



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

***Universitat Politècnica de València***

*Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural*

---

**IMPACTO DE LA LIOFILIZACIÓN EN LA  
BIOACCESIBILIDAD DE LOS FENOLES, CAROTENOIDES Y  
VITAMINA C DE PRODUCTOS DE NARANJA**

---

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

*Curso académico: 2020-2021*

*Valencia, julio de 2021*

**Alumna:** Sara Pinar Escobar

**Tutora académica:** Eva García Martínez

# IMPACTO DE LA LIOFILIZACIÓN EN LA BIOACCESIBILIDAD DE LOS FENOLES, CAROTENOIDES Y VITAMINA C DE PRODUCTOS DE NARANJA

## Resumen

Las industrias de transformación de alimentos, como por ejemplo la industria de elaboración de productos de naranja, generan grandes cantidades de residuos que son derivados principalmente a la alimentación animal o al compostaje. Sin embargo, debido a su contenido en compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes podría ser interesante utilizar este subproducto como ingrediente para la obtención de nuevos alimentos. De esta manera se obtendría un rendimiento de estos subproductos y se conseguiría reducir la generación de residuos contaminantes. Por otra parte, el carácter perecedero de estos residuos hace necesaria su conservación mediante tecnologías de secado, como la liofilización. En el empleo de esta técnica es habitual la incorporación de biopolímeros de alto peso molecular para estabilizar el producto. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la liofilización en el contenido de los fenoles, carotenoides y vitamina C del puré de naranja y su coproducto, así como en su bioaccesibilidad. Se trabajará con dos condiciones de temperatura de bandeja del liofilizador 30 y 50°C, y se adicionará goma arábiga (5%) y fibra de bambú (1%), según proporciones optimizadas en estudios previos. Se analizarán los compuestos bioactivos mayoritarios en la naranja (por cromatografía líquida de alta resolución -HPLC- y espectrofotometría UV-visible), así como la actividad antioxidante (método FRAP, basado en la capacidad de reducción férrica, y método DPPH, basado en la captación de radicales libres) antes y después de la liofilización. Finalmente se realizarán digestiones *in vitro* para evaluar la bioaccesibilidad.

Los resultados obtenidos mostraron que el coproducto del puré de naranja presentó valores significativamente más altos de compuestos bioactivos y mayor actividad antioxidante que el puré formulado con goma arábiga y fibra de bambú. La adición de biopolímeros no afectó ni al contenido en fitoquímicos ni a la actividad antioxidante del coproducto. La liofilización disminuyó los fenoles totales (entre 11-30%) y los carotenoides (entre 14-59%) de los productos, independientemente de las condiciones del proceso. Sin embargo, la actividad antioxidante no se vio afectada, por lo que ésta parece estar más relacionada con la vitamina C, que fue la que resultó más estable.

En relación a la digestión *in vitro* de las muestras, el puré de naranja formulado con biopolímeros presentó mayor bioaccesibilidad en todos los compuestos bioactivos estudiados que el coproducto. De esta manera, aunque el coproducto presentó más fitoquímicos, éstos resultaron ser menos absorbibles, debido a la distinta composición y naturaleza química de los compuestos fenólicos, vitamina C y carotenoides en la piel y en la pulpa de la naranja.

**Palabras clave:** coproducto, bioactivos, actividad antioxidante, digestión *in vitro*, liofilización, bioaccesibilidad.

**Alumna:** Dña. Sara Pinar Escobar

**Valencia, junio de 2021**

**Prof. Dña.:** Eva García Martínez

## IMPACT OF FREEZE-DRIEDNESS ON THE BIOACCESSIBILITY OF PHENOLS, CAROTENOIDS AND VITAMIN C OF ORANGE PRODUCTS

### Abstract

Food processing industries, such as the orange processing industry, generate large amounts of waste that are mainly derived for animal feed or composting. However, due to its content in bioactive compounds and antioxidant properties, it could be interesting to use this by-product as an ingredient for the production of new food products. In this way, a yield could be obtained from these by-products and the generation of polluting waste could be reduced. On the other hand, the perishable nature of this waste makes it necessary to preserve it by means of drying technologies, such as freeze-drying. In the use of this technique, it is common to incorporate high molecular weight biopolymers to stabilize the product. In this context, the aim of this work was to study the influence of freeze-drying on the content of phenols, carotenoids and vitamin C in orange puree and its co-product, as well as on its bioaccessibility. Two freeze-dryer tray temperature conditions will be used, 30 and 50°C, and gum arabic (5%) and bamboo fibre (1%) will be added, according to proportions optimized in previous studies. The majority of bioactive compounds in the orange will be analyzed (by high performance liquid chromatography -HPLC- and UV-visible spectrophotometry), as well as the antioxidant activity (FRAP method, based on the ferric reduction capacity, and DPPH method, based on the free radical scavenging) before and after freeze-drying. Finally, *in vitro* digestions will be carried out to evaluate their bioaccessibility.

