos del IVIA de 2019 que, de forma general, los °Brix, acidez y rendimiento en zumo de las muestras que aparecen en la Tabla 4.2 se corresponden con los límites que define este Instituto para cada variedad de mandarina. Por ejemplo, el IVIA define que la variedad Ortanique sería la que mayor acidez presenta según el momento de recolección, con valores entre 14 y 22 g/L, a la vez que presentaría el mayor contenido en azúcares, entre 13 y 16 g/L. En el grupo de muestras que aparecen en la Tabla 4.2, efectivamente es esta misma variedad la que presentó los valores más altos tanto de brix como de acidez. De igual manera, según los datos del IVIA la variedad Orri sería la que presentaría la menor acidez de entre las variedades objeto de este estudio, lo que coincide con los datos de la Tabla 4.2.

Con relación al contenido de flavonoides de cada variedad estudiada, en la figura 4.1 se muestra un ejemplo de cromatogramas de los flavonoides Narirutina, Hesperidina, Diosmina, Nobiletina, Sinensetina y Tangeretina analizados por HPLC en las muestras de zumo procedente del exprimido manual obtenido a partir de la variedad Navel Lane Late tardía.

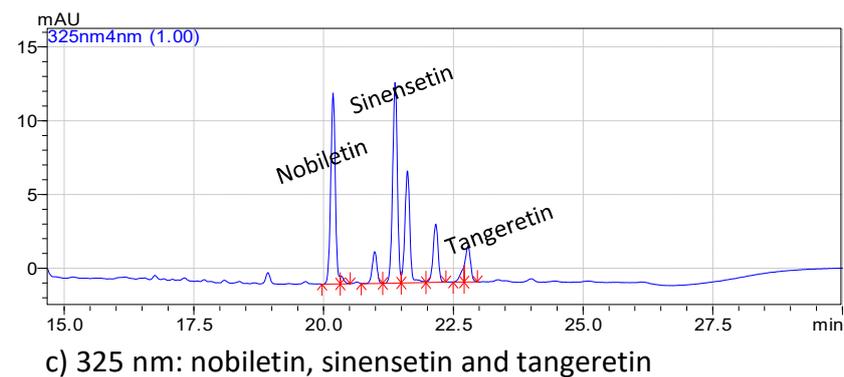
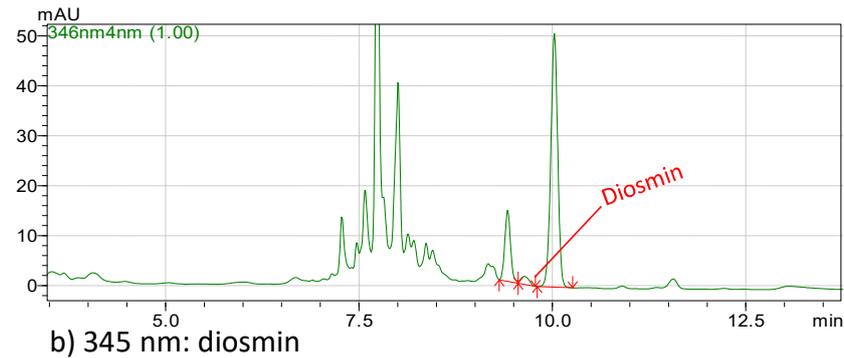
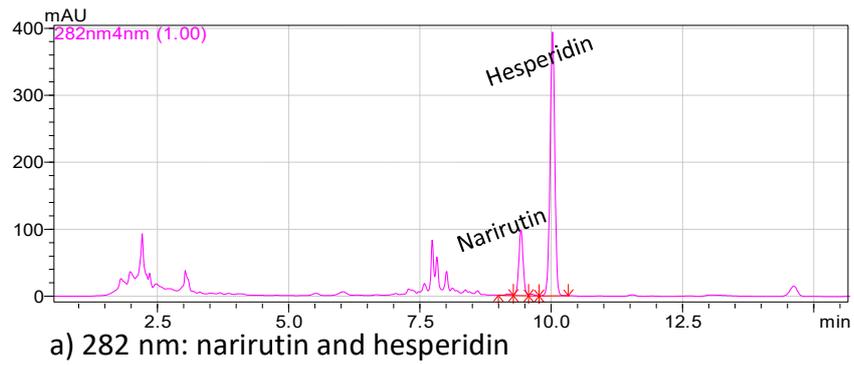


Figura 4.1. Ejemplos de cromatogramas obtenidos de muestras de zumo de variedad Navel Lane Late tardía. Flavonoides identificados a diferentes longitudes de onda.

Asimismo, en la figura 4.2, se muestran ejemplos de cromatogramas de los flavonoides Narirutina, Hesperidina, Diosmina, Nobiletina, Sinensetina y Tangeretina, analizados por HPLC, para una muestra de membranas del endocarpio de naranja de la variedad Navel Lane Late tardía y en la figura 4.3 para una muestra de corteza de naranja de la misma variedad.

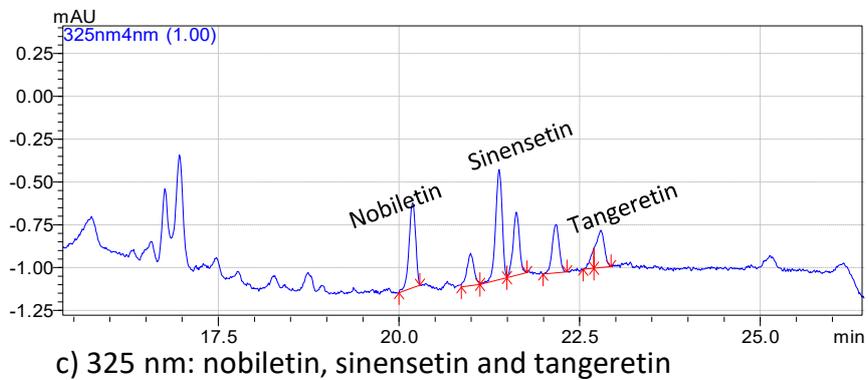
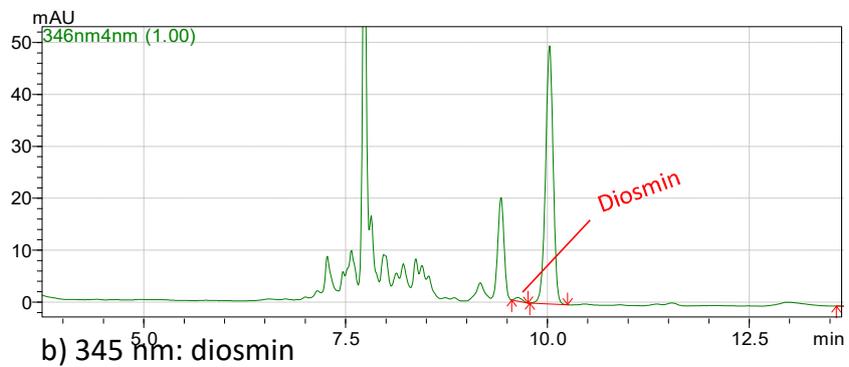
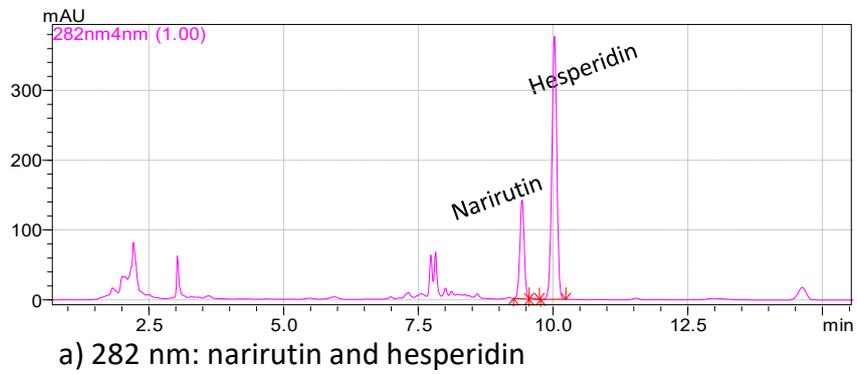
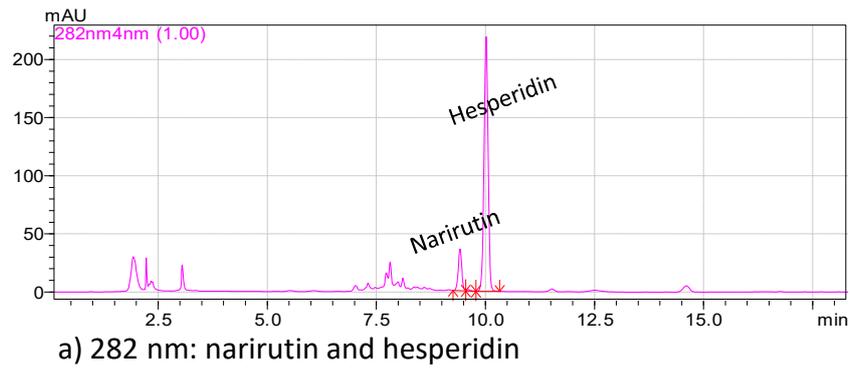
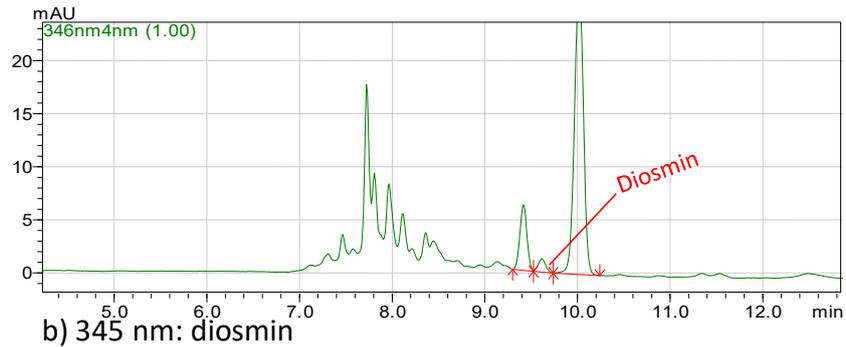


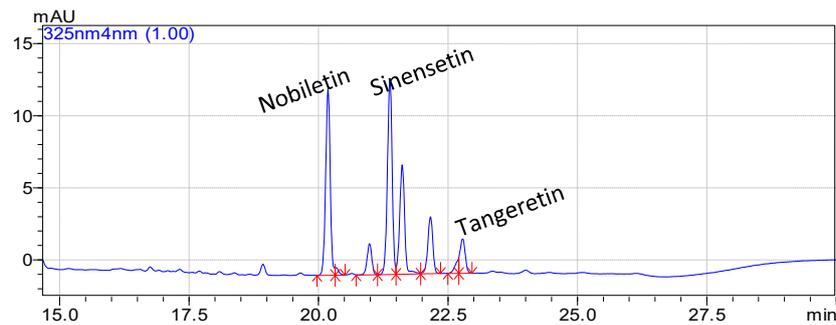
Figura 4.2. Ejemplos de cromatogramas obtenidos de muestras de membranas de variedad Navel Lane Late tardía. Flavonoides identificados a diferentes longitudes de onda.



a) 282 nm: narirutin and hesperidin



b) 345 nm: diosmin



c) 325 nm: nobiletin, sinensetin and tangeretin

Figura 4.3. Ejemplos de cromatogramas obtenidos de muestras de corteza de variedad Navel Lane Late tardía. Flavonoides identificados a diferentes longitudes de onda.

Como se muestra en las Tablas 4.3 a 4.12, los flavonoides más abundantes en ambas frutas y para cualquier parte del fruto son, por orden decreciente, los glucósidos hesperidina y narirutina, seguidos con mucha diferencia por la flavona diosmina. Las flavonas polimetoxiladas sinensetina, nobiletina y tangeretina se encuentran en mucha menor cantidad en el exocarpo, presentan una concentración prácticamente residual en las membranas del endocarpo y especialmente reducida en lo que son las muestras de zumo, tanto aquellas extraídas de forma manual como industrial. Este hecho era de

esperar dado que las flavonas polimetoxiladas son compuestos que forman parte de la corteza de los cítricos en pequeñas cantidades (Sendra *et al.*, 1988; Gaydou *et al.*, 1987) y es durante las operaciones de exprimido industrial cuando pequeñas cantidades de éstos pueden transferirse al zumo, siendo el máximo registrado de apenas 3,64 mg de nobiletina /L zumo en variedad Ortanique de recolección tardía.

Del análisis de los resultados obtenidos, según los datos de la Tabla 4.7, se observa que el valor medio de hesperidina obtenido en zumo de naranja de todas las variedades estudiadas fue de 31,6 mg/100 mL utilizando la exprimidora manual, siendo similar a los 28,6 mg/100 mL reportados por Gatusso *et al.* (1997). Diferencias algo mayores se encontraron cuando este análisis se hizo para el zumo extraído con un equipo industrial, obteniéndose una media de 27,1 mg/100 mL frente a los 37,5 mg/100mL que aporta Gatusso *et al.* para 63 muestras de zumo de naranja comercial. No obstante, estos autores no referencian la tecnología de extracción utilizada (*in-line*, *polycitrus*, *Brown*, etc.), lo cual sería una información relevante puesto que, tal y como apuntan algunos autores como Nogata *et al.* (2003), en función del sistema de exprimido empleado (manual frente al industrial del tipo *in-line*), el contenido de flavonoides que pasan de la corteza del cítrico al zumo varía de forma significativa. Incluso, dentro de un mismo sistema de exprimido seleccionado, determinados factores pueden impactar en este aspecto. Así, la selección del tipo de componentes mecánicos de extracción en los sistemas de exprimido tipo *in-line* van a afectar al contenido de flavonoides en el zumo y, para el caso de un exprimido manual, el nivel de presión ejercida durante la extracción también afectaría significativamente y de forma proporcional al contenido de flavonoides en el zumo final.

Los resultados de hesperidina encontrados en la corteza de naranja (Tabla 4.10), resultaron ser bastante aproximados a los datos obtenidos por Manthey *et al.* (1996), siendo el valor reportado por los autores para la variedad navel de 31749 mg/kg, mientras que el contenido obtenido en el presente trabajo fue de 48.992 mg/kg y 46.856 para esta misma variedad según la recolección fuera temprana o tardía, respectivamente, y de entre 33.069 mg/kg y 25.340 mg/kg para el grupo navel-late, tempranas y tardías, respectivamente. Estos autores, en el citado trabajo, analizaron

también el contenido en hesperidina y otros flavonoides en otras corrientes de biomasa y subproductos generados en la industria de transformación de cítricos, como pueda ser el licor de prensado de corteza, las melazas cítricas obtenidas por concentración a 50° Brix de estos mismos licores y los pellet deshidratados de corteza de cítricos, con el fin de encontrar otras fuentes adicionales para la recuperación de flavonoides a partir de subproductos industriales, además de las propias cortezas. Estos autores, sin embargo, no investigaron las membranas del interior del fruto. En este sentido, de los resultados presentados en la Tabla 4.9, se concluye que la corriente de biomasa que suponen las membranas, contiene una elevada cantidad de hesperidina, oscilando entre 5.505 mg/kg a 30.495 mg/kg en función de la variedad, lo cual es una riqueza considerablemente mayor al contenido de hesperidina encontrado por Manthey *et al.* (1996) en otras biomásas resultantes de la transformación de cítricos como melazas concentradas (valores entre 4.840 y 8.017 mg/kg según muestras) e incluso, en muchos casos, el pellet deshidratado que presentó una riqueza en hesperidina de 18.090 mg/kg según los autores, evidenciando pues el presente trabajo que las membranas pueden ser una fuente para recuperación de flavonoides muy interesante, además de la propia corteza de los frutos.

Del estudio del zumo de mandarina (Tabla 4.8), se observó que el contenido medio de hesperidina obtenido con la exprimidora manual fue de 24,3 mg/100 mL estando este valor alineado con los 24,3 mg/100mL documentados por Gatusso *et al.* (2007). Las diferencias aumentan ligeramente cuando se comparan los datos aportados por este autor con el valor de 31,0 mg/100 mL que se obtuvo en el presente trabajo utilizando un equipo de exprimido industrial, donde las diferencias obtenidas, posiblemente fueran debidas a que los sistemas de doble copa *in-line* suelen presentar un tamaño diseñado para calibres propios de la naranja que por lo general son muy superiores a los calibres comerciales de las mandarinas, lo cual da lugar a un exceso de extracción de compuestos de la corteza que migran al zumo cuando se utiliza este tipo de equipos en mandarinas de menor calibre.

Con relación a las tres FPM analizadas en las distintas muestras de naranjas y mandarinas, nobiletina, tangeretina y sinensetina, al observar con mayor detalle el

contenido de éstas por variedades, se puede apreciar que el subgrupo de las mandarinas híbridas es el que mayor riqueza presenta en flavonas polimetoxiladas. Según los datos de las tablas 4.3 a 4.12, el contenido de las tres FPM del zumo (tablas 4.3 a 4.6) es muy bajo, lo cual era de esperar puesto que estos compuestos forman parte fundamentalmente de la corteza del cítrico, tal y como se ha comentado anteriormente. Por ello el contenido de FPM en las membranas del endocarpio (tablas 4.9 y 4.11) es ligeramente mayor que en el zumo y donde más abundan es en la corteza (tablas 4.10 y 4.12). En cualquiera de los casos, de entre todas muestras analizadas, son las correspondientes a las variedades Orri, Nadorcott y Ortanique las que mayor riqueza tienen en estos compuestos. Así, el máximo valor registrado en zumo fue de $3,64 \pm 0,13$ mg Nob/kg zumo en la variedad Ortanique tardía, $1,28 \pm 0,10$ mg Tan/kg zumo también en la variedad Ortanique tardía y $1,33 \pm 0,05$ mg Sin/kg zumo en la variedad Orri tardía. Para el caso de las muestras de membranas del endocarpio, en toda la serie de datos para las 12 variedades objeto de estudio, los valores más altos que se encontraron fueron $24,7 \pm 3$ mg de Nob/kg en la variedad Orri temprana, $5,3 \pm 0,9$ mg de Tan/kg en la variedad Ortanique temprana y $8,8 \pm 0,9$ mg Sin/kg en la variedad Orri temprana. Y finalmente, los resultados en la corteza de todas las muestras, para las 12 variedades analizadas, encontraron sus contenidos máximos por kg también en muestras de variedades híbridas, al detectarse niveles muy elevados de nobiletina en corteza de las variedades tempranas Orri, Nadorcott y Ortanique (Tabla 4.12), de 1.760 mg/kg, 1.882 mg/kg y 1.837 mg/kg, respectivamente, así como niveles elevados de tangeretina en Ortanique y Nadorcott (939 mg/kg y 754 mg/kg, respectivamente) y elevados niveles de sinensetina en variedad Orri tanto temprana (647 mg/kg) como tardía (802 mg/kg) así como contenidos de esta misma flavona considerables en Ortanique (558 – 581 mg/kg). Los trabajos revisados en este sentido están centrados mayormente en el contenido en flavonoides del zumo de mandarina (Gattuso et al., 2007 y Abad-García et al., 2014) y aquellos que sí estudian el contenido de los mismos en tejidos como son membranas o cortezas (Abeyasinghe et al., 2007 o Peterson et al., 2006), se centran en las formas glucósido de los flavonoides y no en las polimetoxiladas. El único dato aproximado de contenido de las tres FPM objeto de estudio en corteza de mandarina es el que ofrece Nogata et al. (2006) que muestra un contenido de 1.100 mg Nob y 1.240 mg Tan/kg en

la variedad Ponkan de *Citrus reticulata*. Pero ante todo es conveniente resaltar el hecho de que en ninguno de los estudios encontrados se realiza un análisis en profundidad de las variedades híbridas de mandarina Orri, Nadorcott y Ortanique, de gran importancia para la citricultura mediterránea y comercialmente muy presentes en todo el mundo.

Para cada uno de los flavonoides analizados, se realizó un primer análisis estadístico con el fin de estudiar la significación de las diferencias observadas en estos compuestos entre naranjas y mandarinas. Para ello se consideraron los factores partes del fruto (zumo manual, zumo industrial, membranas y corteza), estado de maduración (temprano y tardío) y variedades de fruta (las 6 de naranja y las 6 de mandarina). En el anexo 1 se muestran los resultados del ANOVA correspondiente. Respecto a las dos flavanonas mayoritarias, hesperidina y narirutina, no se observaron tendencias claras que separaran las dos especies cítricas estudiadas, sino que el ANOVA dividió los datos en diferentes grupos homogéneos que incluían, cada uno de ellos, tanto variedades de naranja como de mandarina. Únicamente en el caso de la narirutina, y al contrario de lo que ocurrió con la hesperidina, se observó que las variedades de mandarina híbridas presentaron mayor contenido en este compuesto que las no híbridas.

Tabla 4.1. Parámetros fisicoquímicos de la fruta indicativos de su estado de madurez en las variedades de naranja: Navelina, Salustiana, Navel, Navel-late, Navel-lane-Late y Sanguinelli.

Parámetros en fruta	Navelina		Salustiana		Navel-late		Navel		Lane-late		Sanguinelli	
	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía								
Acidez (g/L)	14,6 ± 0,2	9,0 ± 0,2	9,3 ± 0,2	7,0 ± 0,2	12,9 ± 0,2	9,2 ± 0,2	9,3 ± 0,2	10,6 ± 0,2	10,1 ± 0,2	8,4 ± 0,2	7,0 ± 0,2	10,9 ± 0,2
°Brix (g/100g fase líquida)	12,4 ± 0,2	12,0 ± 0,2	11,7 ± 0,2	12,2 ± 0,2	12,9 ± 0,2	11,9 ± 0,2	10,7 ± 0,2	11,0 ± 0,2	10,8 ± 0,2	12,0 ± 0,2	10,1 ± 0,2	11,8 ± 0,2
Índice de Madurez (IM)	8,5 ± 0,2	13,3 ± 0,2	12,6 ± 0,2	17,3 ± 0,2	10,0 ± 0,2	13,0 ± 0,2	11,5 ± 0,2	10,4 ± 0,2	10,7 ± 0,2	14,3 ± 0,2	14,4 ± 0,2	10,8 ± 0,2
Contenido en zumo (g/100g)	49 ± 3	42 ± 3	49 ± 1	46 ± 1	50 ± 3	49 ± 4	49 ± 3	48 ± 3	46 ± 3	53 ± 4	46 ± 3	51 ± 3

Tabla 4.2. Parámetros fisicoquímicos de la fruta indicativos de su estado de madurez en las variedades de mandarina: Oronules, Clemenpons, Clemenules, Orri, Ortanique y Nadorcott.