The results obtained showed that the co-product of the orange puree presented significantly higher values of bioactive compounds and higher antioxidant activity than the puree formulated with gum arabic and bamboo fiber. The addition of biopolymers did not affect either the phytochemical content or the antioxidant activity of the co-product. Freeze-drying decreased the total phenols (between 11-30%) and carotenoids (between 14-59%) of the products, independently on the process conditions. However, antioxidant activity was not affected, so it seems to be more related to vitamin C, which was the most stable.

In relation to the *in vitro* digestion of the samples, the orange puree formulated with biopolymers presented higher bioaccessibility in all the bioactive compounds studied than the co-product. Thus, although the co-product had more phytochemicals, they were less absorbable, due to the different composition and chemical nature of phenolic compounds, vitamin C and carotenoids in the peel and pulp of the orange.

**Key words:** co-product, bioactives, antioxidant activity, *in vitro* digestion, freeze-drying, bioaccessibility.

**Alumna:** Dña. Sara Pinar Escobar

**Valencia, june de 2021**

**Prof. Dña.:** Eva García Martínez

# IMPACTE DE LA LIOFILITZACIÓ EN LA BIOACCESIBILITAT DELS FENOLS, CAROTENOIDES I VITAMINA C DE PRODUCTES DE TARONJA

## Resum

Les indústries de transformació d'aliments, com per exemple la indústria d'elaboració de productes de taronja, generen grans quantitats de residus que són derivats principalment a l'alimentació animal o al compostatge. No obstant això, a causa del seu contingut en compostos bioactius i propietats antioxidants podria ser interessant utilitzar aquest subproducte com a ingredient per a l'obtenció de nous aliments. D'aquesta manera s'obtidria un rendiment d'aquests subproductes i s'aconseguiria reduir la generació de residus contaminants. D'altra banda, el caràcter perible d'aquests residus fa necessària la seua conservació mitjançant tecnologies d'assecat, com la liofilització. En l'ús d'aquesta tècnica és habitual la incorporació de biopolímers d'alt pes molecular per a estabilitzar el producte. En aquest sentit, l'objectiu d'aquest treball va ser estudiar la influència de la liofilització en el contingut dels fenols, carotenoides i vitamina C del puré de taronja i la seua coproducte, així com en la seua bioaccessibilitat. Es treballarà amb dues condicions de temperatura de safata del liofilitzador 30 i 50 °C, i s'addicionarà goma aràbiga (5%) i fibra de bambú (1%), segons proporcions optimitzades en estudis previs. S'analitzaran els compostos bioactius majoritaris en la taronja (per cromatografia líquida d'alta resolució -HPLC- i espectrofotometria UV-visible), així com l'activitat antioxidant (mètode FRAP, basat en la capacitat de reducció fèrrica, i mètode DPPH, basat en la captació de radicals lliures) abans i després de la liofilització. Finalment es realitzaran digestions *in vitro* per a avaluar la bioaccessibilitat.

Els resultats obtinguts van mostrar que el coproducte del puré de taronja va presentar valors significativament més alts de compostos bioactius i major activitat antioxidant que el puré formulat amb goma aràbiga i fibra de bambú. L'addició de biopolímers no va afectar ni al contingut en fitoquímics ni a l'activitat antioxidant del coproducte. La liofilització va disminuir els fenols totals (entre 11-30%) i els carotenoides (entre 14-59%) dels productes, independentment de les condicions del procés. No obstant això l'activitat antioxidant no es veu afectada, per la qual cosa aquesta sembla estar més relacionada amb la vitamina C, que va ser la que va resultar més estable.

En relació a la digestió *in vitro* de les mostres, el puré de taronja formulat amb biopolímers va presentar major bioaccessibilitat en tots els compostos bioactius estudiats que el coproducte. D'aquesta manera, encara que el coproducte va presentar més fitoquímics, aquests van resultar ser menys absorbibles, a causa de la diferente composició i naturalesa química dels compostos fenòlics, vitamina C i carotenoides en la pell i en la polpa de la taronja.