Parámetros en fruta	Oronules		Clemenpons		Clemenules		Orri		Ortanique		Nadorcott	
	Temprana	Tardía										
Acidez (g/L)	11,5 ± 0,2	7,5 ± 0,2	11,6 ± 0,2	9,1 ± 0,2	6,0 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,4 ± 0,2	6,1 ± 0,2	12,9 ± 0,2	11,5 ± 0,2	12,3 ± 0,2	4,8 ± 0,2
°Brix (g/100g fase líquida)	11,5 ± 0,2	10,6 ± 0,2	10,3 ± 0,2	11,4 ± 0,2	9,5 ± 0,2	11,6 ± 0,2	11,8 ± 0,2	12,9 ± 0,2	12,2 ± 0,2	13,5 ± 0,2	12,9 ± 0,2	9,6 ± 0,2
Índice de Madurez (IM)	10,0 ± 0,2	14,2 ± 0,2	8,9 ± 0,2	12,6 ± 0,2	15,8 ± 0,2	18,2 ± 0,2	18,3 ± 0,2	21,1 ± 0,2	9,4 ± 0,2	11,7 ± 0,2	10,6 ± 0,2	20,1 ± 0,2
Contenido en zumo (g/100g)	50 ± 3	47 ± 3	46 ± 3	50 ± 3	49 ± 2	40 ± 4	48 ± 3	55 ± 3	57 ± 2	59 ± 2	47 ± 2	45 ± 3

En el caso de la diosmina resultó llamativo que fueron las tres variedades de mandarina no híbridas Oronules, Clemenpons y Clemenules las que presentaron un contenido muy superior de este flavonoide en comparación con el resto de las variedades de naranja y de mandarina híbrida. Sin embargo, en cuanto a las flavonas polimetoxiladas, este mismo análisis estadístico determinó que la tangeretina se encuentra en cantidades muy superiores ($p < 0,05$) en los híbridos de mandarina, especialmente las variedades Ortanique y Nadorcott. De forma similar, la nobiletina presenta niveles significativamente más altos en las tres variedades de mandarina híbrida (Orri, Ortanique y Nadorcott). En el caso de la sinensetina, aunque presenta las medias más altas para los híbridos de mandarina Orri y Ortanique, en este caso el ANOVA encontró que su contenido en la variedad Orri fueron significativamente mayor ($p < 0,05$).

Por otra parte, en el mismo anexo 1 puede observarse como todas las flavanonas analizadas se encontraron en mayor cantidad en las variedades tempranas que en las tardías ($p < 0,05$), excepto en el caso de la narirutina que, aunque sigue la misma tendencia, las diferencias no fueron significativas. Por su parte, los dos zumos mostraron en todos los casos contenidos similares ($p > 0,05$) de todos los compuestos, menor que el de las membranas, de manera significativa en el caso de hesperidina, narirutina y diosmina ($p < 0,05$) y también, en todos los casos, significativamente menor que el de las cortezas ($p < 0,05$).

Como se ha podido comprobar con el análisis estadístico realizado a las flavanonas estudiadas, en general, el contenido en estos compuestos no permite establece diferencias claras entre naranjas y mandarinas, sino que éste depende de la variedad. Pero, además, a nivel industrial, es claro el interés de considerar cada una de las especies como un grupo diferente de la otra. Por un lado, el sector comercializador de cítricos para consumo en fresco, hace una división comercial absoluta entre naranjas (*Citrus sinensis*) y mandarinas (*Citrus reticulata*), incluyendo este último, a su vez, a los subgrupos de las clementinas y los híbridos de mandarina. Pero esta separación es, si cabe, más acentuada cuando se hace un análisis desde el prisma de la industria de transformación puesto que tanto la legislación europea de zumos (Directiva 2012/12/UE), como las normas sectoriales de la industria de zumo para naranja y

mandarina (A.I.J.N., 2016 y 2018), no permiten la mezcla entre especies botánicas por muy similares que pudieran ser aspectos fundamentales como el sensorial, nutricional o fisicoquímico, tal y como ocurre con naranjas y mandarinas. Asimismo, estas normas establecen que en caso de que el zumo de ambas especies botánicas se mezclase, tendría que ir declarada la cantidad de cada una en la etiqueta del producto. Tales normas, dan lugar al desarrollo de una gran cantidad de controles de autenticidad basados en una serie de parámetros analíticos que permitan detectar la presencia de zumo de mandarinas en el de naranja, práctica considerada fraudulenta si no viene debidamente declarada en la etiqueta del producto. Como consecuencia de esto, en la industria de transformación de cítricos para obtención de zumos, la segregación entre estas dos especies es absoluta en todo el proceso para evitar mezclas no deseadas de ambas. Asimismo, el hecho de que comercialmente la naranja y sus derivados sean el sabor predominante en el mercado de zumos y bebidas refrescantes a nivel global, y por el contrario la mandarina sea un sabor minoritario, hace que muchas industrias de transformación de cítricos procesen únicamente naranja, quedando el procesado de mandarina relegada prácticamente a unos pocos transformadores españoles lo cual hace todavía más interesante realizar el análisis por separado.

En este sentido, se quiso estudiar las diferencias entre las dos frutas, pero teniendo en cuenta, además, la parte del fruto y el estado de maduración. Para ello, en este caso, se agruparon todas las variedades de cada especie y se consideró el factor fruta con dos niveles, naranja y mandarina. Con los tres factores mencionados, se hicieron los análisis de la varianza multifactoriales correspondientes para cada compuesto, cuyos resultados se presentan en los anexos 2 al 7. En el caso de la narirutina (anexo 2) se observó un efecto significativo ($p < 0,05$) de los factores fruta y parte del fruto, así como de su interacción, pero no del estado de maduración ($p > 0,05$). Así, se observó que las naranjas presentan un contenido significativamente mayor que las mandarinas ($p < 0,05$). Por su parte, la corteza muestra mayor contenido que las membranas del endocarpio ($p < 0,05$) y, a su vez, éstas mayor que el zumo ($p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre el zumo extraído de forma manual o industrial ($p > 0,05$). No obstante, la interacción observada lo que nos dice es que, para el caso de la naranja, el zumo

exprimido industrialmente presenta menor contenido en narirutina que el obtenido manualmente ($p < 0,05$), mientras que, en cambio, en la mandarina, es el zumo extraído con equipo industrial el que presenta más riqueza ($p < 0,05$) en este flavonoide. Este hecho podría tener sentido debido a que los sistemas de extracción industriales de *tipo in-line* tienen un tamaño de copa dimensionado al calibre de las naranjas y no tanto al de las mandarinas, considerablemente más pequeñas, por lo que cuando se produce el exprimido de estas últimas el exceso de compresión en el pericarpio hace que migren más componentes de la corteza al zumo que cuando se exprimen naranjas.

Este mismo ANOVA con los 3 factores para la hesperidina (anexo 3) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) debidas a cada uno de ellos y también de interacciones significativas ($p < 0,05$) entre los factores fruta y parte del fruto, así como entre parte del fruto y estado de maduración. En concreto se ve que, igual que ocurre con la narirutina, el contenido en hesperidina de las naranjas es mayor que el de las mandarinas y que es mayor en la corteza que las membranas del endocarpio y, en éstas, mayor que en los zumos, sin diferencias entre ellos ($p < 0,05$). Sin embargo, en este caso también se observa que este flavonoide es más abundante ($p < 0,05$) en frutos de recolección temprana que, en los tardíos, especialmente en la corteza y en el endocarpio. Este hecho iría en línea con los datos aportados por autores como Omidbaigi *et al.* (2004) quienes concluyeron en su estudio que los frutos cítricos en periodos tempranos de maduración presentaban contenidos de hesperidina más elevados. Asimismo, otros autores como Hendrickson *et al.* (1962) ya habían evidenciado que la extracción de hesperidina a partir de naranjas de la variedad Valencia era más elevada y de mayor pureza cuando se realizaba a partir de frutos inmaduros y que este contenido de hesperidina disminuía con la maduración del fruto. La interacción fruta-parte del fruto, de nuevo nos indica que si bien para el caso de la naranja, el zumo exprimido industrialmente presenta menor contenido en hesperidina que el obtenido manualmente, en la mandarina es el zumo extraído con equipo industrial el que presenta más riqueza en este flavonoide. La misma justificación dada para la narirutina explicaría estas diferencias.

El ANOVA con los 3 factores para la nobiletina (anexo 4), tangeretina (anexo 5) y diosmina (anexo 6) puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los factores fruta y parte del fruto, así como de su interacción, pero no por el estado de maduración ($p > 0,05$). No obstante, lo que se observa en este caso, es que el contenido en estos compuestos de las naranjas es menor que el de las mandarinas, justo al contrario de lo observado con la narirutina y hesperidina. Si bien los datos de estos flavonoides minoritarios son escasos en bibliografía, Gatusso *et al.* (2007) sí que reportó en un trabajo realizado con muestras de zumo que, mientras la hesperidina y narirutina estaban presentes en mayor cantidad en el zumo de naranja, por el contrario, el zumo de mandarina era más rico en tangeretina y sinensetina, no aportando ningún dato de diosmina. Por otra parte, aunque también en este caso el contenido en estos flavonoides es mayor en la corteza que las membranas del endocarpio, para el caso de las membranas la riqueza de estos similar al de los zumos, sin diferencias entre los tres ($p < 0,05$). La interacción fruta-parte del fruto, de nuevo nos indica que mientras para el caso de la naranja el zumo exprimido industrialmente presenta menor contenido en diosmina que el obtenido manualmente, en cambio, en la mandarina es el zumo extraído con equipo industrial el que presenta más riqueza en este flavonoide. La misma justificación dada para la hesperidina y narirutina explicaría estas diferencias. Para la nobiletina y tangeretina, compuestos presentes en mucha menor cantidad, en el caso de la naranja las diferencias entre los 2 zumos no llegan a ser significativas, mientras que para la mandarina se vuelve a observar como el zumo industrial extrae más de este componente que el manual.

En el caso de la sinensetina (anexo 7), no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) ni entre frutas ni por el estado de maduración. El único factor significativo ($p < 0,05$) fue la parte de la fruta, de manera que, de nuevo, el contenido en este flavonoide fue mayor en la corteza que en las membranas o los zumos que no presentaron diferencias entre ellos.

En resumen, los análisis estadísticos realizados para los distintos compuestos son coincidentes en que, en general, la naranja presenta mayor contenido en narirutina y hesperidina, flavonoides mayoritarios, que las variedades de mandarina. Además, el contenido de flavonoides presente en la corteza es de forma significativa superior al

encontrado en las membranas del endocarpio y muy superior a los niveles en el zumo. Este hecho era de esperar puesto que la mayoría de los flavonoides de los frutos cítricos se encuentran de forma natural alojados de mayormente en el albedo del fruto (López, 1995). La causa de que existan cantidades de estos compuestos en el zumo es debida a la incorporación de pequeños fragmentos de tejidos que tienen lugar durante la operación de exprimido, contribuyendo a lo que se denomina formación de la nube o *cloud* que confieren la opacidad característica de los zumos cítricos, en contraposición al aspecto clarificado que presentan típicamente otros zumos como son el de manzana o el mosto de uva. Por otra parte, el momento de la recolección sólo afecta al contenido en hesperidina de la corteza, que disminuye cuando avanza la maduración. Por su parte, respecto a los compuestos minoritarios, llama la atención que son las variedades no híbridas las que mayor contenido en diosmina presentan, pero son las mandarinas híbridas las que han registrado una mayor riqueza en las flavonas polimetoxiladas nobiletina, tangeretina y sinensetina.

Tabla 4.3. Cuantificación de flavonoides en muestras de zumo obtenido con exprimidora manual a partir de las variedades de naranja Navelina, Salustiana, Navel, Navel-late, Navel-late-late y Sanguinelli^a.

Compuesto	Navelina		Salustiana		Navel-late		Navel		Lane-late		Sanguinelli	
	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía								
Narirutina	92,6 ± 0,3	115,2 ± 0,3	67,3 ± 0,3	64,6 ± 0,2	82,1 ± 0,3	81,4 ± 0,2	86,0 ± 0,3	83,1 ± 0,3	97,4 ± 0,4	64,3 ± 0,3	28,6 ± 0,1	21,8 ± 0,1
Hesperidina	334,6 ± 1,1	356,0 ± 1,4	326,0 ± 1,2	344,7 ± 1,1	316,1 ± 1,1	385,5 ± 1,5	295,7 ± 0,9	277,0 ± 1,1	313,6 ± 0,8	275,8 ± 1,1	303,1 ± 1,2	269,9 ± 1
Sinensetina	0,68 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,21 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,10 ± 0,01	ND	ND
Nobiletina	0,53 ± 0,03	0,40 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,09 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,53 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,11
Tangeretina	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	ND	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	ND	0,2 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09
Diosmina	1,2 ± 0,1	ND	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	ND	2,6 ± 0,2	ND	ND	ND	1,3 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1

^a Los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan en mg/l. ND: No detectado.

Tabla 4.4. Cuantificación de flavonoides en muestras de zumo obtenido con exprimidora industrial a partir de las variedades de naranja Navelina, Salustiana, Navel, Navel-late, Navel-late-late y Sanguinelli^a.

Compuesto	Navelina		Salustiana		Navel-late		Navel		Lane-late		Sanguinelli	
	Temprana	Tardía										
Narirutina	51,0 ± 0,2	67,7 ± 0,3	55,9 ± 0,2	55,4 ± 0,2	42,2 ± 0,2	48,9 ± 0,2	65,4 ± 0,2	43,8 ± 0,2	61,2 ± 0,3	33,5 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,2 ± 0,1
Hesperidina	193,4 ± 1,0	294,3 ± 1,0	324,1 ± 1,1	338,4 ± 1,1	178,3 ± 0,9	230,5 ± 1,2	306,9 ± 1,1	212,3 ± 1,2	277,9 ± 1,0	140,2 ± 1,2	431,8 ± 2,5	318,2 ± 2,1
Sinensetina	0,41 ± 0,05	0,48 ± 0,03	0,58 ± 0,03	0,24 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,28 ± 0,02	0,54 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Nobiletina	0,56 ± 0,03	0,70 ± 0,03	0,77 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,29 ± 0,01	0,43 ± 0,04	0,88 ± 0,04	0,41 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,36 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,15 ± 0,01
Tangeretina	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,0 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,06 ± 0,01
Diosmina	0,82 ± 0,09	0,68 ± 0,05	1,22 ± 0,12	1,10 ± 0,05	ND	1,51 ± 0,11	ND	0,58 ± 0,04	0,65 ± 0,05	ND	0,88 ± 0,05	0,91 ± 0,09

^a Los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan en mg/l. ND: No detectado.

Tabla 4.5 Cuantificación de flavonoides en muestras de zumo obtenido con exprimidora manual a partir de las variedades de mandarina Oronules, Clemenpons, Clemenules, Orri, Ortanique y Nadorcott^a.

Compuesto	Oronules		Clemenpons		Clemenules		Orri		Ortanique		Nadorcott	
	Temprana	Tardía										
Narirutina	18,7 ± 0,2	13,1 ± 0,1	29,6 ± 0,3	19,9 ± 0,3	22,1 ± 0,3	35,0 ± 0,3	94,3 ± 0,4	86,8 ± 0,2	64,8 ± 0,4	83,0 ± 0,4	75,6 ± 0,2	55,4 ± 0,2
Hesperidina	359,0 ± 1,3	223,8 ± 0,9	254,3 ± 1,1	205,0 ± 1,1	205,8 ± 0,9	347,5 ± 1,3	274,5 ± 1,2	342,4 ± 1,1	164,5 ± 0,9	203,6 ± 1,0	164,2 ± 1	175,9 ± 1,3
Sinensetina	0,07 ± 0,01	ND	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,02 ± 0,01	ND	0,59 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,46 ± 0,04	0,40 ± 0,02	ND	ND
Nobiletina	0,42 ± 0,03	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,13 ± 0,01	1,38 ± 0,05	0,55 ± 0,02	1,27 ± 0,03	1,26 ± 0,03	0,58 ± 0,01	0,65 ± 0,02
Tangeretina	0,25 ± 0,02	0,06 ± 0,01	ND	ND	ND	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,12 ± 0,01	0,65 ± 0,03	0,53 ± 0,02	0,30 ± 0,02	0,3 ± 0,01
Diosmina	6,4 ± 0,5	4,9 ± 0,3	3,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,1	2,9 ± 0,2	3,0 ± 0,2	1,9 ± 0,3	ND	1,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,8 ± 0,1

^a Los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan en mg/l. ND: No detectado.

Tabla 4.6 Cuantificación de flavonoides en muestras de zumo obtenido con exprimidora industrial a partir de las variedades de mandarina Oronules, Clemenpons, Clemenules, Orri, Ortanique y Nadorcott^a.

Compuesto	Oronules		Clemenpons		Clemenules		Orri		Ortanique		Nadorcott	
	Temprana	Tardía										
Narirutina	41,0 ± 0,2	23,5 ± 0,1	25,0 ± 0,2	24,1 ± 0,2	25,2 ± 0,3	31,1 ± 0,2	93,1 ± 0,1	129,0 ± 0,7	45,5 ± 0,2	74,1 ± 0,4	91,5 ± 0,4	57,2 ± 0,2
Hesperidina	542,9 ± 1,2	374,4 ± 1,3	290,7 ± 1,2	289 ± 1,1	290,5 ± 1,1	398,0 ± 1,2	288,7 ± 2,4	416,5 ± 1,9	136,9 ± 0,9	213,0 ± 1,0	239,0 ± 1,2	239,2 ± 1,1
Sinensetina	0,03 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,69 ± 0,03	1,33 ± 0,05	0,94 ± 0,02	1,20 ± 0,04	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Nobiletina	0,19 ± 0,01	0,65 ± 0,02	1,52 ± 0,03	1,17 ± 0,04	0,62 ± 0,01	0,54 ± 0,03	1,80 ± 0,04	3,00 ± 0,11	2,67 ± 0,12	3,64 ± 0,13	1,98 ± 0,1	1,26 ± 0,05
Tangeretina	0,07 ± 0,01	0,26 ± 0,03	0,44 ± 0,03	0,80 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,35 ± 0,02	1,09 ± 0,09	1,28 ± 0,10	0,86 ± 0,07	0,39 ± 0,05
Diosmina	11,6 ± 0,7	5,7 ± 0,3	3,8 ± 0,3	4,1 ± 0,3	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2	3,4 ± 0,3	3,3 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,3 ± 0,3	0,7 ± 0,2

^a Los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan en mg/L.

Tabla 4.7. Valores máximos, mínimo y medio (con su desviación estándar, DE) de flavonoides del zumo de naranja de todas las variedades estudiadas (g/100mL) según la extracción se obtenga con exprimidora manual o industrial.

Compuesto	Muestras extraídas con equipo industrial				Muestras extraídas con equipo manual			
	Media	DE	Min.	Max	Media	DE	Min.	Max
Narirutina	4,8	1,5	23,2	67,7	7,4	2,7	21,8	115,2
Hesperidina	27,1	8,2	140,2	431,8	31,6	3,5	269,9	385,5
Sinensetina	0,03	0,02	0,04	0,6	0,02	0,02	0,05	0,68
Nobiletina	0,05	0,02	0,15	0,88	0,02	0,02	0,08	0,53
Tangeretina	0,010	0,003	0,1	0,18	0,01	0,003	0,05	0,11
Diosmina	0,09	0,03	0,6	1,5	0,14	0,06	0,9	2,6

Tabla 4.8. Valores máximos, mínimo y medio (con su desviación estándar, DE) de flavonoides del zumo de mandarina de todas las variedades estudiadas (g/100mL) según la extracción se obtenga con exprimidora manual o industrial.

Compuesto	Muestras extraídas con equipo industrial				Muestras extraídas con equipo manual			
	Media	DE	Min.	Max	Media	DE	Min.	Max
Narirutina	5,50	3,47	2,4	12,9	5,0	3,0	1,31	9,4
Hesperidina	31,0	10,8	13,7	54,3	24,3	7,20	16,4	35,9
Sinensetina	0,05	0,05	0,00	0,13	0,02	0,02	0,002	0,06
Nobiletina	0,16	0,11	0,02	0,36	0,06	0,05	0,01	0,14
Tangeretina	0,05	0,04	0,01	0,13	0,03	0,02	0,006	0,07
Diosmina	0,35	0,29	0,07	1,16	0,28	0,17	0,08	0,6

Tabla 4.9. Cuantificación de flavonoides en muestras de membranas extraídas del endocarpio de las variedades de naranja Navelina, Salustiana, Navel-late, Navel, Navel-lane-late y Sanguinelli^a.

Compuesto	Navelina		Salustiana		Navel-late		Navel		Lane-late		Sanguinelli	
	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía
Narirutina	4223 ± 116	5816 ± 170	2074 ± 58	1498 ± 58	3795 ± 97	2333 ± 99	3700 ± 112	7510 ± 117	4672 ± 144	2314 ± 78	759 ± 23	884 ± 39
Hesperidina	15585 ± 543	19468 ± 683	5972 ± 202	6949 ± 233	11662 ± 338	7355 ± 230	13887 ± 440	30495 ± 711	18683 ± 632	6746 ± 194	5505 ± 172	7951 ± 213
Sinensetina	5,5 ± 0,2	5,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	2,9 ± 0,3	1,0 ± 0,1	3,3 ± 0,3	4,4 ± 0,4	2,9 ± 0,3	7,8 ± 0,8	2,4 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Nobiletina	4,8 ± 0,8	7,0 ± 1,2	2,2 ± 0,5	5,7 ± 0,9	1,6 ± 0,5	4,9 ± 0,8	7,6 ± 1,0	4,6 ± 0,8	10,7 ± 1,1	5,0 ± 0,8	4,0 ± 0,8	4,4 ± 0,9
Tangeretina	1,4 ± 0,2	1,9 ± 0,4	ND	2,8 ± 0,5	2,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	2,7 ± 0,3	1,2 ± 0,2	3,3 ± 0,4	1,8 ± 0,3	2,3 ± 0,3	2,5 ± 0,3
Diosmina	32,0 ± 1,0	21,0 ± 0,7	8,2 ± 0,2	ND	15,7 ± 0,3	18,1 ± 0,5	ND	50,4 ± 1,4	22,3 ± 0,6	12,6 ± 0,4	16,4 ± 0,4	22,3 ± 0,5

^a Los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan en mg/kg. ND: No detectado.