**Paraules clau:** coproducte, bioactiu, activitat antioxidant, digestió *in vitro*, bioaccessibilitat.

**Alumna:** Dña. Sara Pinar Escobar

**València, juny de 2021**

**Prof. Dña.:** Eva García Martínez

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Relevancia del consumo de las frutas y verduras.....	1
1.2 Compuestos bioactivos de la naranja .....	3
1.3 Liofilización.....	5
1.4 Bioaccesibilidad y digestión .....	6
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>9</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>10</b>
3.1 Materias primas.....	10
3.2 Metodología .....	10
3.2.1 Preparación de las muestras .....	10
3.2.1.1 Obtención de las muestras a partir del puré de naranja .....	10
3.2.1.2 Obtención de las muestras a partir del coproducto de naranja.....	10
3.2.1.3 Obtención de los productos liofilizados.....	11
3.2.2 Digestión <i>in vitro</i> .....	13
3.2.2.1 Fase oral.....	13
3.2.2.2 Fase gástrica .....	13
3.2.2.3 Fase intestinal.....	14
3.2.3 Determinaciones analíticas .....	15
3.2.3.1 Humedad .....	15
3.2.3.2 Vitamina C.....	15
3.2.3.3 Carotenoides totales.....	15
3.2.3.4 Fenoles totales .....	16
3.2.3.5 Actividad antioxidante .....	16
3.2.4 Cálculo de la bioaccesibilidad.....	17
3.2.5 Análisis estadístico.....	17
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>18</b>
4.1 Caracterización química de los productos. Efectos de la liofilización y de la adición de biopolímeros en los compuestos bioactivos y en la actividad antioxidante .....	18
4.2 Digestión de las muestras y bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos .....	26
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>29</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>30</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Partes de una naranja y compuestos bioactivos del subproducto</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> <i>Estructuras y procesos del sistema digestivo</i> .....	7
<b>Figura 3.</b> <i>Coproducto con biopolímeros</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> <i>Liofilizador TelstarLioalfa-6, España, con las muestras en bandejas, listas para liofilizar</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> <i>Muestras de coproductos liofilizados antes (A) y después (B) de ser trituradas, respectivamente</i> .....	12
<b>Figura 6.</b> <i>Muestras durante la fase gástrica dentro de la cámara de temperatura controlada</i> .....	13
<b>Figura 7.</b> <i>Muestras durante la fase intestinal dentro de la cámara de temperatura controlada</i> .....	14
<b>Figura 8.</b> <i>Membrana de diálisis tras finalizar la fase de digestión intestinal</i> .....	14
<b>Figura 9.</b> <i>Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico (GAE)/100 g mf) en las diferentes muestras analizadas</i> .....	19
<b>Figura 10.</b> <i>Contenido en vitamina C, ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (DHAA) (mg VC/100 g mf), en los diferentes productos analizados</i> .....	21
<b>Figura 11.</b> <i>Contenido en carotenoides totales (mg <math>\beta</math>-Caroteno/100 g mf) en las diferentes muestras analizadas</i> .....	22
<b>Figura 12.</b> <i>Actividad antioxidante (mmol Trolox/100 g mf) medida mediante el método FRAP de las diferentes muestras analizadas</i> .....	23
<b>Figura 13.</b> <i>Actividad antioxidante (mmol Trolox/100 g mf) medida mediante el método DPPH de las diferentes muestras analizadas</i> .....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Composición nutricional y funcional de la naranja</i> .....	2
<b>Tabla 2.</b> <i>Nomenclatura utilizada para las muestras</i> .....	11
<b>Tabla 3.</b> <i>Valores medios <math>\pm</math> desviación estándar de la humedad de las muestras (g de agua/100g)</i> .....	18
<b>Tabla 4.</b> <i>Coefficientes de correlación de Pearson entre las actividades antioxidantes medidas por cada método FRAP y DPPH y los compuestos analizados en las muestras</i> .....	25
<b>Tabla 5.</b> <i>Contenido en fenoles totales (TF, mg GAE/100g mf), vitamina C (VC, mg VC/100g mf), ácido ascórbico (AA, mg VC/100g mf), ácido dehidroascórbico (DHAA, mg/100g mf) y carotenoides totales (CT, mg <math>\beta</math>-Caroteno/100g mf) de las muestras</i> .....	26
<b>Tabla 6.</b> <i>Porcentaje de bioaccesibilidad (%) de los compuestos bioactivos en las muestras</i> .....	27
<b>Tabla 7.</b> <i>Actividad antioxidante de las muestras digeridas analizadas mediante el método FRAP y DPPH (mmol Trolox/100g mf) y estimación de la actividad antioxidante (%AAO) de las muestras</i> .....	28

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Relevancia del consumo de las frutas y verduras

La evolución de los hábitos alimenticios ha ido variando a través del tiempo, pero siempre con el criterio básico de mantener la salud. En los últimos años existe un interés creciente, tanto por parte de los consumidores como de las industrias de alimentos y de los investigadores, en cómo los alimentos pueden ayudar a mantener la salud de nuestro organismo. Cada vez está más aceptado el papel que la dieta tiene en la prevención y tratamiento de numerosas enfermedades.