Tabla 4.10. Cuantificación de flavonoides en muestras de corteza extraídas del endocarpio de las variedades de naranja Navelina, Salustiana, Navel-late, Navel, Navel-lane-late y Sanguinelli^a.

Compuesto	Navelina		Salustiana		Navel-late		Navel		Lane-late		Sanguinelli	
	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía
Narirutina	8558 ± 341	4817 ± 162	5034 ± 184	4927 ± 203	3922 ± 127	3599 ± 147	5186 ± 190	5261 ± 183	4019 ± 174	2798 ± 83	2049 ± 57	1703 ± 65
Hesperidina	61674 ± 1287	36113 ± 744	41253 ± 883	29526 ± 442	33069 ± 809	25340 ± 388	48992 ± 1031	46856 ± 1007	42348 ± 704	19512 ± 506	42145 ± 913	27986 ± 698
Sinensetina	576 ± 13	273 ± 8	573 ± 12	380 ± 8	202 ± 5	251 ± 7	496 ± 15	326 ± 9	382 ± 11	414 ± 14	105 ± 3	80 ± 3
Nobiletina	871 ± 29	417 ± 20	778 ± 25	589 ± 23	338 ± 10	465 ± 18	878 ± 30	568 ± 18	560 ± 28	600 ± 18	277 ± 8	213 ± 6
Tangeretina	93 ± 8	68 ± 9	109 ± 10	93 ± 11	44 ± 3	56 ± 4	129 ± 10	66 ± 5	78 ± 10	87 ± 16	44 ± 5	44 ± 3
Diosmina	534 ± 33	251 ± 12	169 ± 7	124 ± 7	221 ± 7	156 ± 12	382 ± 20	309 ± 17	214 ± 11	99 ± 4	182 ± 8	98 ± 4

^a Los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan en mg/kg. ND: No detectado.

Tabla 4.11. Cuantificación de flavonoides en muestras de membranas extraídas del endocarpio de las variedades de mandarina Oronules, Clemenpons, Clemenules, Orri, Ortanique y Nadorcott.

Compuesto	Oronules		Clemenpons		Clemenules		Orri		Ortanique		Nadorcott													
	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía												
Narirutina	1347	± 48	500	± 25	1210	± 39	630	± 18	2595	± 46	1930	± 51	3173	± 87	4506	± 119	1685	± 75	2762	± 80	4324	± 81	3759	± 96
Hesperidina	16797	± 506	4673	± 184	9447	± 422	4967	± 178	17128	± 525	7313	± 232	7369	± 233	8544	± 220	3977	± 169	4559	± 165	6314	± 297	8715	± 280
Sinensetina	1,4	± 0,1	0,9	± 0,1	0,6	± 0,1	0,9	± 0,2	1,5	± 0,2	0,5	± 0,1	8,8	± 0,9	3,7	± 0,6	5,5	± 0,7	5,5	± 0,7	0,5	± 0,1	0,1	± 0,0
Nobiletina	8,1	± 1,1	1,9	± 0,6	1,6	± 0,4	2,7	± 0,7	5,3	± 0,8	2,4	± 0,5	24,7	± 3,0	9,2	± 1,0	18,0	± 2,3	19,4	± 2,6	8,2	± 1,0	7,2	± 0,8
Tangeretina	5,0	± 0,7	1,6	± 0,2	0,7	± 0,2	ND		1,4	± 0,1	0,8	± 0,2	2,2	± 0,3	0,7	± 0,1	5,3	± 0,9	4,1	± 0,6	2,4	± 0,3	1,3	± 0,2
Diosmina	222,8	± 7,7	13,0	± 0,5	87,2	± 2,2	21,3	± 0,8	124,3	± 2,4	96,3	± 3,1	35,9	± 0,9	13,6	± 0,6	19,2	± 0,9	20,1	± 0,7	38,1	± 1,0	11,5	± 0,

^a Los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan en mg/kg.

Tabla 4.12. Cuantificación de flavonoides en muestras de corteza extraídas del endocarpio de las variedades de mandarina Oronules, Clemenpons, Clemenules, Orri, Ortanique y Nadorcott.

Compuesto	Oronules		Clemenpons		Clemenules		Orri		Ortanique		Nadorcott													
	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía	Temprana	Tardía												
Narirutina	1528	± 56	1036	± 23	1735	± 64	2413	± 72	1689	± 89	1336	± 55	3809	± 128	5596	± 206	4804	± 159	5082	± 213	6055	± 211	2929	± 132
Hesperidina	40696	± 744	37818	± 734	41038	± 807	41685	± 813	46194	± 806	51146	± 1105	18340	± 499	22513	± 597	16659	± 496	11560	± 367	21968	± 638	19579	± 602
Sinensetina	60	± 1	63	± 2	121	± 6	132	± 4	128	± 4	78	± 1	647	± 11	802	± 14	558	± 15	518	± 10	129	± 3	120	± 2
Nobiletina	296	± 7	307	± 8	554	± 19	470	± 7	477	± 12	318	± 10	1760	± 461	1689	± 40	1837	± 48	1786	± 51	1882	± 46	1962	± 72
Tangeretina	115	± 9	100	± 13	83	± 10	78	± 9	106	± 6	96	± 7	257	± 21	177	± 12	939	± 75	878	± 71	754	± 61	633	± 47
Diosmina	777	± 20	932	± 28	910	± 35	801	± 33	919	± 33	1073	± 42	214	± 9	173	± 7	107	± 5	90	± 4	211	± 8	72	± 3

^a Los análisis se realizan por triplicado y los resultados se expresan en mg/kg.

4.2. Recuperación industrial de hesperidina a partir de la corteza resultante del exprimido de frutos cítricos.

Como se ha descrito en la metodología, se hizo un ensayo para optimizar la cantidad de agua a utilizar para la extracción de la hesperidina, debido a las consecuencias que puede presentar, a nivel industrial, la mayor o menor adición de agua al proceso. Así, se realizó un ensayo que utilizaba 2.000 g de agua por cada 1.000 g de materia prima (corteza) y se comparó el resultado con el de un segundo ensayo que utilizaba sólo 250 g de agua por cada 1.000 g de materia prima. En la Tabla 4.13 se describen los principales parámetros de proceso que podrían afectar al resultado de la extracción de hesperidina y, como puede observarse en la misma, salvo la cantidad de agua añadida, el resto de los parámetros influyentes en el proceso, como son el pH de la fase alcalina, pH de la fase ácida, sólidos suspendidos del licor de prensado y temperatura de proceso, se ajustaron de forma idéntica para evitar posibles fuentes de variabilidad en los resultados.

Tabla 4.13. Parámetros de proceso de los procedimientos de recuperación de hesperidina llevados a cabo.

Relación corteza: agua (p/p)	Materia prima (g)	pH fase alcalina	Sólidos del licor ¹ de prensado (%)	Temperatura proceso (°C)	pH fase ácida	Tiempo de precipitación (h)
1:2	1.000	11,3 ± 0,1	< 0,1	20	5,2 ± 0,1	4
1:0,25	1.000	11,3 ± 0,1	< 0,1	20	5,2 ± 0,1	4

¹Sólidos expresados en %0 (v/v) medidos en centrifuga a 3.000 rpm durante 3 minutos.

La hesperidina se obtuvo por extracción acuosa en medio alcalino a partir de la corteza y se forzó su cristalización y separación bajando el pH del licor con ácido cítrico anhidro. El rendimiento de la extracción de la hesperidina se expresó en g de residuo seco por 1000 g de corteza (%). Asimismo, el producto recuperado fue analizado por la técnica de cromatografía líquida para comprobar la riqueza en hesperidina,

expresando el resultado como g de hesperidina por 100 g de extracto obtenido (%).

En este caso se obtuvieron cromatogramas como los mostrados en la figura 4.4.

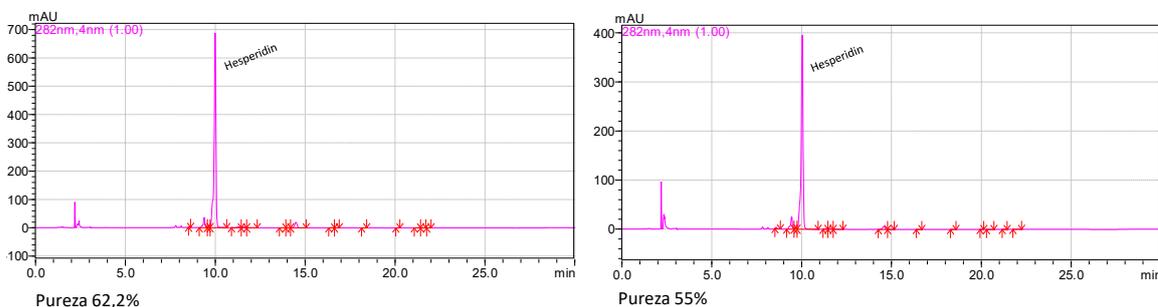


Figura 4.4. Ejemplo de cromatogramas de los extractos de hesperidina obtenidos según la relación corteza:agua empleada en cada proceso: izquierda relación 1:2 y derecha relación 1:0,25.

En la Tabla 4.14 se detalla el balance de materia de ambos procesos en estudio, esto es la cantidad de corteza fresca de partida y el agua incorporada en cada procedimiento, así como los resultados obtenidos al final del proceso, expresados tanto en cantidad de extracto de hesperidina obtenido como en la pureza del mismo, en cada caso.

Tabla 4.14. Resultados de los dos procedimientos de recuperación de hesperidina a partir de corteza.

Relación corteza: agua (p/p)	Materia prima (g)	Agua añadida (g)	Extracto (g extracto/ 1000 g corteza)	Riqueza ¹ (g hesperidina/ 100 g extracto)	Hesperidina pura ² (g)
1 : 2	1.000	2.000	3,15	62,2 ± 1,7	1,96
1 : 0,25	1.000	250	2,54	55,0 ± 2,5	1,40

¹Contenido en hesperidina de los extractos obtenida por análisis triplicado mediante HPLC-UV.

²Hesperidina pura obtenida a partir de los 1.000 g de corteza, calculada a partir de la cantidad (g) de extracto obtenida y la riqueza (g/100g).

En la Tabla 4.14 se observa que la cantidad de extracto obtenido añadiendo 250 g de agua a los 1000 g de corteza es de 2,54 g. Cuando la incorporación de agua se incrementa a los 2.000 g por cada 1.000 g de corteza, es mayor la cantidad de residuo

seco obtenido, registrando un valor de 3,15 g de extracto por kg de corteza. Esto es un 19,4% más de residuo obtenido cuando se emplea un aporte de agua mayor durante la extracción. La mayor recuperación puede ser debida a que el incremento en la cantidad de agua añadida facilite la disolución de la hesperidina en la fase alcalina, además de otros compuestos presentes en la corteza, mientras que cuando se utiliza menos agua, la saturación del agua con el analito supondría una menor cantidad de compuestos disueltos.

Para determinar el impacto real de las diferencias encontradas por ambos métodos de extracción, con los datos de ambos experimentos se realizó un ANOVA simple utilizando como única variable el factor de la relación corteza:agua (factor dilución) utilizada en el proceso de extracción. Como resultado de este análisis estadístico se observó que, pese a las diferencias observadas y comentadas, no había diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la cantidad de extracto obtenido por el método que utiliza mayor proporción de agua durante la extracción con respecto al que emplea sustancialmente menos cantidad de agua (ver Anexo 8).

Respecto a la pureza en hesperidina de los extractos obtenidos (Tabla 4.14), ésta fue del 62,2% cuando se empleó más agua para la extracción y del 55% en el otro caso. El ANOVA realizado con estos datos sí que confirmó una significativa mayor pureza en hesperidina del extracto obtenido con el método de extracción que incorpora 2.000 g de agua por 1.000 g de corteza con respecto al que incorpora solamente 250 g de agua por 1000 g de corteza ($p < 0,05$, Anexo 9).

El resultado del análisis composicional realizados a ambos extractos de hesperidina aparece en la Tabla 4.15. Del análisis de estos resultados se concluye que algunos otros constituyentes de los extractos obtenidos, a parte de la propia hesperidina son, por orden decreciente: proteínas (medidas como nitrógeno Kjeldahl), azúcares propios de los cítricos como son sacarosa, glucosa y fructosa, pectinas cítricas (expresadas como ácido monogalacturónico), cenizas (donde predominan los iones calcio y sodio) y agua. La diferencia más importante se observa en cuanto a las pectinas totales, que parecen extraerse más cuando se utiliza menos agua. Asimismo, además de los compuestos

detallados en la tabla 4.14, entre los compuestos químicos que conforman ambos extractos habría que incluir otros componentes típicos de la corteza de los cítricos como son: celulosas, hemicelulosas, terpenos, otros flavonoides y minerales como el potasio o fósforo.

Tabla 4.15. Composición nutricional expresada en g/100g según el procedimiento de extracción haya sido con relación corteza agua 1:0,25 o 1:2

	Relación 1:0,25	Relación 1:2
Hesperidina	55	62,2
Proteínas	10,5	10,6
Pectinas totales	4,9	1,7
Agua	3,2	3
Cenizas	2	3,7
Sacarosa	2,3	2,6
Fructosa	1,5	1,6
Glucosa	0,9	1,2
Sodio (Na)	0,8	0,6
Calcio Na	0,6	0,5

En la figura 4.5 se muestran fotos de los extractos de hesperidina obtenidos por ambos métodos, donde se observa un color ligeramente más claro en la muestra obtenida con relación 1:2 debido a que la hesperidina pura, al tener color blanco, confiere esta tonalidad más clara a los extractos de mayor pureza.

Finalmente, debido a que para realizar el estudio para la recuperación industrial de hesperidina hay que calcular el rendimiento basado en t de hesperidina pura obtenida al final del proceso, se calculó la hesperidina pura al 100% que se recuperaría según el procedimiento de extracción utilizado. Estos valores se calcularon a partir de la pureza (%) de cada residuo seco y la cantidad de residuo bruto obtenido en cada uno de los dos ensayos. En la Tabla 4.14 aparecen estos datos y se observa que la extracción con 2.000 g de agua incorporada genera 1,96 g frente al valor de 1,40 g de hesperidina pura que se recuperarían utilizando 250 g de agua en el proceso de extracción. Al realizar un análisis estadístico de estos datos mediante un ANOVA simple con el factor hesperidina pura obtenida de dicho análisis estadístico se concluye que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambos métodos de extracción (Anexo 10).

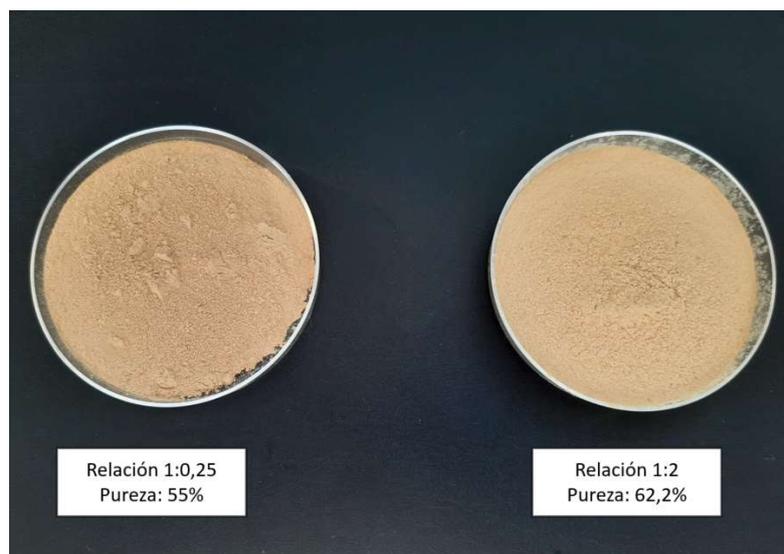


Figura 4.5. Fotos de los extractos de hesperidina obtenidos por los métodos de recuperación con relación corteza:agua 1:0.25 y 1:2.

La ratio de recuperación de 3,15 g de extracto por kg de corteza cuando la extracción se realizó con relación corteza:agua de 1:2 (p/p), fue muy próxima a los valores encontrados en bibliografía (López, 1995 y Hendrickson et al., 1964). El valor de 4,5 g/kg que describe El-Nawawi (1995) empleando para la extracción una relación corteza:agua de 1:1,5 (p/p), fue algo superior a los 3,15 y 2,54 registrados en este estudio para las relaciones corteza: agua 1:2 (p/) y 1:0,25 (p/p), respectivamente. Sin embargo, el extracto obtenido por este autor presentó una pureza del 46% que es considerablemente inferior a la pureza del 62,2% y 55,2% obtenido en el presente estudio, según la extracción fuera realizada con 2.000 g o 250 g de agua por kg de corteza respectivamente. No obstante, si se referencian los datos a hesperidina pura recuperada, el presente procedimiento dio un rendimiento en hesperidina pura de 1,96 g/kg de corteza y 1,4 g/kg de corteza según se utilicen 2.000 g ó 250 g de agua de extracción respectivamente, frente a los 2,1 g/kg que obtuvo el citado autor lo cual estaría en un mismo orden de magnitud.

4.3. Valoración a nivel industrial de los procedimientos de obtención de hesperidina a partir de la corteza resultante del exprimido de frutos cítricos.

En las tablas 4.16 y 4.17 se detalla el balance de materia que tendría lugar siguiendo ambos procedimientos de recuperación de hesperidina, poniendo de relieve el balance de las distintas corrientes de agua implicadas en cada proceso. Para ello, se ha incluido la humedad de la que partía la corteza de naranjas empleada como materia prima en el estudio correspondiente, así como la humedad de ésta después del prensado. Del análisis de los datos mostrados en la tabla 4.16 se observa que, en el apartado de consumo de agua potable, el procedimiento de extracción con relación 1:2 de corteza:agua, consume 1020 g de agua por cada gramo de hesperidina pura recuperada. En cambio, el procedimiento de extracción con relación corteza:agua 1:0,25 tan sólo consume 179 g de agua por gramo de hesperidina pura recuperada, lo cual supone una disminución en el consumo de este recurso del 82,5%.

Tabla 4.16. Balance de materia y requisitos de consumo de agua potable para ambos procesos.

Relación corteza:agua	Corteza (g)	Hesperidina pura (g)	Humedad corteza fresca (g/100g)	Agua potable añadida (g)	Humedad corteza prensada (g/100g)	g agua potable/ g hesperidina
1 : 2	1.000	1,96	87,6 ± 0,3	2.000	74,5 ± 0,3	1.020
1 : 0,25	1.000	1,40	87,1 ± 0,5	250	74,4 ± 0,2	179

Asimismo, se realizó el estudio de los vertidos generados cuando se sigue cada uno de los procedimientos de extracción, puesto que ante un hipotético escalado industrial del procedimiento, estas corrientes de vertido supondrían los efluentes industriales que se tendrían que depurar en la estación depuradora de aguas residuales de la industria (EDARI). Este análisis se resume en la Tabla 4.17 y del mismo se observa que el procedimiento con relación corteza:agua 1:2 genera un vertido total de licores al final del proceso de 1.282 g de agua de vertido por cada gramo de hesperidina pura obtenida al final del proceso, mientras que en el caso del procedimiento de extracción con relación corteza:agua 1:0,25 se produciría un vertido de 534 g de agua por cada gramo de hesperidina pura obtenida, lo cual supone una reducción del vertido

generado del 58%. Este licor, asimismo, arrastraría una cantidad considerable de compuestos orgánicos propios de la corteza de los cítricos, principalmente y por orden decreciente, azúcares, fibras, compuestos pécticos y terpenos, lo cual supuso una carga orgánica de 76 g/L de DQO para el vertido generado durante la extracción con relación corteza:agua de 1:2 y de 85g/L de DQO cuando la extracción se realizó con relación corteza:agua del 1:0,25.

Tabla 4.17. Balance de materia y vertido de agua residual generado por ambos procesos.

Relación corteza:agua	Materia prima (g)	Hesperidina pura (g)	Vertido agua sobrante (g)*	DQO Licor vertido (g/L)	g agua vertida/g hesperidina
1 : 2	1000	1,96	2513	76	1282
1 : 0,25	1000	1,40	747	85	534

*Agua añadida + agua eliminada en el prensado de la corteza

Para poder evaluar el impacto que pudieran tener ambos métodos de extracción a nivel industrial, se extrapolaron los datos de las tablas 4.16 y 4.17 relativos al balance de agua con sus consumos y vertidos generados, a un escenario industrial basado en una planta de exprimido de naranjas dotada de 14 extractoras tipo *in-line* modelo *Excel* del fabricante *Bucher-Excel* configurada cada una con 5 copas de extracción. Para analizar los consumos de agua y vertidos generados junto con los costes variables asociados ante un hipotético escenario de un escalado industrial en una industria de 14 extractoras, se consideraron los siguientes datos de partida:

- **Producción horaria de la industria: 50.000 kg fruta/h;** basado en la capacidad nominal de las extractoras Bucher-Excel que utiliza Zuvamesa.
- **Corteza generada: 25.000 kg/h;** considerando que el 50% de la fruta procesada se convierte en biomasa resultante a procesar (principalmente corteza), a partir del dato 48 – 57,5 % w/w de corteza generada respecto a fruta exprimida facilitado por Lopez (1992) y la información propia de la empresa.

- **Precio del agua potable: 1,3 € / m³**, según los datos reportados por el Instituto Nacional de Estadística para el año 2018 sobre precios de agua potable para el sector industria.
- **Coste unitario de depuración del agua: 0,184 €/kg de DQO**, depurando con un reactor aeróbico con sistema de membranas SBR para alcanzar un nivel de 1.000 mg/L de DQO que establece la autorización de vertido municipal según datos de explotación aportados por Zuvamesa.