El riesgo de enfermedades crónicas, como pueden ser las cardiovasculares y algunos tipos de cáncer, se puede reducir mediante el consumo frecuente de frutas y verduras (OMS, 2013). Dado que son componentes esenciales de una dieta saludable, hay estudios que recomiendan como objetivo poblacional la ingesta de 400 g diarios de ambos grupos alimenticios, no solo para prevenir estos tipos de enfermedades sino también para mitigar varias carencias de micronutrientes (OMS/FAO, 2003).

Esta protección atribuida a las frutas y verduras se debe a su contenido en compuestos bioactivos, como los fitoquímicos y diversas vitaminas y minerales (Silva et al., 2015). Por ejemplo, las vitaminas C y E, tienen propiedades antioxidantes que protegen las células de los agentes cancerígenos, y la vitamina C particularmente puede incrementar la absorción de calcio mineral esencial para la salud ósea y dental (FAO, 2003). Además, estos alimentos son una fuente rica de fibra alimentaria y todo un cúmulo de sustancias no nutrientes beneficiosas, como fitoesteroles, flavonoides y otros antioxidantes (OMS, 2019).

En España, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) en 2020, el sector citrícola esperaba una cosecha de 6,93 millones de toneladas de frutos. Aproximadamente el 55% de estos cítricos los constituye la naranja, cuya cantidad procesada por la industria representa un gran porcentaje del total. Como fuente principal de nutrientes y sustancias no nutritivas que aporta esta fruta (Tabla 1), cabe destacar el ácido ascórbico o vitamina C, que junto a los folatos, contribuyen a la formación normal de las células sanguíneas. Además, proporciona carotenoides con actividad provitáminica A (principalmente  $\beta$ -criptoxantina) y luteína y zeaxantina. En su composición presenta también ácidos orgánicos, como el ácido málico y cítrico, y cantidades importantes de ácidos hidroxicinámicos, ferúlico, caféicos y p-cumárico, destacando su actividad antioxidante. Además, la naranja es rica en flavonoides siendo los más conocidos la hesperidina, neohesperidina y naringina (Fundación Española de la Nutrición, FEN, 2020).

**Tabla 1.** Composición nutricional y funcional de la naranja (Moreiras et al., 2013).

	Por 100 g de porción comestible	Por ración (225 g)		Por 100 g de porción comestible	Por ración (225 g)
<b>Energía (Kcal)</b>	42	69	<b>Potasio (mg)</b>	200	329
<b>Proteínas (g)</b>	0,8	1,3	<b>Fósforo (mg)</b>	28	
<b>Lípidos totales (g)</b>	Tr	Tr	<b>Selenio (µg)</b>	1	1,6
<b>Hidratos de carbono (g)</b>	8,6	14,1	<b>Tiamina (mg)</b>	0,1	0,16
<b>Fibra (g)</b>	2	3,3	<b>Riboflavina (mg)</b>	0,03	0,05
<b>Agua (g)</b>	88,6	146	<b>Vitamina B6 (mg)</b>	0,06	0,10
<b>Calcio (mg)</b>	36	59,1	<b>Folatos (µg)</b>	37	60,8
<b>Hierro (mg)</b>	0,3	0,5	<b>Vitamina B12 (µg)</b>	0	0
<b>Yodo (µg)</b>	2	3,3	<b>Vitamina C (mg)</b>	50	82,1
<b>Magnesio (mg)</b>	12	19,7	<b>Vitamina A: Eq. Retinol (µg)</b>	40	65,7
<b>Zinc (mg)</b>	0,18	0,3	<b>Vitamina D (µg)</b>	0	0
<b>Sodio (mg)</b>	3	4,9	<b>Vitamina E (mg)</b>	0,2	0,3