En base a esta hipótesis de simulación para un escalado industrial, en la tabla 4.18 se recogen los costes variables asociados al consumo y vertido de aguas industriales para los dos procedimientos de extracción de hesperidina objeto de estudio. Según los datos de esta tabla, un volumen de 50.000 kg/h de fruta transformada a nivel industrial requeriría un consumo horario de agua potable para extraer hesperidina de 50.000 kg/h utilizando el procedimiento de extracción con relación corteza:agua 1:2, frente a los 6.250 kg/h de agua requeridos con el procedimiento de extracción con relación corteza:agua 1:0,25. Asimismo, siguiendo con esta misma hipótesis de escalado industrial, el análisis de los vertidos industriales a depurar en la EDARi generados según el procedimiento de extracción seleccionado, muestra que el que utiliza la relación corteza:agua 1:2 da lugar a un vertido horario de 62.825 kg/h de efluente a depurar frente a los 18.675 kg/h generados con el procedimiento de extracción de relación corteza:agua 1:0,25. Traduciendo estos datos a costes variables asociados al consumo de agua de la actividad industrial se concluye que el procedimiento de extracción de alto consumo de agua genera un coste horario 878,5 €/h por la utilización de este recurso y posterior depuración de los vertidos generados, frente a los 292,1 €/h de coste que tiene lugar en el procedimiento de extracción de relación corteza:agua 1:0,25.

En la tabla 4.19 se extrapolan estos mismos datos de costes variables asociados al consumo y depuración de agua necesarios para obtener industrialmente hesperidina, pero en este caso se tiene en cuenta todo el balance anual de una industria tipo con

14 extractoras *in-line* de Bucher-Excel que al final de la campaña citrícola ha transformado 100.000 t de fruta. Como puede verse en la tabla, al final del ejercicio la industria ha tenido unos costes derivados del consumo de agua y su posterior depuración para la recuperación de hesperidina de 1.887.090 €/año cuando se sigue el proceso de extracción de relación corteza agua 1:2, mientras que la misma actividad reduce sus costes anuales a 584.154 €/año cuando la extracción tiene lugar con una relación corteza/agua de 1:0,25.

Finalmente se completó la hipótesis de simulación de escalado industrial de ambos procedimientos de extracción vinculando a las tablas de costes analizadas los ingresos generados por la venta de hesperidina producida. Actualmente el principal productor mundial de extractos de hesperidina es China y los precios de compra que obtiene el sector nutracéutico y farmacéutico en España para la adquisición de extractos de hesperidina de un rango de pureza de entre 50% y 70% ronda los 11,60\$ (*Exworks* China), lo que aplicando un cambio de divisa actualizado de 0,89 € el dólar correspondería a 10,30€/kg de extracto de hesperidina. En la tabla 4.20, se analiza los costes anuales derivados del consumo de agua potable y depuración de vertidos en los que incurriría una industria tipo de transformación de 14 extractoras *in-line*, frente a los ingresos generados por la venta de la hesperidina producida. Como resultado del balance de ingresos menos costes se obtiene que el proceso de extracción con alto contenido en agua generaría un resultado negativo de 264.840 € anuales, lo cual quedaría muy por debajo del umbral de rentabilidad máxima si se tiene en cuenta que en el presente estudio no se han incluido todas las partidas de gasto como son, energía, personal o reactivos químicos. Por el contrario, el proceso de extracción de bajo consumo de agua generaría un balance positivo de 707.696 €/año lo que, a todas luces, parece indicar que permitiría cubrir las otras partidas de gasto industriales y generar beneficios derivados de la obtención del coproducto extracto de hesperidina.

Tabla 4.18. Costes variables asociados al consumo de agua potable y vertido de aguas residuales para un escalado de una industria de transformación con capacidad de producción de 50.000 kg/h de fruta.

Fruta (kg/h)	Corteza (kg/h)	Relación corteza/agua	Agua potable			Vertidos				Coste Total (€/kg)
			Precio unitario (€/m ³)	Consumo (kg/h)	Coste horario (€/h)	Coste depuración €/kg DQO)	Carga orgánica (g DQO/kg vertido)	Vol. horario (kg/h)	Coste total (€/kg)	
50.000	25.000	1:2	1,3	50.000	65,0 €	0,184	76	62.825	878,5 €	943,5 €
50.000	25.000	1:0,25	1,3	6.250	8,1 €	0,184	85	18.675	292,1€	300,2 €

Tabla 4.19. Costes variables totales asociados al consumo de agua potable y vertido de aguas residuales para una industria que al finalizar la campaña ha transformado 100.000 toneladas de fruta.

Fruta (t/año)	Corteza (t/año)	Relación corteza/agua	Agua potable			Vertidos				Coste Total anual (€)
			Precio unitario (€/m ³)	Consumo (m ³ /año)	Coste anual (€)	Coste unitario depuración €/kg DQO)	Carga orgánica (g DQO/kg vertido)	Volumen anual (t/año)	Coste anual (€)	
10.0000	50.000	1:2	1,3	100.000	130.000,0 €	0,184	76	125.650	1.757.089,6 €	1.887.090 €
		1:0,25	1,3	12.500	16.250,0 €	0,184	85	37.350	584.154,0 €	600.404 €

Tabla 4.20. Ingresos generados por la venta de extracto de hesperidina frente a los costes derivados del consumo de agua potable y depuración de vertidos.

Fruta (t/año)	Corteza (t/año)	Relación corteza/ agua	Costes relacionados con consumo de agua			Ingresos derivados de la producción de extracto de hesperidina				Beneficios generados (€/año)
			Coste agua potable (€/año)	Coste depuración vertidos (€/año)	Coste anual (€)	Rendimiento extracción (kg/t corteza)	Extracto producido (kg/año)	Precio de venta unitario (€/kg)	Ingresos por venta de extracto de hesperidina (€/año)	
100.000	50.000	1:2	130.000,0 €	1.757.089,6 €	1.887.090 €	3,15	157.500	10,30 €	1.622.250,0 €	- 264.840 €
		1:0,25	16.250,0 €	584.154,0 €	600.404 €	2,54	127.000	10,30 €	1.308.100,0 €	707.696 €

4.4. Eficiencia industrial de la recuperación de hesperidina como coproducto.

Este trabajo de investigación permite proponer un procedimiento de extracción de hesperidina como coproducto de la industria de transformación de cítricos que supone una mayor valorización de la biomasa vegetal que se genera tras el exprimido de los frutos. El procedimiento ensayado es, a su vez, especialmente interesante porque permitiría su fácil integración a una planta de transformación de zumos que contara con valorización de las cortezas a través de la deshidratación con destino a la alimentación animal. De esta manera, se podría recoger la corteza a la salida de las exprimidoras y, en la misma entrada a los tornillos sinfín que las transportan hacia la sala de deshidratación dosificar los reactivos alcalinos (NaOH y CaOH). Esto permitiría que durante el transporte de la corteza el tornillo, además de la función propia de transporte, ejerciera la de reactor (paso 2 del diagrama de la figura 3.1). A continuación, se seguiría las distintas etapas citadas en el mencionado diagrama de flujo para extraer la hesperidina, y finalmente la torta agotada se podría reintroducir en el proceso de deshidratado, para seguir siendo comercializada como materia prima para alimentación animal.

Con este procedimiento se consiguen unos rendimientos de extracción del flavonoide considerables mediante un sencillo proceso de extracción sólido líquido en fase acuosa, evitando los procesos de extracción que requieren disolventes orgánicos y que implican procesos industriales más complejos y con una mayor inversión, por la necesidad de incluir, en estos casos, complejos sistemas de recuperación de los disolventes, a la vez que cumplan las condiciones ATEX debido al carácter inflamable de estos coadyuvantes. En concreto, con los procedimientos de extracción ensayados se obtuvo un extracto con una pureza en hesperidina superior a 55 g de hesperidina por cada 100 g de extracto, que presenta un considerable valor comercial en el sector nutracéutico. Además, se generan unos rendimientos de extracción considerables, de 0,32 % y 0,25% de extracto a partir de corteza según el procedimiento de extracción fuera con relación corteza:agua 1:2 ó 1:0,25, respectivamente. Tales rendimientos cobran todavía más valor si se considera que en la actualidad el máximo aprovechamiento de la corteza que tienen la mayoría de las industrias de transformación es destinarla, junto con sus flavonoides, a la alimentación animal generando un valor económico muy residual. Los rendimientos

de recuperación alcanzados son de un orden de magnitud muy similar al de otros coproductos que en la actualidad tiene implementada la industria de transformación de cítricos para obtención de zumo, como son los procesos de obtención de aceites esenciales por prensado en frío a partir de las glándulas oleíferas del flavedo del fruto. En la actualidad, la recuperación de aceites esenciales por prensado en frío genera unos rendimientos de extracción de entre 0,18% y 0,45% sobre el peso de fruta según datos de catálogo de la compañía estadounidense de ingeniería de procesos *JBT FoodTech*, especializada en equipamiento industrial para aprovechamiento de coproductos de la transformación de cítricos. Otra ingeniería de procesos como es *Tetra Pak*, cita en su *Orange Book* (2017) que las ratios de obtención de aceites esenciales por prensado en frío en una industria zumera pueden ser a partir de 0,21% respecto a la fruta. Asimismo, autores expertos en la materia como Kimball (2002) considera que el contenido de aceites esenciales que se pueden recuperar por procesos de prensado en frío oscilaría entre el 0,2% y 0,5%. Otro coproducto que con frecuencia recuperan las industrias de transformación de cítricos son los terpenos de la corteza obtenidos por arrastre de vapor a partir de licores de corteza. Generalmente estos licores proceden de las emulsiones no recuperables que tienen lugar en los procesos de obtención de aceites esenciales de cítricos por prensado en frío. Tales procesos de obtención de terpenos por destilación, con frecuencia pueden tener un rendimiento inferior al 0,1% respecto a fruta según datos aportados por el citado *Orange Book* que publica la ingeniería de procesos *Tetra Pak*.

4.5. Valor funcional del zumo de naranja con fibra obtenida a partir de sus cortezas.

El grupo de voluntarios reclutados fue de 10 individuos de los cuales el 50% fueron hombres siguiendo el criterio de paridad de género. Las características antropométricas de los individuos se muestran en la tabla 4.21.

Tabla 4.21. Características antropométricas de los sujetos participantes en el estudio

Variables	
Variables (hombres/mujeres)	10 (5/5)
Edad (años)	29,6 ± 5,8
Peso (kg)	67,4 ± 9,4
Talla (cm)	172,0 ± 10,7
IMC (kg/m ²)	22,7 ± 1,6
Cintura (cm)	74,3 ± 5,9
Cadera (cm)	95,7 ± 4,7
Pulsaciones/min	64,1 ± 13,3
PAS (mmHg)	117,5 ± 9,5
PAD (mmHg)	71,9 ± 7,1

Los datos se expresan como promedio ± desviación estándar.

En cuanto a las curvas de glucemia, puede apreciarse que existen diferencias significativas a los 15 minutos tras la ingesta de la bebida, detectándose niveles de glucosa en sangre más bajos en este punto en el zumo enriquecido respecto al placebo (Figura 4.6). Asimismo, esta diferencia se acompaña de forma simultánea con un incremento mayor del nivel de insulina en el grupo placebo (Figura 4.7). Por su parte, aunque al área bajo la curva de glucosa e insulina mostró una tendencia a la baja en el grupo que tomo zumo enriquecido, no se alcanzaron diferencias significativas entre ambas bebidas ($p=0,210$ y $p=0,175$, respectivamente).

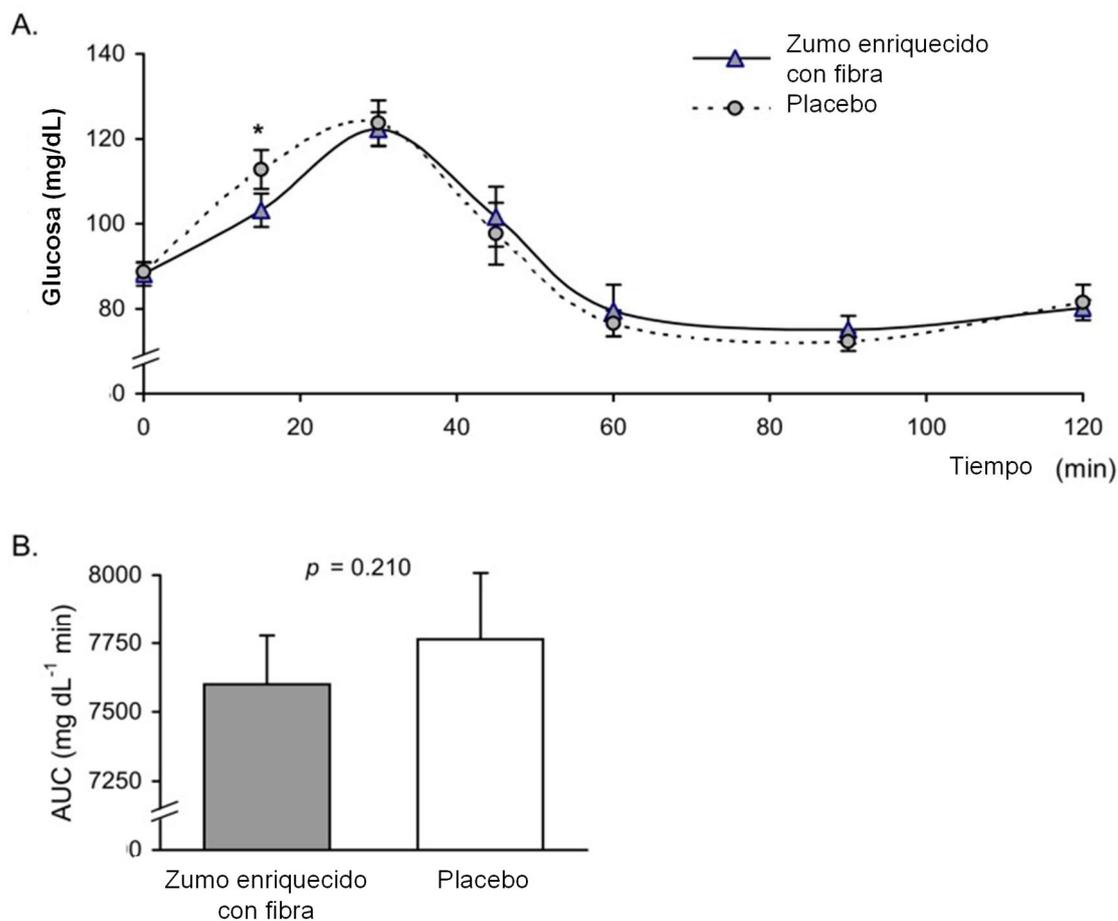


Figura 4.6. (A) Niveles de glucosa (mg/dL) basales y tras la ingesta del zumo enriquecido con fibra y su placebo. (B) Área bajo la curva (AUC) de glucosa (mg dL⁻¹ min) en los grupos del zumo enriquecido con fibra y el del placebo. Los datos se representan como promedio \pm error estándar (n=10 en cada grupo). * $p < 0,05$ según el t-test de Student para datos apareados.

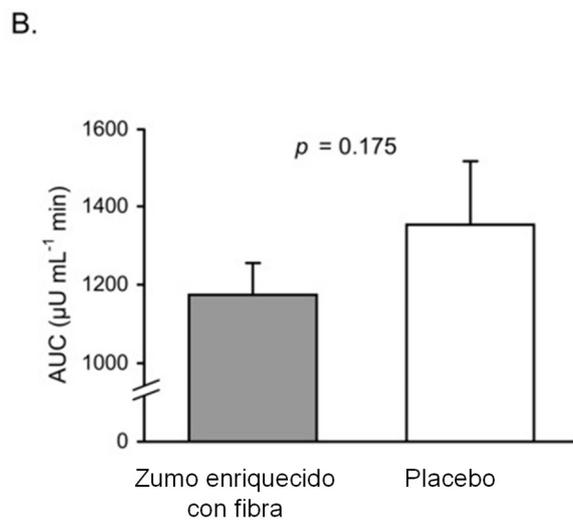
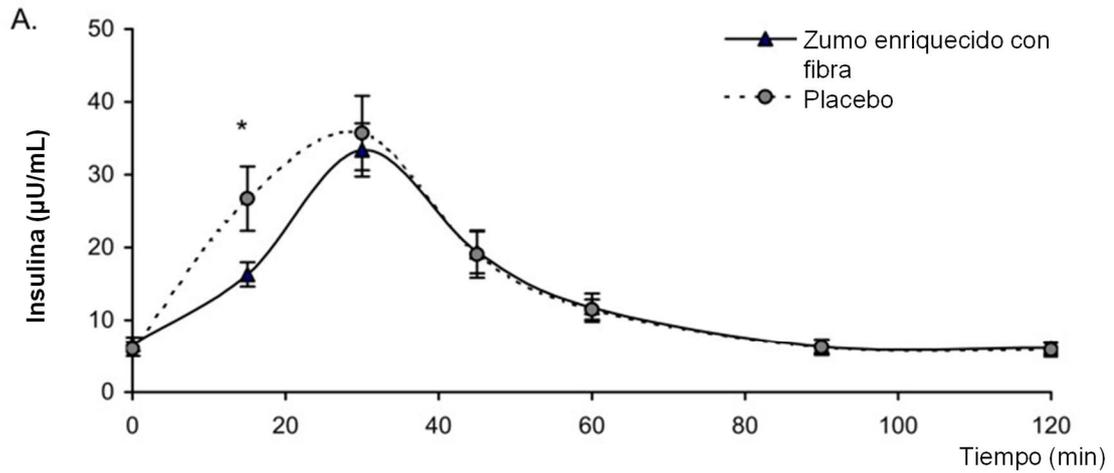


Figura 4.7. (A) Niveles de insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$) basales y tras de la ingesta del zumo enriquecido con fibra y su respectivo placebo. (B) Área bajo la curva (AUC) de insulina ($\mu\text{U dL}^{-1} \text{ min}$) en los grupos del zumo enriquecido con fibra y el del placebo. Los datos se representan como promedio \pm error estándar ($n=10$ en cada grupo). *: diferencias significativas ($p < 0,05$, test t de Student para datos pareados).

Por tanto, este estudio muestra que la ingesta de una sola dosis de zumo de naranja enriquecido a la dosis de 3,5 g por unidad bebida, no modificó significativamente el área bajo las curvas de glucosa e insulina, pero sí condujo a una reducción significativa, aunque transitoria justo tras la ingesta, en los niveles de glucosa e insulina en suero en individuos sanos en comparación con la ingesta de zumo de naranja normal. Tales resultados, están alineados con otros estudios tales como Huang et al. (2019) y Chen et al. (2017) quienes observaron reducciones de en respuesta glicémica al enriquecer las ingestas con fibra de pulpa de naranja, pero en ambos casos los aportes de fibra eran superiores (mayores a 5g) con respecto al contenido en fibra ingerido en este estudio por bebida (3,5 g).

Los resultados relativos a la sensación de hambre y saciedad se muestran en la Figura 4.9. Es de destacar, que la cuestión relacionada con la saciedad mostró cambios significativos a los 15 y 120 minutos, siendo mayor en el grupo que tomó el producto enriquecido respecto al placebo. También la valoración de la plenitud resultó significativa a los 120 minutos en el producto enriquecido respecto al placebo. La sensación de hambre, deseo de comer y consumo prospectivo no mostraron diferencias significativas.

Se ha observado, por tanto, que el consumo de zumo enriquecido con fibra potencia las sensaciones de saciedad y plenitud, al principio y final del periodo de ensayo. El efecto de la fibra dietética en la regulación de la saciedad debido a la capacidad de ciertos tipos de fibra para producir soluciones viscosas ha quedado demostrado con anterioridad por otros autores (Capurano, 2017). Las fibras viscosas forman geles en el estómago durante la digestión del alimento, lo que produciría la distensión del estómago, el cual a su vez dispararía las señales de plenitud a través del sistema nervioso vago aferente (Ho et al., 2015). En el caso particular de este trabajo, los resultados obtenidos de la escala visual analógica mostraron diferencias postprandiales significativas después de la ingesta del zumo enriquecido con fibra, al detectarse un aumento significativo en éste de las sensaciones de saciedad y plenitud, estando este hecho alineado con otros

estudios previos realizados con zumo de fruta enriquecidos con fibra a dosis superiores a 3 g (Dong et al., 2016). En este caso, la saciedad y plenitud detectada por los individuos participantes en el ensayo clínico podría estar relacionada con los niveles de determinadas hormonas en sangre, según muestran algunos trabajos previos que incluyen el análisis del contenido posprandial de hormonas intestinales después de consumir productos enriquecidos con fibra (Verhoef et al. 2011 y Barone-Lumaga et al. 2012).

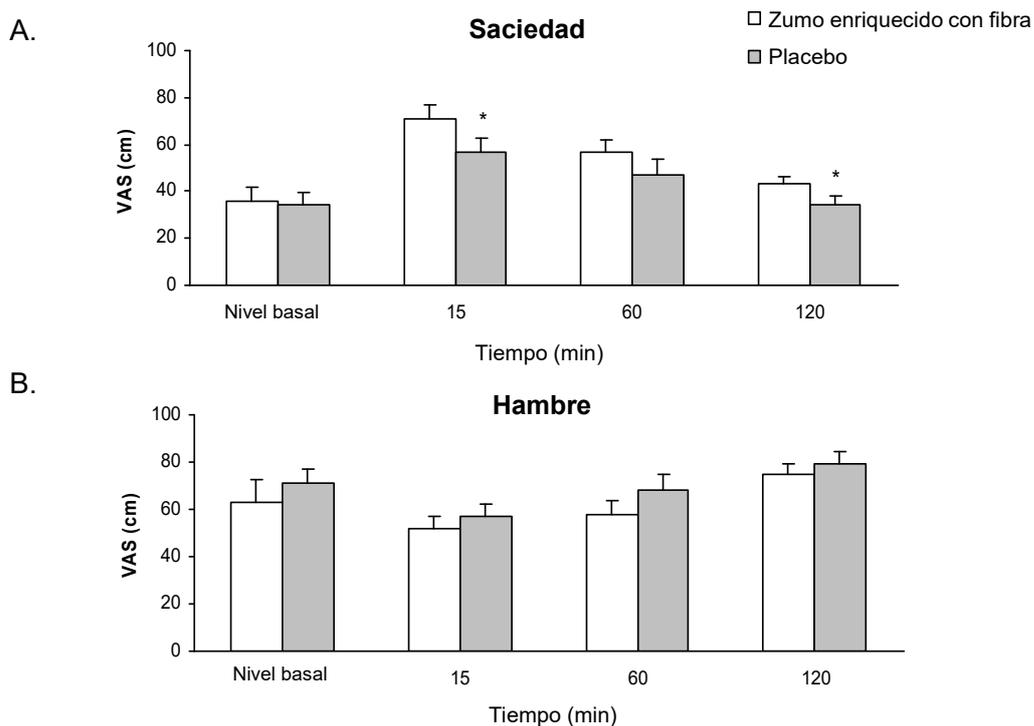


Figura 4.9. Resultado de las 5 cuestiones planteadas para la valoración de la sensación de saciedad antes y tras la ingesta oral del zumo de naranja enriquecido con fibra y su respectivo placebo mediante una escala visual analógica. Los datos se representan como promedio \pm error estándar (n=10 en cada grupo). *: diferencias significativas ($p < 0,05$, test t de Student para datos pareados).

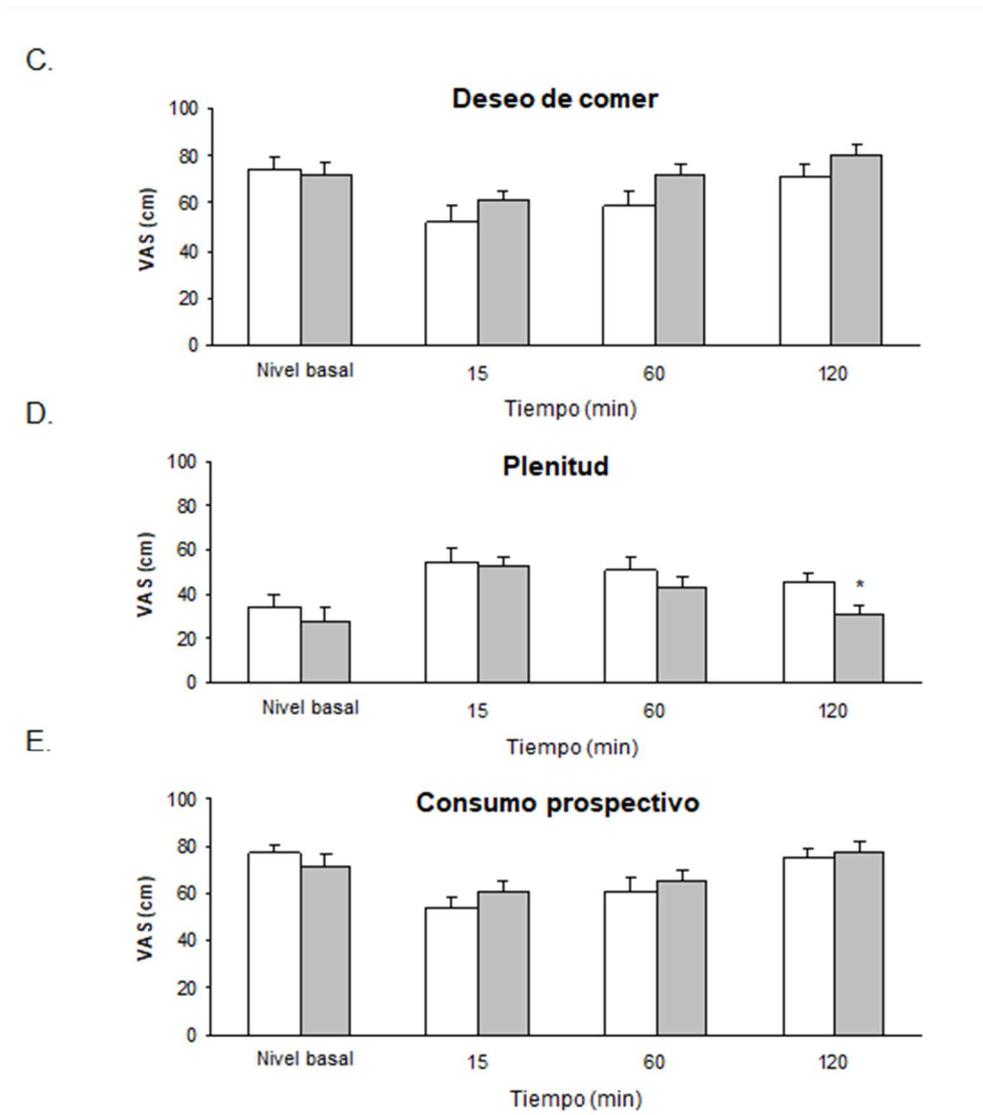


Figura 4.9 (cont). Resultado de las 5 cuestiones planteadas para la valoración de la sensación de saciedad antes y tras la ingesta oral del zumo de naranja enriquecido con fibra y su respectivo placebo mediante una escala visual analógica. Los datos se representan como promedio \pm error estándar ($n=10$ en cada grupo). *: diferencias significativas ($p < 0,05$, test t de Student para datos pareados).

5. CONCLUSIONES.

En la presente tesis doctoral se proponen procedimientos extractivos compatibles con los actuales procesos de fabricación de zumos cítricos, que vayan orientados a la obtención de coproductos de valor añadido basados en los flavonoides cítricos, con aplicaciones tanto en el sector nutracéutico como farmacéutico. Tales procesos pueden ayudar a mejorar el balance de resultados del sector de transformación de cítricos a través de una mayor valorización de las biomasas generadas durante la transformación y de la valorización de los excedentes de cítricos de destrío que en la actualidad no pueden comercializarse en el canal de fruta en fresco.

Del estudio del contenido en flavonoides en distintas variedades de naranjas y mandarinas a lo largo de la campaña citrícola, se confirmó que el glucósido de flavanona hesperidina es, con diferencia, el flavonoide mayoritario en todas las partes del fruto para las distintas especies botánicas estudiadas. Asimismo, se evidenció también que el contenido en hesperidina presenta diferencias significativas entre especies, siendo más abundante en naranja (*C. sinensis*) que en mandarinas (*Citrus reticulata*).

Los trabajos de caracterización de flavonoides en las distintas variedades revelaron que las flavonas polimetoxiladas sinensetina, nobiletina y tangeretina presentan una concentración mucho más alta en la corteza de las variedades híbridas de mandarina Nadorcott, Ortanique y Orri que en el resto de las variedades de naranja y mandarina estudiadas, siendo especialmente destacable el contenido en nobiletina. Estos resultados son de especial relevancia debido al elevado interés que despiertan estos tres compuestos por los efectos beneficiosos para la prevención y tratamiento de determinadas enfermedades degenerativas. Asimismo, tales resultados pueden ser de interés para incentivar la valorización de los excedentes citrícolas de estas variedades de mandarina, pues las opciones de valorización a día de hoy de las mandarinas tardías que no pueden comercializarse en fresco, son inferiores a las que puedan tener otros cítricos como naranja o pomelo, por los cuales la industria transformadora ofrece precios al citricultor que compensan costes de recolección, transporte y genera ciertos

márgenes económicos, escenario que no suele ocurrir en las mandarinas, especialmente las híbridas.

De los resultados del contenido en hesperidina en las distintas partes del fruto, se comprobó que, aunque las membranas pueden ser una fuente muy interesante para recuperación de flavonoides, la corteza resultante del exprimido industrial es la corriente de biomasa idónea para plantear procesos de recuperación de hesperidina integrados en las plantas de obtención de zumo. Esto es así tanto por la riqueza en hesperidina que presenta esta parte del fruto en las distintas variedades de naranja y mandarina, como por el gran volumen que supone esta corriente de biomasa para la industria de transformación de cítricos, pues la corteza supone el 55% en peso de la totalidad del fruto y además, en la actualidad, representa un subproducto que genera escasos rendimientos económicos para los transformadores.

Teniendo en cuenta lo anterior, en la segunda parte de la presente tesis doctoral se estudiaron procedimientos de obtención de hesperidina, mediante la técnica de extracción sólido-líquido en medio alcalino, a partir de la corteza resultante del exprimido industrial de cítricos. En el procedimiento de extracción investigado se obtuvo una ratio de recuperación media de extracto de hesperidina y una pureza mayor cuando la extracción se realizaba con una mayor relación corteza-agua (1:2) frente al de menor proporción de agua (1:0.25). No obstante, cuando se calculó el rendimiento del proceso como masa de hesperidina pura recuperada por unidad de masa de corteza procesada, se comprobó que no había diferencias significativas entre ambos métodos. Asimismo, se confirmó que esta ratio de recuperación sería del mismo orden de magnitud que la de los procesos que actualmente tiene implantados la industria de zumo para obtener otros coproductos como son los aceites esenciales o los terpenos.

Ante un escenario de escalado industrial de los procedimientos de extracción de hesperidina estudiados, los costes asociados al consumo de agua potable y la consiguiente depuración de vertidos, son cinco veces más elevados en el procedimiento que requería una relación corteza-agua 1:2 frente al de 1:0,25. Esto

hace que, al incluir en el análisis de simulación de una industria tipo de zumos los ingresos potenciales generados por la comercialización del extracto de hesperidina, la venta del nuevo coproducto con el procedimiento de extracción de alto consumo de agua apenas cubriría los gastos considerados, no quedando margen para cubrir otras partidas de gasto industrial, mientras que el balance sería muy favorable en el caso del procedimiento de bajo consumo de agua. Por todo ello, a nivel industrial, se justifica la implantación del procedimiento de bajo consumo de agua (relación corteza-agua 1:0,25) para la recuperación de hesperidina a partir de la corteza.

Los resultados obtenidos al enriquecer un zumo de naranja con fibra procedente de la corteza deshidratada demuestran un efecto beneficioso al inicio de la fase de absorción, tras la ingesta de una dosis, en los contenidos de glucosa (disminución) e insulina (aumento) en una muestra de población de adultos sanos. Asimismo, el zumo enriquecido en fibra presenta un efecto significativo en la contribución a la sensación de saciedad y plenitud.

6. REFERENCIAS.

- Abad-García B.; Garmón-Lobato S.; Sánchez-Ilárduya M.B.; Berrueta L.A.; Gallo B.; Vicente F.; Alonso-Salces R.M. 2014. Polyphenolic contents in citrus Fruit juices: authenticity assessment. *European Food Research and Technololy*, 238, 803-818.
- Abeyasinghe, D.C.; Li X.; Sun C.; Zhang W.; Zhou C.; Chen K. 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, 104, 1338-1344.
- A.I.J.N. European Fruit Juice Association. 2018. Reference Guideline for Orange Juice. <http://aijn.eu/en/reference-guidelines/orange>. Último acceso: 29/06/2020.
- A.I.J.N. European Fruit Juice Association. 2016. Reference Guideline for Mandarin. <http://aijn.eu/en/reference-guidelines/mandarin>. Último acceso: 29/06/2020.
- A.I.J.N. European Fruit Juice Association. 2018. European Fruit Juice Association. A.I.J.N Liquid Fruit Market Report. <http://aijn.eu/en/publications/market-reports-1/publication-2>. Último acceso: 29/06/2020.
- Anderson J.W.; Baird P.; Davis R.H. Jr. et al. 2009. Health benefits of dietary fiber. *Nutrition Reviews*, 67:188-205.
- ANSES-CIQUAL, 2017. Food Composition Tables. <https://ciqual.anses.fr/>. Último acceso: 29/06/2020.
- AOAC 977.20, 1977. Separation of Sugars in Honey, Liquid Chromatographic Method. En Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersurg, MD_ AOAC International.
- AOAC 982.13, 1983. Glucose, Fructose, Sucrose, and Maltose in Presweetened Cereals - Liquid Chromatographic Method. En Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersurg, MD_ AOAC International.
- AOAC 984.27. 1983. Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Phosphorus, Potassium, Sodium, and Zinc in infant formula. Inductively coupled plasma emission spectroscopic method. En Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersurg, MD_ AOAC International.
- AOAC 980.13, 2006. Sugar Profiles by HPLC. En Official Methods of Analysis of AOAC International. Gaithersurg, MD_ AOAC International.
- Barone-Lumaga, R.; Azzali, D.; Fogliano, V.; Scalfi, L.; Vitaglione, P. 2012. Sugar and dietary fibre composition influence, by different hormonal response, the

satiating capacity of a fruit-based and β -glucan-enriched beverage. *Food & Function*, 3, 67–75.

Benavente-García O.; Castillo J. 2008. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 6185–6205.

Bigoniya P.; Singh K. 2014. Ulcer protective potential of standardized hesperidin, a citrus flavonoid isolated from Citrus Sinensis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24, 330-340.

Bombal I.; Hernández O.; Mena A.; Iglesias D.J. Iglesias; Marín O.; Lorente J.; de Ancos B.; García S.; Landajo B.; Esturo A.; Cámara M.; Martí N.; Fernández-Ruiz V.; Gómez A.; Corbacho A. 2011. *El Libro del Zumo, ASOZUMOS*.

Bucher Excel. <https://www.bucherexzel.com/index.php>. Último acceso: mayo 2020.

Bosch-Serra N; Marqués-Cardete R.; Gurrea-Martínez A.; Grau-Del Valle Carmen; Hernández-Mijares Antonio; Bañuls C.; 2019. Effect of Fibre-Enriched Orange Juice on Postprandial Glycaemic Response and Satiety in Healthy Individuals: An Acute, Randomised, Placebo-Controlled, Double-Blind, Crossover Study. *Nutrients*, 11, 3014.

Calabrò, M.L.; Galtieri, V.; Cutroneo, P.; Tommasini, S.; Ficarra, P.; Ficarra, R. 2004. Study of the extraction procedure by experimental design and validation of a LC method for determination of flavonoids in Citrus bergamia juice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 349–363.

Cámara M., Sánchez-Mata, M.C., Isasa, M.E. 2003. Frutas y verduras, fuente de salud. Servicio de Promoción de la Salud, Instituto de Salud Pública. Consejería de Sanidad y Consumo.

Capuano, E. 2017. The behaviour of dietary fibre in the gastrointestinal tract determines its physiological effect. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 3543–3564.

Chanet A.; Milenkovic D.; Manach C.; Mazur A.; Morand C. 2012. Citrus Flavanones: What is Their Role in Cardiovascular Protection?. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 60, 8809–8822.

Chen, C.O.; Rasmussen, H.; Kamil, A.; Du, P.; Blumberg, J.B. 2017. Orange Pomace Improves Postprandial Glycemic Responses: An Acute, Randomized, Placebo-Controlled, Double-Bind, Crossover Trial in Overweight Men. *Nutrients*, 9, 130.

Citrus ID.

<http://idtools.org/id/citrus/citrusid/results.php?show%5B%5D=Cultivar+or+Taxon&show%5B%5D=Synonyms&show%5B%5D=Origin&show%5B%5D=Descrip>

tion&show%5B%5D=Notes&show%5B%5D=Resources&page=1&terms=orri.
Último acceso: enero 2020.

CGC (Comité de gestión de Cítricos). Pleno CGC 27/10/2017. La Citricultura en España en Cifras, Campaña 2016-2017. <https://www.citricos.org/empresa.php?id=975&pi=9&categoria=Convocatorias> . Última visita: 29/06/2020

Cottin, R. 2002. Citrus of the World: A citrus directory. Version 2.0. France: SRA INRA-CIRAD.

Directiva 2012/12/UE por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. Diario Oficial de la Unión Europea. 19 de abril de 2012.

Dong, H.; Sargent, L.J.; Chatzidiakou, Y.; Saunders, C.; Harkness, L.; Bordenave, N.; Rowland, I.; Spencer, J.P.; Lovegrove, J.A. 2016. Orange pomace fibre increases a composite scoring of subjective ratings of hunger and fullness in healthy adults. *Appetite*, 107, 478–485.

El-Nawawi S.A. 1995. Extraction of citrus glucosides. *Carbohydrate Polymers*, 27, 1-4.

FAO. 2015. Citrus Fruit Fresh and Processed. Statistical bulletin. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.

FAO. 2016. Citrus Fruit Fresh and Processed. Statistical bulletin. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma.

Gaydou E.M; Bianchini J.P.; Randriamiharisoa R.P. 1987. Orange and mandarin peel oils differentiation using polymethoxylated flavone composition. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 35, 525-529.

Gattuso G.; Barreca D.; Gargiulli C.; Leuzzi U.; Caristi C. 2007. Flavonoid composition of Citrus juices. *Molecules*, 12, 1641-1673.

Green C. O.; Wheatley A.O; Osagie A.U.; Morrison E. Y. St. A.; Asemota H. N. 2007. Determination of Polymethoxylated flavones in peels of selected Jamaican and Mexican citrus (*Citrus spp.*) cultivars by high-performance liquid chromatography. *Biomedical Chromatography*, 21, 48-54.

Hendrickson R.; Kesterson J. W. 1962. Three-year study on hesperidin recovery as related to Valencia orange maturity. *Florida State Horticultural Society*.

Hendrickson R.; Kesterson J. W.; 1954. Recovery of Citrus Glucosides. *Florida State Horticultural Society*.

- Hendrickson, R. & Kesterson, J.W. 1964. Hesperidin in Florida oranges. Univ. of Florida, *Agricultural Experiment Station Technology Bulletin*, 684.
- Ho, I.H.; Matia-Merino, L.; Huffman, L.M. 2015. Use of viscous fibres in beverages for appetite control: A review of studies. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 66, 479–490.
- Holmboe-Ottesen G.; Wandel M. 2012. Changes in dietary habits after migration and consequences for health: a focus on South Asians in Europe. *Food & Nutrition Research*, 56, 1-13.
- Huang Y.; Park E.; Replogle R.; Boileau T.; Shin J.E.; Burton-Freeman B.M.; Edirisinghe I. 2019. Enzyme-treated orange pomace alters acute glycemic response to orange juice. *Nutrition & Diabetes*, 9, 24–28.
- IFU, 2015, Titratable Acidity. IFU Method N° 3. International Fruit and Vegetable Juice Association.
- IFU, 2005. Determination of Soluble Solids. IFU Method N°8. International Fruit and Vegetable Juice Association.
- IFU, 2015. Determination of pH Value. IFU Method N° 11. International Fruit and Vegetable Juice Association.
- IFU, 2012. Determination of Pectin. IFU method N° 26. International Fruit and Vegetable Juice Association.
- IFU, 2005. Determination of Essential Oils (Bromate Method). IFU Method N° 45. International Fruit and Vegetable Juice Association.
- Instituto Nacional de Estadística. <https://www.ine.es/>. Último acceso: febrero 2020.
- Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). Información sobre variedades y patrones. Variedades comerciales de cítricos. <http://www.ivia.gva.es/va/variedades>. Último acceso: febrero de 2020.
- ISO 936:1998. Meat and meat products — Determination of total ash. ISO.
- ISO 1443:1973. Meat and meat products — Determination of total fat content. ISO.
- ISO/DIS 17294: 2016. Water quality — Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) — Part 2: Determination of selected elements including uranium isotopes. ISO.
- Kanaze, F.I.; Gabrieli, C.; Kokkalou, E.; Georgarakis, M.; Niopas, I. 2003. Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices

and pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 33, 243-249.

Kimball D.A. *Procesado de Cítricos*. Acibia Editorial S.A., 2002.

Lanza E; Jones D.Y.; Block G.; Kessler L.; 1987. Dietary fiber intake in the US population. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 46, 790-797.

Lopes Assis Coelho R.C.; Hermsdorff H.H.M; Bressan J. 2013. Anti-inflammatory Properties of Orange Juice: Possible Favorable Molecular and Metabolic Effects. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68, 1-10.

López J. 1995. *La Naranja Composición y Cualidades de sus Zumos y Néctares*. Generalitat Valenciana, Conselleria de Agricultura y Medio Ambiente.

Manthey, J.A.; Grohmann K. 1996. Concentrations of hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing byproducts. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44, 811-814.

Martínez, A.; Haza, A.I.; Morales, P. (2001a) Frutas y verduras como agentes preventivos en la dieta I. Actividad antioxidante. *Alimentaria, En-Fb*, 27-30.

Martínez, A.; Haza, A.I.; Morales, P. (2001b) Frutas y verduras como agentes preventivos en la dieta II. Actividad antimutagénica y anticancerígena. *Alimentaria, En-Fb*, 33-39.

Martínez-Navarrete, N.; Marqués-Cardete R. 2019. Hacia un modelo industrial de residuo cero en zumos cítricos. *Tecnifood-Dossier Refrescos, Zumos y Aguas*, abril 2019, (abril), 110-111.

Mazzotta A.S.; 2001. Thermal Inactivation of Stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*, 64 (3) 3, 315-320.

Meiyanto E.; Hermawan A.; Anindyajati. 2012. Natural products for cancer-targeted Therapy: citrus flavonoids as Potent chemopreventive agents. *Asian Pacific Journal of cancer Prevention*, 13, 427-436.

Mouly P.; Gaydou E. M.; Auffray A. 1998. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 800, 171-176.

Nogata Y.; Ohta H.; Sumida H.; Sekiya K.; 2003. Effect of extraction method on the concentrations of selected bioactive compounds in mandarin juice. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 7346-7351.

- Nogata Y.; Sakamoto K.; Shiratsuchi H.; Ishii T.; Yano M.; Ohta H. 2006. Flavonoid composition of Fruit Tissues of citrus species. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70 (1), 178-192.
- Omidbaigi R; Nasiri M. F. 2004. Quantitative distribution of hesperidin in citrus species, during fruit maturation and optimal harvest time. *Natural Product Radiance*, 3 (1) January-February.
- Ooghe W.C.; Ooghe S.J.; Detavernier C.M.; Huyghebaert. 1994. Characterization of Orange Juice (*Citrus sinensis*) by polymethoxylated flavones. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42, 2191-2195.
- Peterson J. J.; Dwyer J. T.; Beecher G. R.; Bhagwat S. A.; Gebhardt S. E.; Haytowitz D. B.; Holden J. M. 2006. Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S66–S73.
- Primo E.; Romero R.; Sala J.M.; 1972. XI.- Estudio comparativo de las principales variedades cultivadas en la región valenciana. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 12 (2): 291.
- Reglamento de Ejecución (UE) 543/2011, por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) n 1234/2007 del Consejo en los sectores de las frutas y hortalizas y de las frutas y hortalizas transformadas. Diario Oficial de la Unión Europea. 7 de junio de 2011.
- Sendra, J.M.; Navarro, J.L.; Izquierdo L. 1988. C18 solid-phase isolation and high-performance liquid chromatography/ultraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in citrus juice. *Journal of Chromatography Science*, 26, 443-448.
- Shutterstock; <https://www.shutterstock.com/es/image-photo/pomelo-fruit-juicy-vesicles-background-macro-1302840556>. Último acceso: febrero de 2020.
- Sun, Y.; Wang, J.; Gu, S.; Liu, Z.; Zhang, Y.; Zhang, X. 2010. Simultaneous determination of flavonoids in different parts of *Citrus reticulata* 'Chachi' fruit by high performance liquid chromatography—photodiode array detection. *Molecules*, 15, 5378-5388.
- Tanaka T.; Tanaka T.; Tanaka M.; 2012. Kuno T. Cancer Chemoprevention by Citrus Pulp and Juices Containing High Amounts of β -Cryptoxantin and Hesperidin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 516981, 10 pages.
- Tetra Pak. 2017. The Orange Book. <http://orangebook.tetrapak.com>. Última visita 29/06/2020.