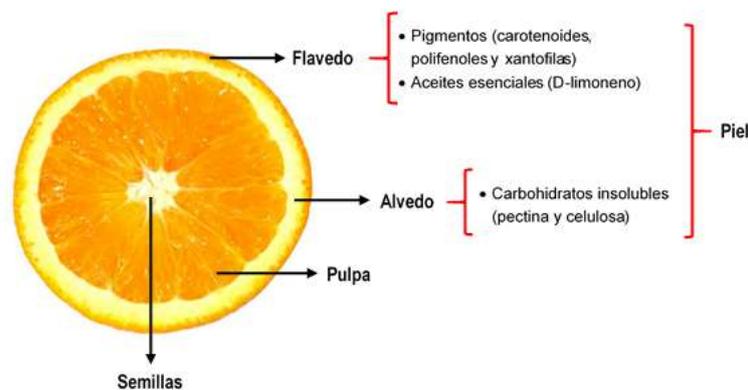
\*Tr: Trazas; 0: Virtualmente ausente en el alimento.

En lo referente al zumo de naranja, se ha observado que contiene menos fibra y tiene menores cantidades de vitaminas y minerales que la naranja entera, por lo que la [FEN \(2020\)](#) recomienda tomar la fruta fresca entera. Es por ello que resulta interesante tener como objeto de estudio el puré de naranja, no solo para valorar el posible aprovechamiento de esta materia, sino también para caracterizar su funcionalidad.

Por otra parte, en la actualidad la industria de alimentos está incrementando el uso de materias primas, tanto por la globalización de las mismas como por las nuevas tendencias de consumo. Esto ocasiona que las industrias agroalimentarias tengan cada día más problemas con el manejo y aprovechamiento de los subproductos, término que se tiende a utilizar cada día menos, usándose más el de los coproductos.

A partir de la obtención industrial de zumo de naranja se generan diversos coproductos de esta fruta. Los coproductos de cítricos, son aquellos obtenidos directamente de las industrias procesadoras de zumos y de las piezas retiradas del mercado. El coproducto por excelencia de la industria de los zumos cítricos está constituido fundamentalmente por tres fracciones: (i) pulpa que contiene residuos del zumo, (ii) las células que lo contienen y (iii) la piel o corteza (**Figura 1**). Por un lado, la pulpa extraída puede utilizarse para la preparación de concentrados, pulpas, néctares y jugos. En cambio, por otro lado está la piel, que respresenta aproximadamente del 45-60% del peso, y es considerada como material de desecho. Esto genera grandes cantidades de residuos ([Cordova et al., 2020](#)) a partir de los cuales se pueden obtener compuestos bioactivos que tienen efectos beneficiosos sobre la salud, tales como la fibra dietética, vitaminas (principalmente vitamina C), minerales, compuestos polifenólicos, carotenoides y aceites esenciales ([Chedea et al., 2010](#); [Ahmed et al., 2017](#)). Asimismo, se ha demostrado que estos subproductos cítricos son fuentes ricas de sustancias antioxidantes y se ha propuesto utilizarlos en la industria como antioxidantes naturales. Así, el flavedo contiene compuestos con importantes aplicaciones en la industria de alimentos como son los aceites esenciales y los

terpenos, de enorme aplicación en la industria química (Chafer et al., 2000), por su parte los carotenoides del flavedo pueden ser utilizados como pigmentos naturales para la mejora de la coloración de los zumos simples y concentrados, mientras que el albedo contiene celulosa, pectinas y diversos flavonoides (Alesón-Carbonell et al., 2002).



**Figura 1.** Partes de una naranja y compuestos bioactivos del subproducto (Arozarena, 2021).

Además, la piel de naranja tiene una configuración altamente porosa que puede ser utilizada para la incorporación de biopolímeros y bioactivos (Andamay y Acosta, 2020).

En este sentido, para contrarrestar la problemática del gran volumen producido por esta industria, cada día es mayor el número de empresas y grupos de investigación que tratan de obtener un rendimiento de estos coproductos y reducir la generación de residuos contaminantes (Picón, 2013). Hasta la fecha, las principales vías de aprovechamiento de los coproductos son sobre la alimentación o suplementación de bovinos (Triana et al., 2014). Recientemente se ha comprobado también su uso para el aislamiento de ingredientes funcionales y para la obtención de alimentos con un valor nutricional añadido (Gracia y Albisu, 2004). Es por ello que la posible integración de estos productos como ingredientes en nuevas formulaciones de alimentos o como nueva materia prima en el diseño de nuevos productos sería una solución a la actual problemática medioambiental (Picón, 2013), y la posibilidad de aprovechar y satisfacer las necesidades de los consumidores con todos los beneficios que dichos subproductos pueden aportar. También se debe tener en cuenta que los coproductos son materias primas muy heterogéneas, ya que están formadas por distintos tejidos, cada uno con muy distinta composición química, lo que hace muy difícil controlar también su procesamiento. No obstante, hay un gran interés en su posible aprovechamiento y uso potencial para contribuir a una alimentación saludable y sostenible.