- Tomas-Barberan, F.A.; Clifford, M. N. 2000. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food Agricultural*, 80, 1073–1080.
- Tungland B.C; Meyer D. 2002. Nondigestible oligo- and polysaccharides (dietary fiber): their physiology and role in human health and food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 90-109.
- UNE 34552-2:1972. Métodos de ensayo de carnes y productos cárnicos. Determinación de la humedad. AENOR
- UNE-EN-ISO 20483: 2014. Cereales y legumbres. Determinación del contenido de nitrógeno y cálculo de contenido de proteína cruda. Método Kjeldahl. AENOR.
- UNE-EN ISO 8968-1: 2014. Leche y productos lácteos. Determinación del contenido de nitrógeno. Parte 1: Método Kjeldahl y cálculo de la proteína bruta. AENOR.
- Verhoef, S.P.; Meyer, D.; Westerterp, K.R. 2011. Effects of oligofructose on appetite profile, glucagon-like peptide 1 and peptide YY3-36 concentrations and energy intake. *British Journal of Nutrition*, 106, 1757–1762.
- Voigtländer H.W.; Procedimiento para la preparación de Diosmina. Patente número 459076, del 24/05/1977.
- Walle T. 2007. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass?. *Seminars in Cancer Biology*, 354-362.
- Yang, Z-n.; Sun, Y-m.; Luo, S-q.; Chen, J-w. Yu, Z-w. Sun, M. 2014. Quality evaluation of *Houttuynia cordata* Thunb by high performance liquid chromatography with photodiode-array detection (HPLC-DAD). *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 27, 223-231.

ANEXOS

ANEXO 0. ANOVAs UNIFACTORIALES DE LOS DE LOS PARÁMETROS RENDIMIENTO EN ZUMO DE LA FRUTA, °BRIX Y ACIDEZ, CON EL FACTOR MADUREZ (NIVEL 1: TEMPRANA; NIVEL 2: TARDÍA).

ANEXO 0.1. ANOVA UNIFACTORIAL DEL RENDIMIENTO EN ZUMO DE LA FRUTA CON EL FACTOR MADUREZ.

Tabla A.0.1.1 Tabla del ANOVA del Rendimiento en zumo para el factor Madurez.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	1,80817	1	1,80817	1,67	0,2003
Within groups	75,7259	70	1,0818		

Tabla A.0.1.2. Prueba de múltiples rangos para el Rendimiento en zumo para el factor Madurez.

<i>Dilución</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
1	36	11,3953	X
2	36	11,7122	X

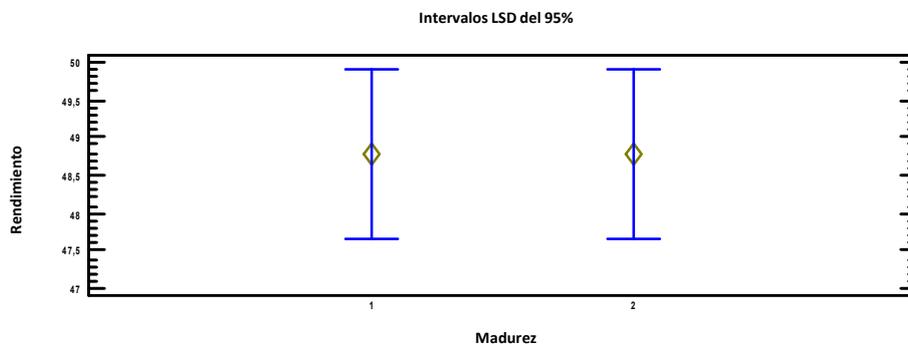


Figura A.0.1. Rendimiento en zumo de la fruta en los dos niveles de madurez.

ANEXO 0.2. ANOVA UNIFACTORIAL DE LOS °BRIX DE LA FRUTA CON EL FACTOR MADUREZ.

Tabla A.0.2.1 Tabla del ANOVA de los °Brix de la fruta con el factor Madurez.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	1,80817	1	1,80817	1,67	0,2003
Within groups	75,7259	70	1,0818		

Tabla A.0.2.2. Prueba de múltiples rangos para los °Brix de la fruta con el factor Madurez.

<i>Dilución</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
1	36	11,3953	x
2	36	11,7122	x

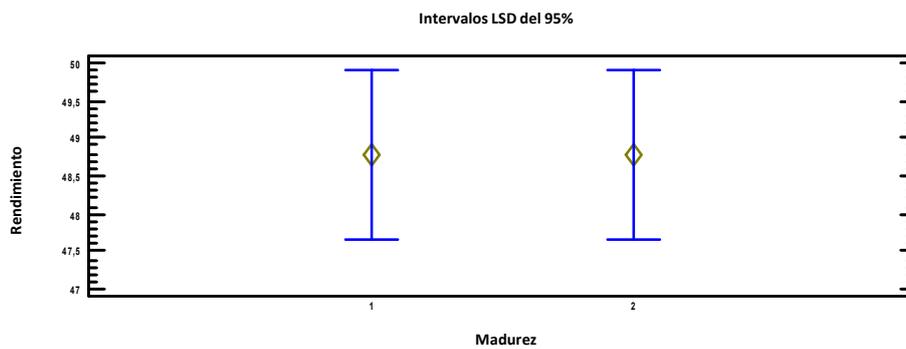


Figura A.0.2. °Brix de la fruta en los dos niveles de madurez.

ANEXO 0.3. ANOVA UNIFACTORIAL DE LA ACIDEZ DE LA FRUTA CON EL FACTOR MADUREZ.

Tabla A.0.3.1 Tabla del ANOVA del parámetro acidez de la fruta respecto al factor Madurez.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	69,1096	1	69,1096	12,23	0,0008
Within groups	395,706	70	5,65294		

Tabla A.0.3.2. Prueba de múltiples rangos para la acidez de la fruta respecto al factor Madurez.

<i>Dilución</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
2	36	8,36889	×
1	36	10,3283	×

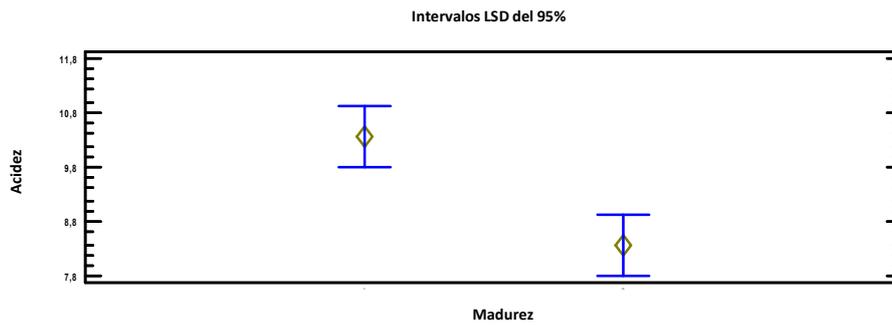


Figura A.0.3. Acidez de la fruta en los dos niveles de madurez.

ANEXO 1. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LOS FLAVONOIDES HESPERIDINA, NARIRUTINA, DIOSMINA, NOBILETINA, TANGERETINA Y SINENSETINA EN RELACIÓN CON LOS FACTORES VARIEDAD (1: NAVELINA; 2: SALUSTIANA; 3: NAVEL-LATE; 4: NAVEL; 5: LANE-LATE; 6: SANGUINELLI; 7: ORONULES; 8: CLEMENPONS; 9: CLEMENULES; 10: ORRI; 11: ORTANIQUE; 12: NADORCOTT), PARTE DEL FRUTO (1: EXPRIMIDORA MANUAL; 2: EXPRIMIDORA INDUSTRIAL; 3: MEMBRANAS ENDOCARPIO; 4: CORTEZA) Y ESTADO DE MADURACIÓN (1: TEMPRANA, 2: TARDÍA).

ANEXO 1.1. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA HESPERIDINA CON LOS FACTORES VARIEDAD, PARTE DEL FRUTO Y ESTADO DE LA FRUTA.

Tabla A.1.1.1. Análisis de la varianza para HESPERIDINA – Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
PRINCIPALES EFECTOS					
A:Variedad	4,14699E9	11	3,76999E8	41,49	0,0000
B:Parte	5,5722E10	3	1,8574E10	2044,02	0,0000
C:Maduración	2,89534E8	1	2,89534E8	31,86	0,0000
INTERACCIONES					
AB	6,66671E9	33	2,02021E8	22,23	0,0000
AC	6,92238E8	11	6,29307E7	6,93	0,0000
BC	6,22462E8	3	2,07487E8	22,83	0,0000

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.1.1.2. Prueba de múltiples rangos para la HESPERIDINA en función de la variedad.

<i>Variedad</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
11	24	4688,58	615,325	X
12	24	6843,41	615,325	X
10	24	7262,2	615,325	X
3	24	9816,93	615,325	X
6	24	10613,6	615,325	XX
2	24	10629,1	615,325	XX
5	24	11037,0	615,325	XXX
8	24	12273,3	615,325	XX
7	24	12686,3	615,325	X
9	24	15376,1	615,325	X
1	24	16752,2	615,325	XX
4	24	17665,2	615,325	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.1.3. Prueba de múltiples rangos para la HESPERIDINA en función de la Parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	280,338	355,258	X
2	72	296,572	355,258	X
3	72	10306,8	355,258	X
4	72	34330,9	355,258	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.1.4. Prueba de múltiples rangos para la Hesperidina en función de la Maduración.

Maduración	Count	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	144	10301,0	251,206	X
1	144	12306,3	251,206	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

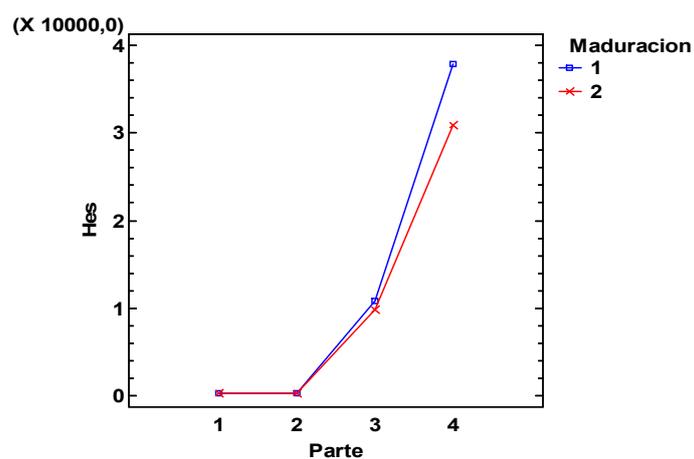


Figura A.1.1.1 Gráfico de interacción del Estado de Maduración y la parte del fruto para el flavonoide HESPERIDINA.

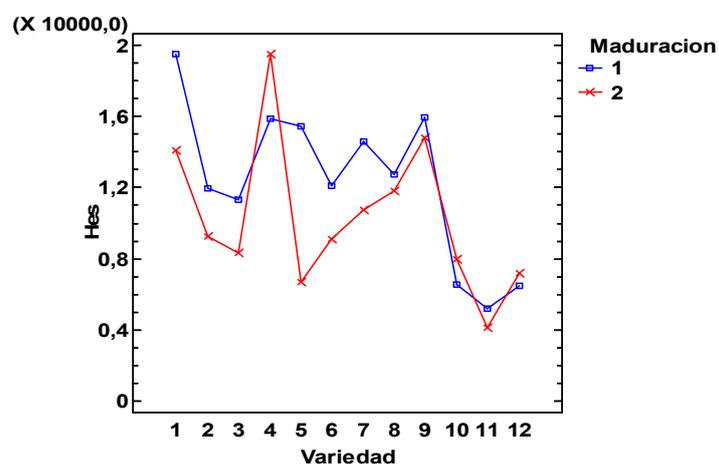


Figura A.1.1.2. Gráfico de interacción del Estado de Maduración y la variedad para el flavonoide HESPERIDINA.

ANEXO 1.2. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA NARIRUTINA CON LOS FACTORES VARIEDAD, PARTE DEL FRUTO Y ESTADO DE LA FRUTA.

Tabla A.1.2.1. Análisis de la varianza para NARIRUTINA – Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
PRINCIPALES EFECTOS					
A:Variedad	1,35931E8	11	1,23574E7	19,03	0,0000
B:Parte	7,73781E8	3	2,57927E8	397,17	0,0000
C:Maduracion	77088,9	1	77088,9	0,12	0,7308
INTERACCIONES					
AB	1,63639E8	33	4,95876E6	7,64	0,0000
AC	1,84381E7	11	1,67619E6	2,58	0,0042
BC	911234,	3	303745,	0,47	0,7051

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.1.2.2. Prueba de múltiples rangos para la NARIRUTINA en función de la variedad.

<i>Variedad</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	24	604,213	164,496	X
8	24	698,488	164,496	X
6	24	799,538	164,496	X
9	24	944,313	164,496	X
3	24	1764,53	164,496	X
10	24	1891,21	164,496	XX
2	23	1900,65	168,825	XX
11	24	1920,37	164,496	XX
5	24	2073,98	164,496	XXX
12	24	2228,85	164,496	XXX
4	24	2464,03	164,496	XX
1	24	2681,55	164,496	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.2.3. Prueba de múltiples rangos para la NARIRUTINA en función de la Parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	72	51,425	94,9716	X
1	71	65,3433	95,8121	X
3	72	2782,51	94,9716	X
4	72	3757,96	94,9716	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.2.4. Prueba de múltiples rangos para la NARIRUTINA función de la Maduración.

Maduración	Count	LS Mean	LS Sigma	Grupos Homogéneos
2	144	1647,91	67,1551	X
1	143	1680,7	67,4529	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

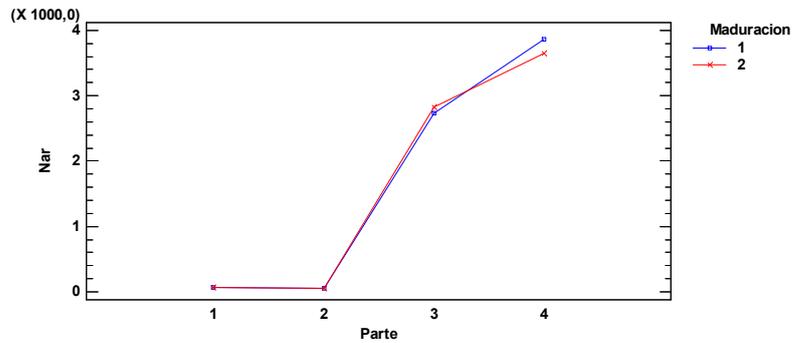


Figura A.1.2.1 Gráfico de interacción del estado de Maduración y la parte del fruto para el flavonoide NARIRUTINA.

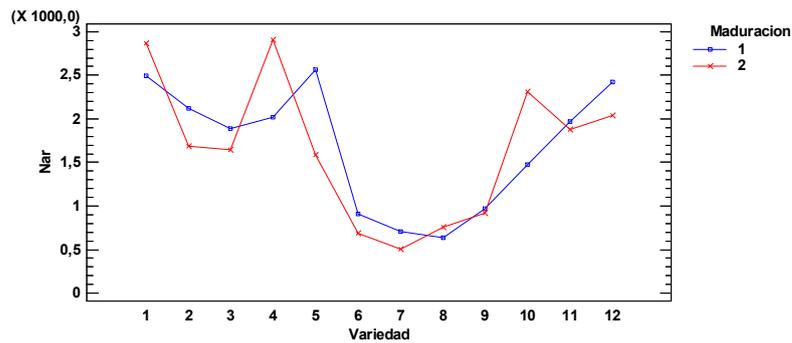


Figura A.1.2.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y la variedad para el flavonoide NARIRUTINA.

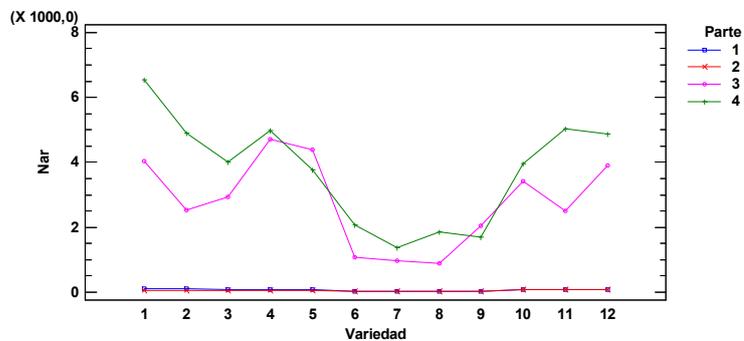


Figura A.1.2.3. Gráfico de interacción de la parte del fruto y la variedad para el flavonoide NARIRUTINA.

ANEXO 1.3. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA DIOSMINA CON LOS FACTORES VARIEDAD, PARTE DEL FRUTO Y ESTADO DE LA FRUTA.

Tabla A.1.3.1. Análisis de la varianza para DIOSMINA– Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
PRINCIPALES EFECTOS					
A: Variedad	2,22565E6	11	202332,	165,01	0,0000
B: Maduración	30388,5	1	30388,5	24,78	0,0000
C: Parte	7,12592E6	3	2,37531E6	1937,17	0,0000
INTERACCIONES					
AB	43945,0	11	3995,0	3,26	0,0004
AC	5,07371E6	33	153749,	125,39	0,0000
BC	37289,0	3	12429,7	10,14	0,0000

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.1.3.2. Prueba de múltiples rangos para la DIOSMINA en función de la variedad.

<i>Variedad</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
11	24	30,1042	7,14776	X
2	24	38,2104	7,14776	XX
6	24	40,2908	7,14776	XX
12	24	42,0542	7,14776	XX
5	24	43,7354	7,14776	XX
3	24	51,8225	7,14776	X
10	24	56,0125	7,14776	X
4	24	92,7429	7,14776	X
1	24	105,129	7,14776	X
8	24	229,171	7,14776	X
7	24	246,6	7,14776	X
9	24	277,971	7,14776	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.3.3. Prueba de múltiples rangos para la DIOSMINA en función de la Parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	1,67639	4,12676	X
2	72	2,12972	4,12676	X
3	72	38,4333	4,12676	X
4	72	375,708	4,12676	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.3.4. Prueba de múltiples rangos para la DIOSMINA función de la Maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	94,2149	2,91806	X
1	144	114,759	2,91806	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

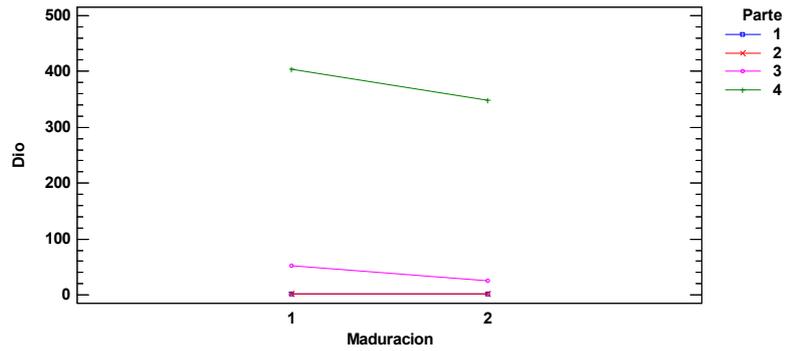


Figura A.1.3.1 Gráfico de interacción del estado de Maduración y la parte del fruto para el flavonoide DIOSMINA.

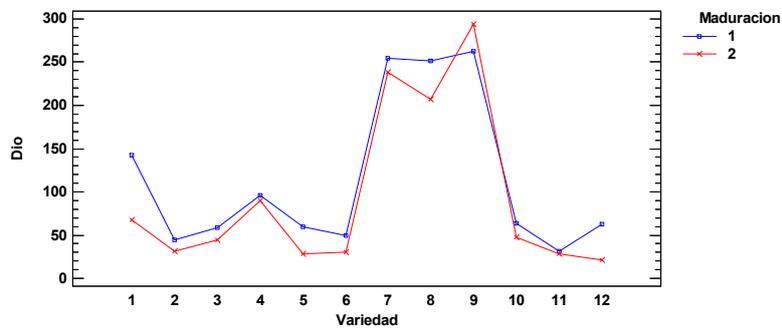


Figura A.1.3.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y la variedad para el flavonoide DIOSMINA.

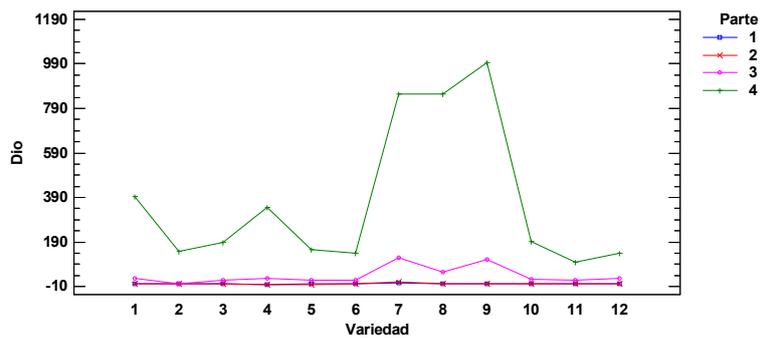


Figura A.1.3.3. Gráfico de interacción de la parte del fruto y la variedad para el flavonoide DIOSMINA.

ANEXO 1.4. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA NOBILETINA CON LOS FACTORES VARIEDAD, PARTE DEL FRUTO Y ESTADO DE LA FRUTA.

Tabla A.1.4.1. Análisis de la varianza para NOBILETINA– Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
PRINCIPALES EFECTOS					
A: Variedad	6,37869E6	11	579881,	337,02	0,0000
B: Maduración	41105,1	1	41105,1	23,89	0,0000
C: Parte	3,6828E7	3	1,2276E7	7134,74	0,0000
INTERACCIONES					
AB	111942,	11	10176,6	5,91	0,0000
AC	1,8696E7	33	566544,	329,27	0,0000
BC	116694,	3	38897,9	22,61	0,0000

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.1.4.2. Prueba de múltiples rangos para la NOBILETINA en función de la variedad.

<i>Variedad</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
6	24	62,3071	8,46708	X
7	24	76,8333	8,46708	X
9	24	100,484	8,46708	X
3	24	101,229	8,46708	X
8	24	128,862	8,46708	X
5	24	147,195	8,46708	XX
1	24	162,666	8,46708	XX
2	24	171,96	8,46708	X
4	24	182,481	8,46708	X
10	24	436,171	8,46708	X
11	24	458,617	8,46708	X
12	24	482,904	8,46708	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.4.3. Prueba de múltiples rangos para la NOBILETINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	0,396806	4,88847	X
2	72	1,03292	4,88847	X
3	72	7,14028	4,88847	X
4	72	828,667	4,88847	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.4.4. Prueba de múltiples rangos para la NOBILETINA función de la maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	197,362	3,45667	X
1	144	221,256	3,45667	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

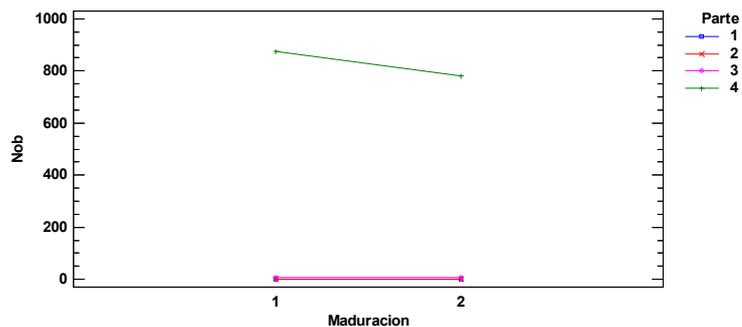


Figura A.1.4.1 Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto para el flavonoide NOBILETINA.

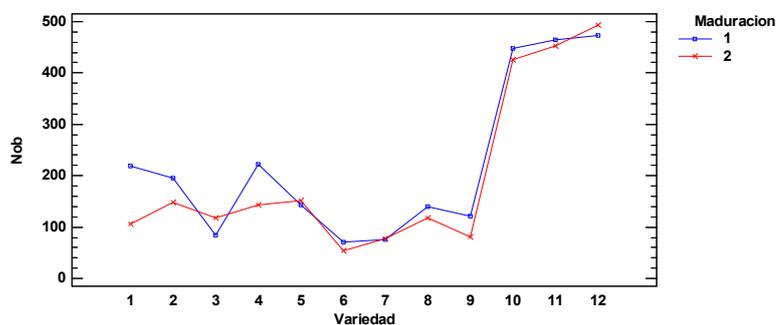


Figura A.1.4.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y la variedad para el flavonoide NOBILETINA.

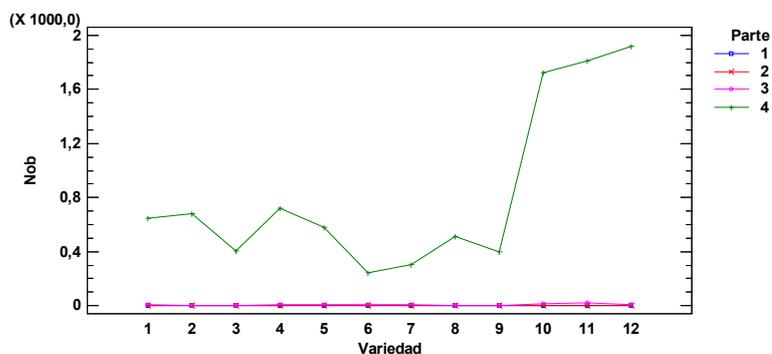


Figura A.1.4.3. Gráfico de interacción de la parte del fruto y la variedad para el flavonoide NOBILETINA.

ANEXO 1.5. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA TANGERETINA CON LOS FACTORES VARIEDAD, PARTE DEL FRUTO Y ESTADO DE LA FRUTA.

Tabla A.1.5.1. Análisis de la varianza para TANGERETINA– Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Variedad	1,31781E6	11	119801,	467,11	0,0000
B:Maduración	4639,01	1	4639,01	18,09	0,0000
C:Parte	2,44383E6	3	814611,	3176,19	0,0000
INTERACCIONES					
AB	7033,04	11	639,367	2,49	0,0057
AC	3,91254E6	33	118562,	462,28	0,0000
BC	13043,2	3	4347,74	16,95	0,0000

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.1.5.2. Prueba de múltiples rangos para la TANGERETINA en función de la variedad.

<i>Variedad</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
6	24	11,6963	3,26901	X
3	24	12,8875	3,26901	XX
8	24	20,28	3,26901	XXX
1	24	20,5854	3,26901	XXX
5	24	21,2308	3,26901	XX
4	24	24,9042	3,26901	X
9	24	25,57	3,26901	X
2	24	25,6387	3,26901	X
7	24	27,7421	3,26901	X
10	24	54,7675	3,26901	X
12	24	174,065	3,26901	X
11	24	228,747	3,26901	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.5.3. Prueba de múltiples rangos para la TANGERETINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	0,139444	1,88736	X
2	72	0,302917	1,88736	X
3	72	2,04028	1,88736	X
4	72	213,556	1,88736	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.5.4. Prueba de múltiples rangos para la TANGERETINA función de la maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	49,9961	1,33457	X
1	144	58,023	1,33457	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

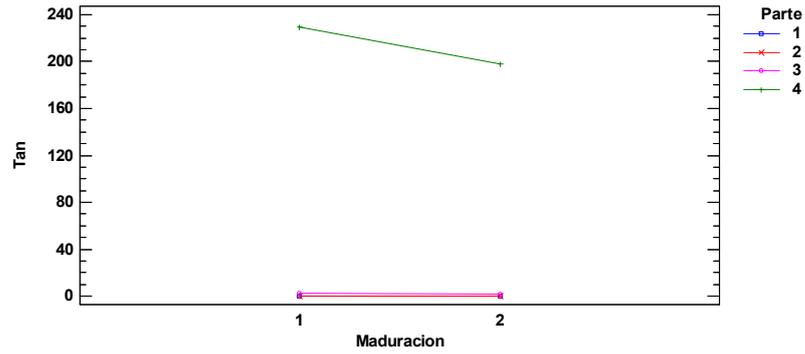


Figura A.1.5.1 Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto para el flavonoide TANGERETINA.

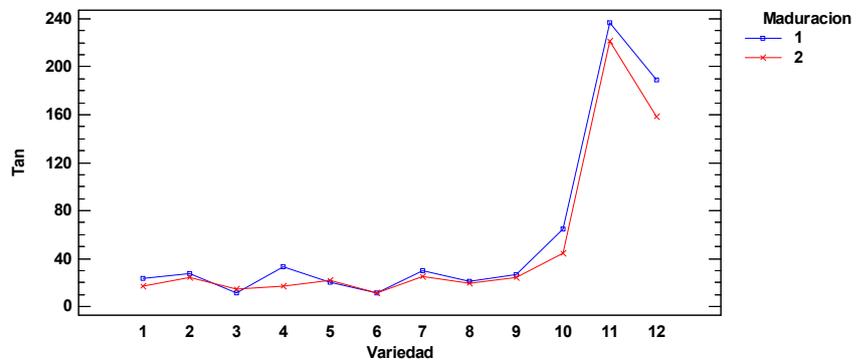


Figura A.1.5.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y la variedad para el flavonoide TANGERETINA.

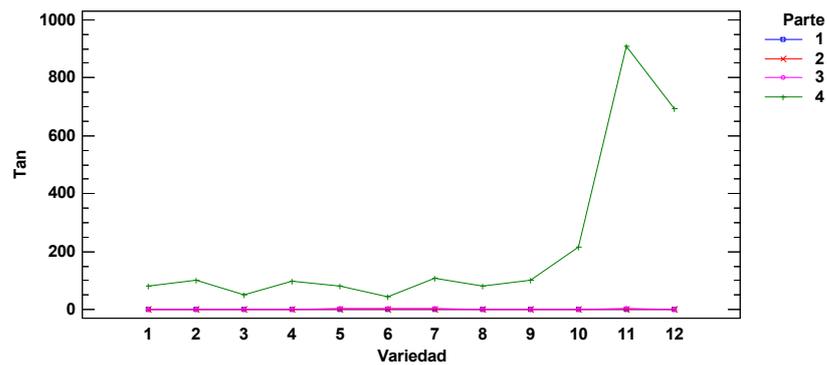


Figura A.1.5.3. Gráfico de interacción de la parte del fruto y la variedad para el flavonoide TANGERETINA.

ANEXO 1.6. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA SINENSETINA CON LOS FACTORES VARIEDAD, PARTE DEL FRUTO Y ESTADO DE MADURACIÓN DE LA FRUTA.

Tabla A.1.6.1. Análisis de la varianza para SINENSETINA– Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Variedad	777846,	11	70713,3	82,57	0,0000
B:Maduracion	9344,66	1	9344,66	10,91	0,0011
C:Parte	5,11184E6	3	1,70395E6	1989,74	0,0000
INTERACCIONES					
AB	61754,4	11	5614,04	6,56	0,0000
AC	2,2714E6	33	68830,2	80,37	0,0000
BC	26990,9	3	8996,97	10,51	0,0000

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.1.6.2. Prueba de múltiples rangos para la SINENSETINA en función de la variedad.

<i>Variedad</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
7	23	15,3608	6,13066	X
6	24	23,3158	5,97344	X
9	24	26,0262	5,97344	X
12	24	31,2221	5,97344	X
8	24	31,9542	5,97344	X
3	24	57,29	5,97344	X
5	24	100,923	5,97344	X
4	24	103,88	5,97344	XX
1	24	107,702	5,97344	XX
2	24	119,78	5,97344	XX
11	24	136,243	5,97344	X
10	24	183,083	5,97344	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.6.3. Prueba de múltiples rangos para la SINENSETINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	0,178889	3,44876	X
2	71	0,286501	3,47929	X
3	72	2,80833	3,44876	X
4	72	308,986	3,44876	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.1.6.4. Prueba de múltiples rangos para la SINENSETINA función de la maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	72,3561	2,43864	X
1	143	83,7738	2,44946	X

Las cruces indican grupos homogéneos.

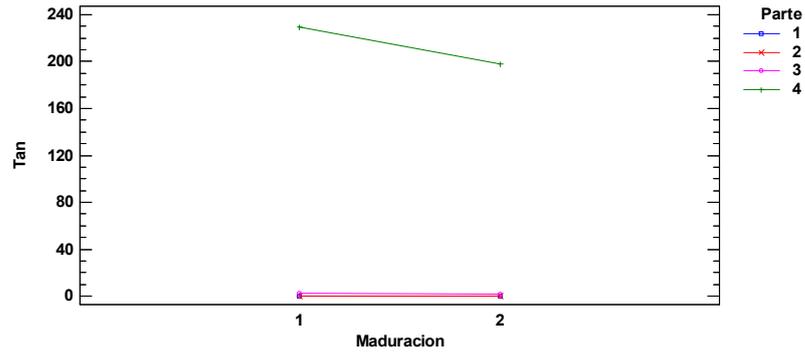


Figura A.1.5.1 Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto para el flavonoide TANGERETINA.

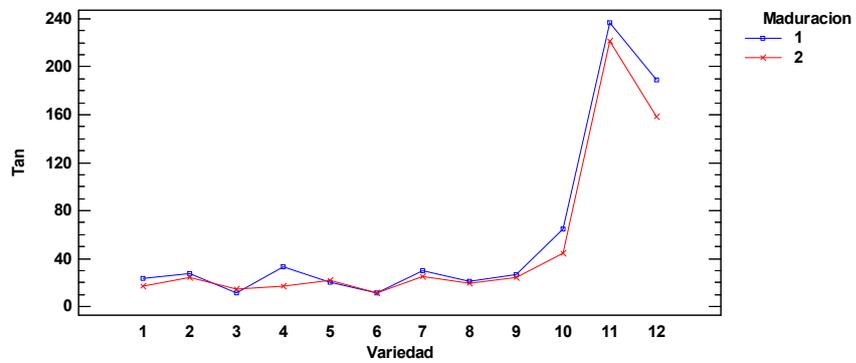


Figura A.1.5.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y la variedad para el flavonoide TANGERETINA.

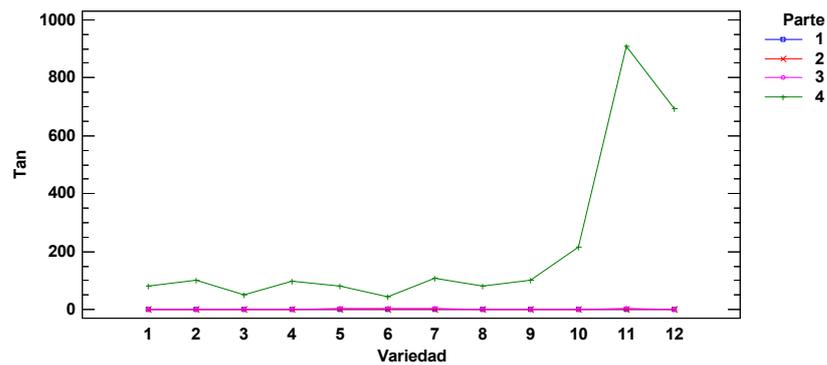


Figura A.1.5.3. Gráfico de interacción de la parte del fruto y la variedad para el flavonoide TANGERETINA.

ANEXO 2. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA NARIRUTINA CON LOS FACTORES TIPO DE FRUTA (1=NARANJA; 2=MANDARINA), PARTE DEL FRUTO (1=EXPRIMIDORA MANUAL; 2= EXPRIMIDORA INDUSTRIAL; 3=MEMBRANAS ENDOCARPIO; 4=CORTEZA) Y ESTADO DE MADURACIÓN (1=TEMPRANA; 2=TARDÍA).

Tabla A.2.1. Análisis de la varianza para NARIRUTINA – Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
PRINCIPALES EFECTOS					
A:Fruta	2,28806E7	1	2,28806E7	15,01	0,0001
B:Parte	7,74995E8	3	2,58332E8	169,51	0,0000
C:Maduracion	70760,5	1	70760,5	0,05	0,8296
INTERACCIONES					
AB	2,26085E7	3	7,53616E6	4,94	0,0023
AC	354367,	1	354367,	0,23	0,6300
BC	916812,	3	305604,	0,20	0,8960

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.2.2. Prueba de múltiples rangos para la NARIRUTINA en función del tipo de fruta.

<i>Fruta</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
2	144	1381,24	102,875	×
1	143	1945,99	103,249	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.2.3. Prueba de múltiples rangos para la NARIRUTINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	72	51,425	145,488	×
1	71	62,5682	146,542	×
3	72	2782,51	145,488	×
4	72	3757,96	145,488	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.2.4. Prueba de múltiples rangos para la NARIRUTINA en función del estado de maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	1647,91	102,875	×
1	143	1679,32	103,249	×

Las cruces indican grupos homogéneos

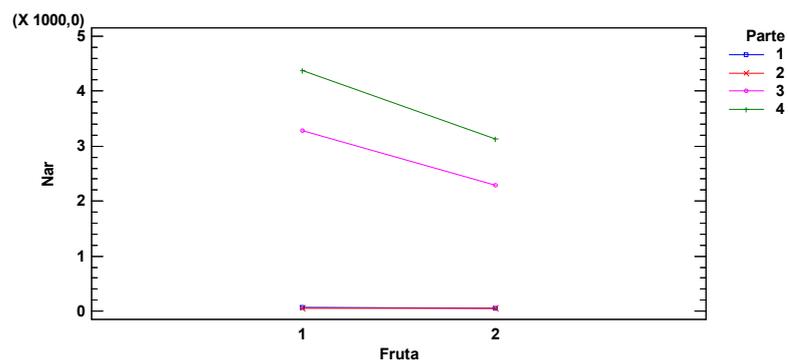


Figura A.2.1. Gráfico de interacción de la parte del fruto y el tipo de fruta para el flavonoide NARIRUTINA.

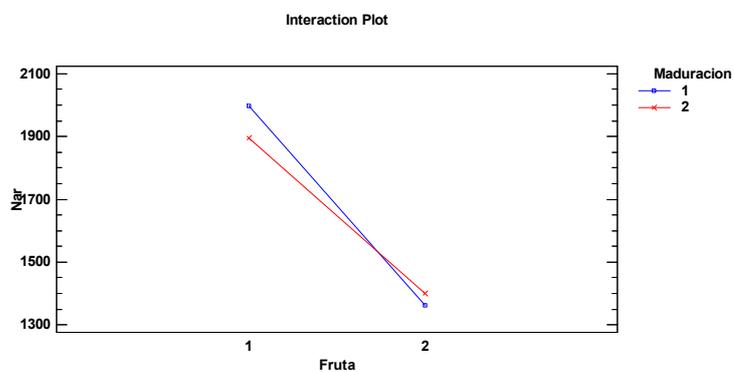


Figura A.2.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y el tipo de fruta para el flavonoide NARIRUTINA.

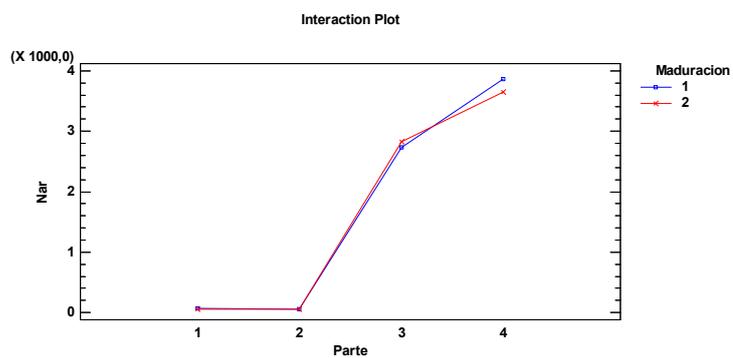


Figura A.2.3. Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto NARIRUTINA.

ANEXO 3. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA HESPERIDINA CON LOS FACTORES TIPO DE FRUTA (1=NARANJA; 2=MANDARINA), PARTE DEL FRUTO (1=EXPRIMIDORA MANUAL; 2= EXPRIMIDORA INDUSTRIAL; 3=MEMBRANAS ENDOCARPIO; 4=CORTEZA) Y ESTADO DE MADURACIÓN (1=TEMPRANA; 2=TARDÍA).

Tabla A.3.1. Análisis de la varianza para HESPERIDINA – Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Fruta	6,04416E8	1	6,04416E8	13,65	0,0003
B:Parte	5,5722E10	3	1,8574E10	419,43	0,0000
C:Maduracion	2,89534E8	1	2,89534E8	6,54	0,0111
INTERACCIONES					
AB	6,66523E8	3	2,22174E8	5,02	0,0021
AC	1,01558E8	1	1,01558E8	2,29	0,1311
BC	6,22462E8	3	2,07487E8	4,69	0,0033

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.3.2. Prueba de múltiples rangos para la HESPERIDINA en función del tipo de fruta.

<i>Fruta</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
2	144	9854,98	554,55	×
1	144	12752,3	554,55	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.3.3. Prueba de múltiples rangos para la HESPERIDINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	280,338	784,252	×
2	72	296,572	784,252	×
3	72	10306,8	784,252	×
4	72	34330,9	784,252	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.3.4. Prueba de múltiples rangos para la HESPERIDINA en función del estado de maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	10301,0	554,55	×
1	144	12306,3	554,55	×

Las cruces indican grupos homogéneos

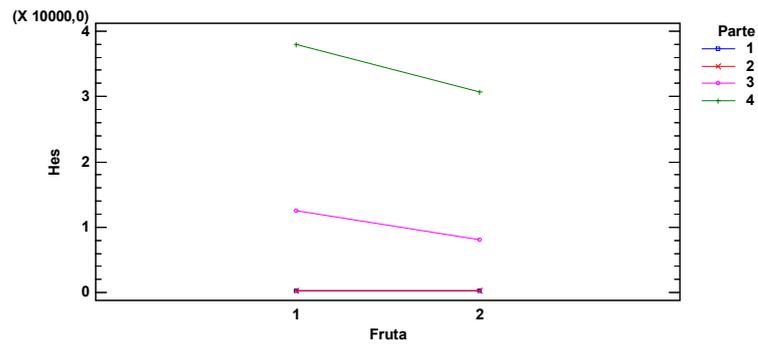


Figura A.3.1. Gráfico de interacción de la parte del fruto y el tipo de fruta para el flavonoide HESPERIDINA.

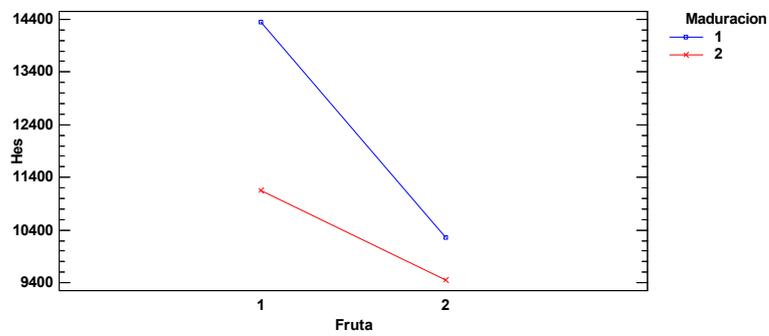


Figura A.3.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y el tipo de fruta para el flavonoide HESPERIDINA.

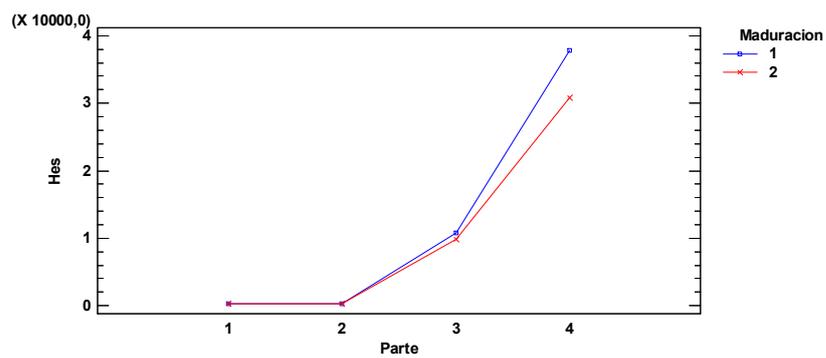


Figura A.3.3. Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto HESPERIDINA.

ANEXO 4. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA NOBILETINA CON LOS FACTORES TIPO DE FRUTA (1=NARANJA; 2=MANDARINA), PARTE DEL FRUTO (1=EXPRIMIDORA MANUAL; 2= EXPRIMIDORA INDUSTRIAL; 3=MEMBRANAS ENDOCARPIO; 4=CORTEZA) Y ESTADO DE MADURACIÓN (1=TEMPRANA; 2=TARDÍA).

Tabla A.4.1. Análisis de la varianza para NOBILETINA – Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Fruta	1,46558E6	1	1,46558E6	20,35	0,0000
B:Parte	3,6828E7	3	1,2276E7	170,42	0,0000
C:Maduracion	41105,1	1	41105,1	0,57	0,4507
INTERACCIONES					
AB	4,28867E6	3	1,42956E6	19,85	0,0000
AC	9632,95	1	9632,95	0,13	0,7149
BC	116694,	3	38897,9	0,54	0,6553

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.4.2. Prueba de múltiples rangos para la NOBILETINA en función del tipo de fruta.

<i>Fruta</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
1	144	137,973	22,3662	×
2	144	280,645	22,3662	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.4.3. Prueba de múltiples rangos para la NOBILETINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	0,396806	31,6306	×
2	72	1,03292	31,6306	×
3	72	7,14028	31,6306	×
4	72	828,667	31,6306	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.4.4. Prueba de múltiples rangos para la NOBILETINA en función del estado de maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	197,362	22,3662	×
1	144	221,256	22,3662	×

Las cruces indican grupos homogéneos

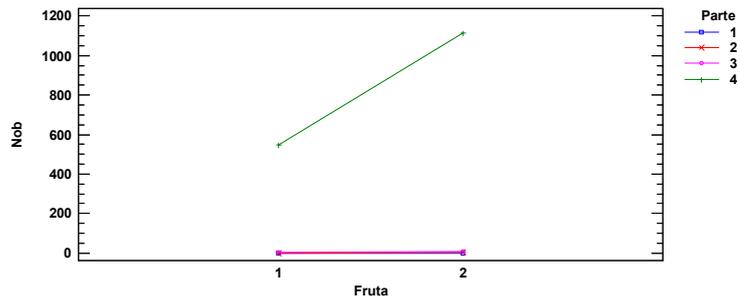


Figura A.4.1. Gráfico de interacción de la parte del fruto y el tipo de fruta para el flavonoide NOBILETINA.

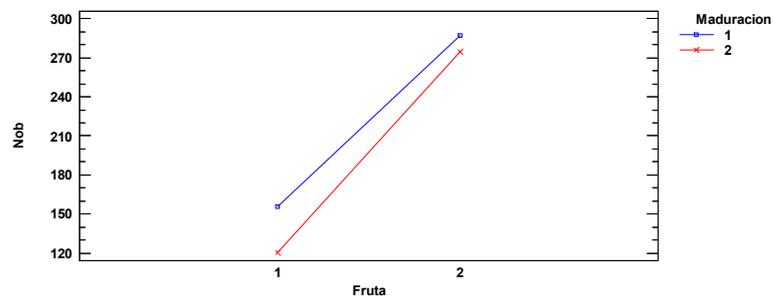


Figura A.4.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y el tipo de fruta para el flavonoide NOBILETINA.

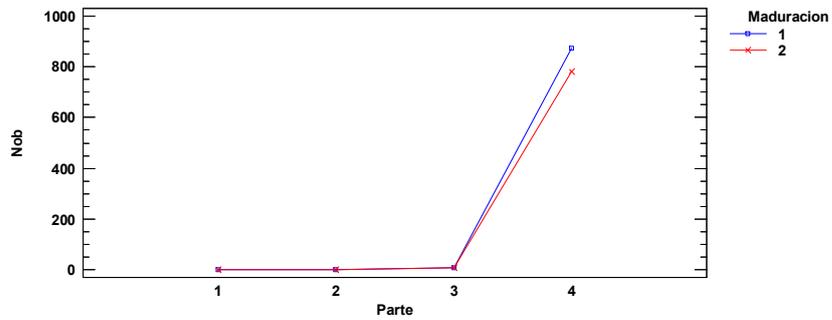


Figura A.4.3. Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto NOBILETINA.

ANEXO 5. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA TANGERETINA CON LOS FACTORES TIPO DE FRUTA (1=NARANJA; 2=MANDARINA), PARTE DEL FRUTO (1=EXPRIMIDORA MANUAL; 2= EXPRIMIDORA INDUSTRIAL; 3=MEMBRANAS ENDOCARPIO; 4=CORTEZA) Y ESTADO DE MADURACIÓN (1=TEMPRANA; 2=TARDÍA).

Tabla A.5.1. Análisis de la varianza para TANGERETINA – Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Fruta	343171,	1	343171,	24,03	0,0000
B:Parte	2,44383E6	3	814611,	57,03	0,0000
C:Maduracion	4639,01	1	4639,01	0,32	0,5692
INTERACCIONES					
AB	1,02249E6	3	340829,	23,86	0,0000
AC	1418,0	1	1418,0	0,10	0,7529
BC	13043,2	3	4347,74	0,30	0,8222

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.5.2. Prueba de múltiples rangos para la TANGERETINA en función del tipo de fruta.

<i>Fruta</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
1	144	19,4905	9,95953	×
2	144	88,5286	9,95953	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.5.3. Prueba de múltiples rangos para la TANGERETINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	0,139444	14,0849	×
2	72	0,302917	14,0849	×
3	72	2,04028	14,0849	×
4	72	213,556	14,0849	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.5.4. Prueba de múltiples rangos para la TANGERETINA en función del estado de maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	49,9961	9,95953	×
1	144	58,023	9,95953	×

Las cruces indican grupos homogéneos

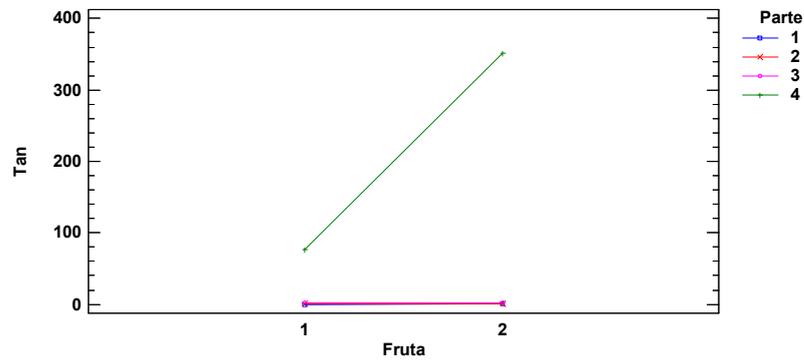


Figura A.5.1. Gráfico de interacción de la parte del fruto y el tipo de fruta para el flavonoide TANGERETINA.

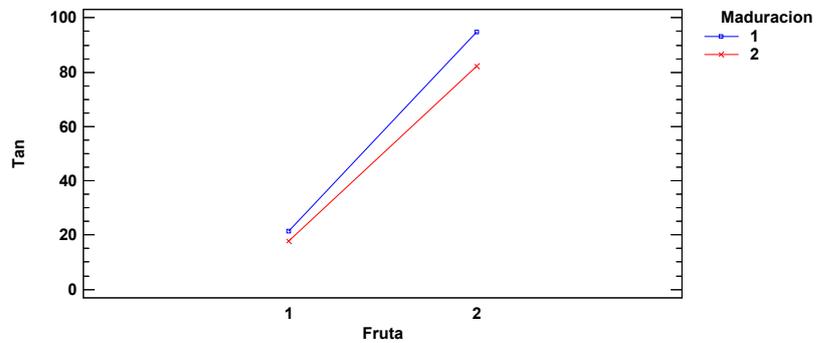


Figura A.5.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y el tipo de fruta para el flavonoide TANGERETINA.

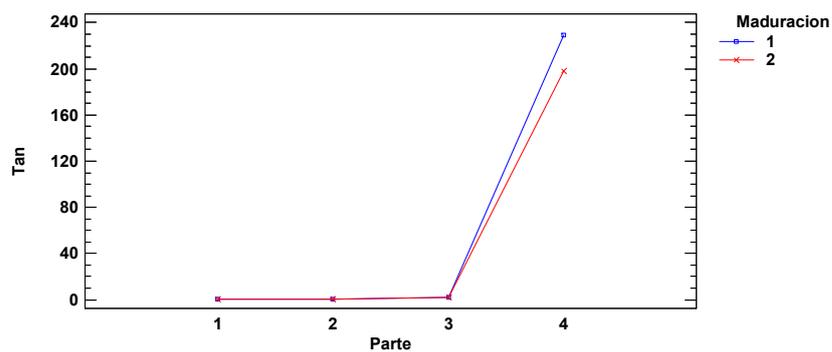


Figura A.5.3. Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto TANGERETINA.

ANEXO 6. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA DIOSMINA CON LOS FACTORES TIPO DE FRUTA (1=NARANJA; 2=MANDARINA), PARTE DEL FRUTO (1=EXPRIMIDORA MANUAL; 2= EXPRIMIDORA INDUSTRIAL; 3=MEMBRANAS ENDOCARPIO; 4=CORTEZA) Y ESTADO DE MADURACIÓN (1=TEMPRANA; 2=TARDÍA).

Tabla A.6.1. Análisis de la varianza para DIOSMINA – Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Fruta	520163,	1	520163,	23,76	0,0000
B:Parte	7,12592E6	3	2,37531E6	108,50	0,0000
C:Maduracion	30388,5	1	30388,5	1,39	0,2398
INTERACCIONES					
AB	1,0761E6	3	358700,	16,38	0,0000
AC	2376,82	1	2376,82	0,11	0,7420
BC	37289,0	3	12429,7	0,57	0,6367

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.6.2. Prueba de múltiples rangos para la DIOSMINA en función del tipo de fruta.

<i>Fruta</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
1	144	61,9885	12,3302	x
2	144	146,985	12,3302	x

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.6.3. Prueba de múltiples rangos para la DIOSMINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	1,67639	17,4376	x
2	72	2,12972	17,4376	x
3	72	38,4333	17,4376	x
4	72	375,708	17,4376	x

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.6.4. Prueba de múltiples rangos para la DIOSMINA en función del estado de maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	94,2149	12,3302	x
1	144	114,759	12,3302	x

Las cruces indican grupos homogéneos

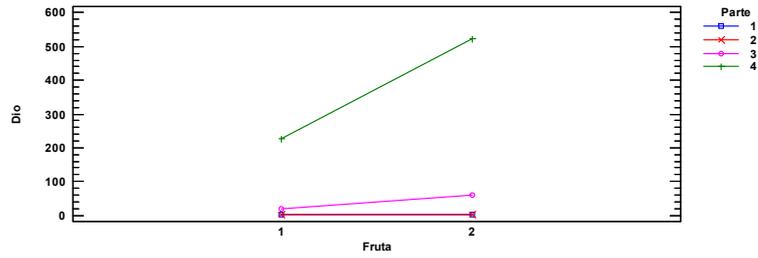


Figura A.6.1. Gráfico de interacción de la parte del fruto y el tipo de fruta para el flavonoide DIOSMINA.

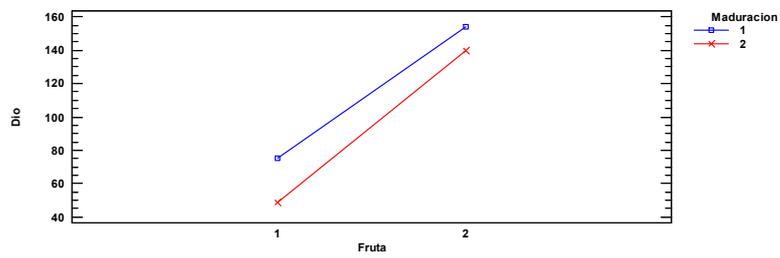


Figura A.6.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y el tipo de fruta para el flavonoide DIOSMINA.

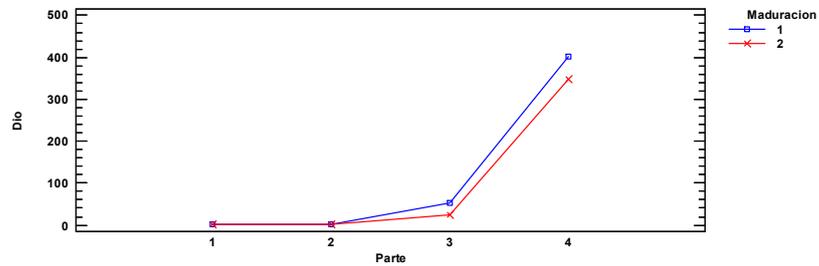


Figura A.6.3. Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto DIOSMINA.

ANEXO 7. ANOVA MULTIFACTORIAL DE LA SINENSETINA CON LOS FACTORES TIPO DE FRUTA (1=NARANJA; 2=MANDARINA), PARTE DEL FRUTO (1=EXPRIMIDORA MANUAL; 2= EXPRIMIDORA INDUSTRIAL; 3=MEMBRANAS ENDOCARPIO; 4=CORTEZA) Y ESTADO DE MADURACIÓN (1=TEMPRANA; 2=TARDÍA).

Tabla A.7.1. Análisis de la varianza para SINENSETINA – Tipo III suma de cuadrados.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Fruta	15776,4	1	15776,4	1,34	0,2487
B:Parte	5,11312E6	3	1,70437E6	144,33	0,0000
C:Maduracion	9359,11	1	9359,11	0,79	0,3741
INTERACCIONES					
AB	45893,5	3	15297,8	1,30	0,2763
AC	14459,9	1	14459,9	1,22	0,2694
BC	26991,6	3	8997,21	0,76	0,5163

Todos los F-ratios están basados en el error cuadrático medio residual

Tabla A.7.2. Prueba de múltiples rangos para la SINENSETINA en función del tipo de fruta.

<i>Fruta</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
2	143	70,6523	9,08849	×
1	144	85,4818	9,05562	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.7.3. Prueba de múltiples rangos para la SINENSETINA en función de la parte del fruto.

<i>Parte del fruto</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	72	0,178889	12,8066	×
2	71	0,294956	12,8994	×
3	72	2,80833	12,8066	×
4	72	308,986	12,8066	×

Las cruces indican grupos homogéneos.

Tabla A.7.4. Prueba de múltiples rangos para la SINENSETINA en función del estado de maduración.

<i>Maduración</i>	<i>Count</i>	<i>LS Mean</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
2	144	72,3561	9,05562	×
1	143	83,778	9,08849	×

Las cruces indican grupos homogéneos

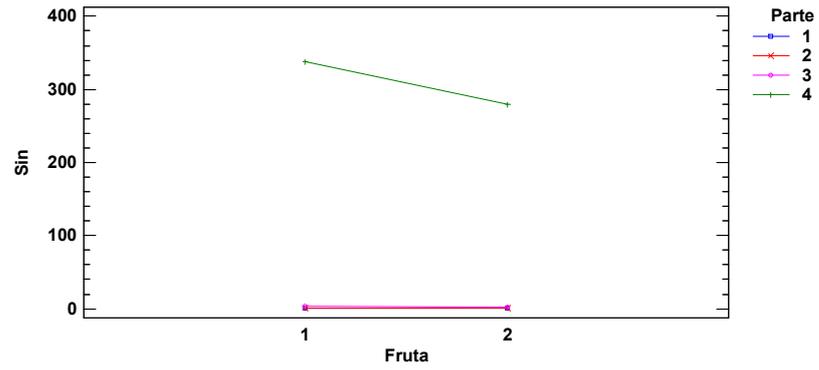


Figura A.7.1. Gráfico de interacción de la parte del fruto y el tipo de fruta para el flavonoide SINENSETINA.

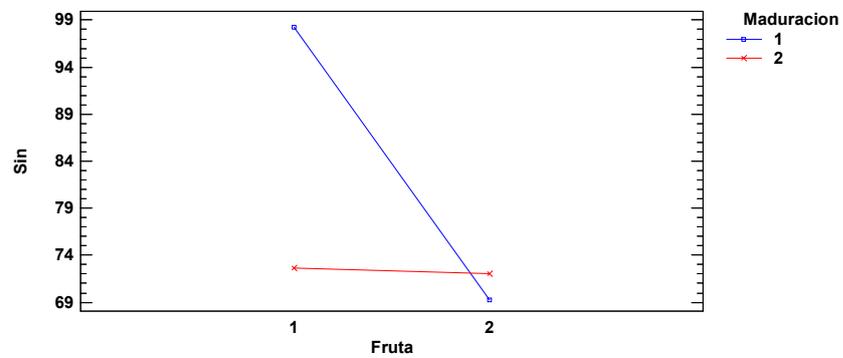


Figura A.7.2. Gráfico de interacción del estado de maduración y el tipo de fruta para el flavonoide SINENSETINA.

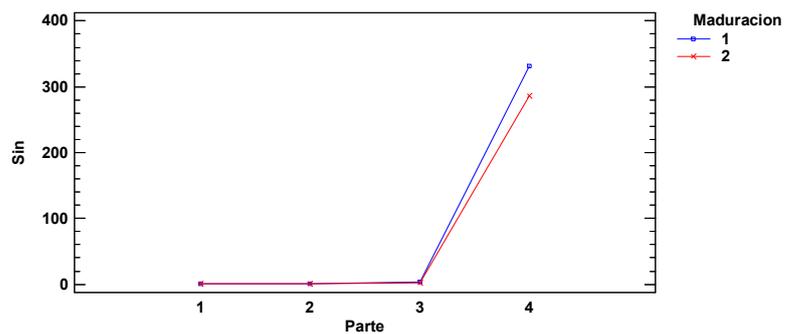


Figura A.7.3. Gráfico de interacción del estado de maduración y la parte del fruto SINENSETINA.

ANEXO 8. ANOVA UNIFACTORIAL DEL EXTRACTO DE HESPERIDINA RECUPERADO (EHrecup) CON EL FACTOR DILUCIÓN (1=1:2; 2=1:0,25?).

Tabla A.8.1. Tabla del ANOVA para EHrecup para el factor Dilución.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Entre grupos	0,564267	1	0,564267	1,85	0,2458
Dentro del grupo	1,22247	4	0,305617		

Tabla A.8.2. Prueba de múltiples rangos para la EHrecup en función de la dilución.

<i>Dilución</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
2	3	2,53667	X
1	3	3,15	X

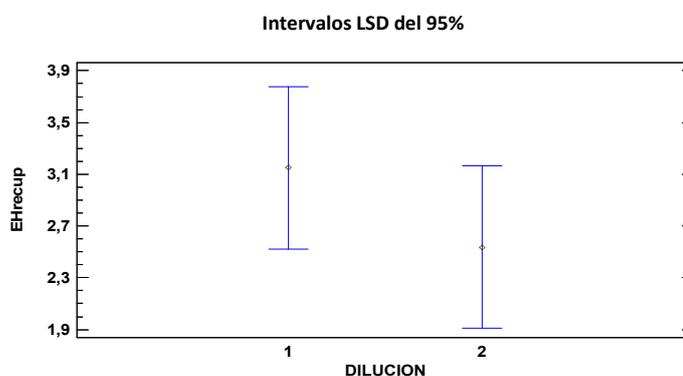


Figura A.9.1. Extracto de hesperidina recuperado en los dos niveles de dilución ensayados.

**ANEXO 9. ANOVA UNIFACTORIAL DE LA PUREZA DE LA HESPERIDINA (PurezaHes)
CON EL FACTOR DILUCIÓN (1=1:2; 2=1:0,25).**

Tabla A.9.1. Tabla del ANOVA para PurezaHes para el factor Dilución.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	76,3267	1	76,3267	16,11	0,0159
Within groups	18,9533	4	4,73833		

Tabla A.9.2. Prueba de múltiples rangos para la PurezaHes en función de la dilución.

<i>Dilución</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
2	3	55,0333	×
1	3	62,1667	×

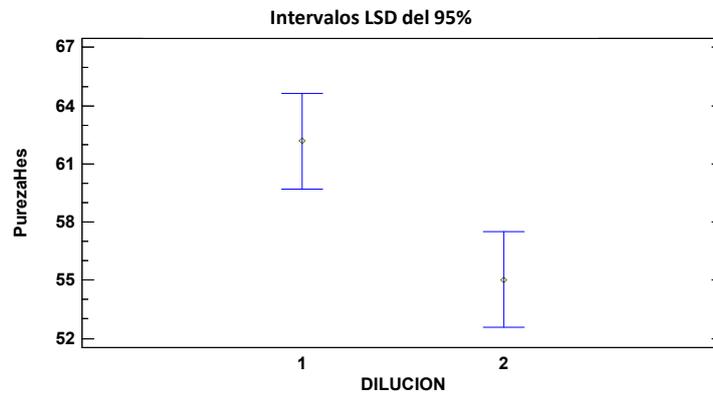


Figura A.9.1. Pureza de la hesperidina en los dos niveles de dilución ensayados.

ANEXO 10. ANOVA UNIFACTORIAL DE LA HESPERIDINA PURA TOTAL OBTENIDA (HespPuraTot) CON EL FACTOR DILUCIÓN (1=1:2; 2=1:0,25).

Tabla A.10.1. Tabla del ANOVA para HespPuraTot para el factor Dilución.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Between groups	0,493067	1	0,493067	4,41	0,1037
Within groups	0,447301	4	0,111825		

Tabla A.10.2. Prueba de múltiples rangos para la HespPuraTot en función de la dilución.

<i>Dilución</i>	<i>Count</i>	<i>Mean</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
2	3	1,38967	X
1	3	1,963	X

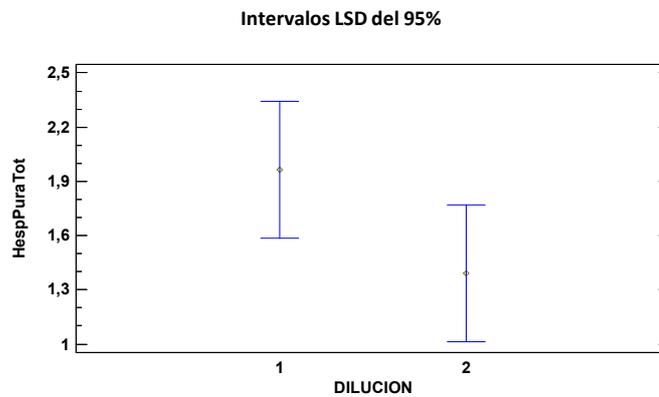


Figura A.10.1. Hesperidina pura total obtenida en los dos niveles de dilución ensayados.