## 1.2 Compuestos bioactivos de la naranja

Los compuestos bioactivos se definen como los componentes de los alimentos que influyen en las actividades celulares y fisiológicas obteniendo, tras su ingesta, un efecto beneficioso para la salud. Normalmente, estos compuestos están en cantidades muy pequeñas en los alimentos que consumimos como parte de nuestra dieta habitual y, en casi todos los casos, provienen de fuentes alimentarias vegetales. En general, sus efectos saludables se centran en la prevención de las

enfermedades no transmisibles (Martínez de Victoria, 2015). El reconocimiento de los componentes fisiológicamente activos en los frutos cítricos, como la naranja, y su contribución a la salud humana, se ha convertido en un área de investigación en crecimiento.

Las sustancias **antioxidantes** son un grupo específico de compuestos con propiedades comunes, que se caracterizan por ser capaces de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación y captación de electrones en nuestra sangre. La acción oxidante de los radicales produce alteraciones fisiológicas importantes que son desencadenantes de diversas enfermedades (Zamora, 2007; Avello y Suwalsky, 2006). Estos son moléculas muy reactivas e inestables de alta energía con electrones desapareados que tienden a reaccionar con otros compuestos buscando un electrón para emparejarse con él (Hernández, 2004). En determinadas circunstancias, la producción de estas moléculas puede aumentar de forma descontrolada, situación conocida como estrés oxidativo, existiendo evidencias que sugieren una relación entre el estrés oxidativo y el origen de numerosas enfermedades, como la artritis reumatoidea (Desmarchelier y Ciccía, 1998). Conociendo los efectos negativos provocados por los radicales libres, podemos entender mejor la función y efecto que tienen los antioxidantes en la salud. Por ejemplo, la vitamina E (tocoferol) actúa como antioxidante natural reaccionando con los radicales libres que se generan en la fase lipídica, protegiendo a los lípidos de las membranas (Vega et al., 2005). Además, se ha relacionado una menor incidencia de enfermedades degenerativas y crónicas en aquellas personas que han iniciado un incremento en el consumo de frutas y vegetales, debido al alto contenido de varios antioxidantes presentes en estos alimentos (Keith et al., 2001; Evans, 2000).

La **vitamina C o ácido ascórbico** es una sustancia hidrosoluble con una gran capacidad antioxidante, que participa en el desarrollo de los tejidos conectivos, el metabolismo de lípidos y vitaminas, las síntesis de hormonas y neurotransmisores, la función inmune y en la cicatrización de heridas (Grosso et al., 2013). La función principal más conocida de esta vitamina es la prevención del escorbuto (Bastías y Cepero, 2016), junto a la asociación con la prevención de la gripe y el constipado (Stern, 2005). En la actualidad, su efecto beneficioso se ha vinculado con tratamientos para la prevención o el retraso del cáncer, más con enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, debido a que estas patologías presentan un componente oxidativo en su origen de propagación (Mardones, 2020). Además de contrarestrar la inflamación y el daño oxidativo del sistema nervioso (Grosso et al., 2013), contribuye a la erradicación de enfermedades por deficiencia de hierro (Jiménez et al., 2019). El ácido ascórbico al no ser producido por los humanos se ha de incorporar a través de los alimentos, siendo su biodisponibilidad elevada cuando es ingerida en agua o leche y disminuyendo por la degradación que sufre durante los procesos de digestión (Kondo et al., 2012; Cilla et al., 2012).

Los **carotenoides** son pigmentos liposolubles de origen vegetal cuya principal actividad en las plantas es la fotoprotección del sistema fotosintético. En el organismo humano destaca, entre otras, la actividad provitamínica A (Beltrán et al., 2012), siendo el  $\beta$ -caroteno, de entre los que poseen dicha capacidad, el que por su estructura tiene un mejor rendimiento en retinol o vitamina A (Rao y Rao, 2007). Estos pigmentos proporcionan a frutas y verduras colores amarillos, anaranjados y rojizos debido a la presencia de un cromóforo en su molécula. La gran importancia nutricional de estos pigmentos ha radicado en el hecho de que algunos poseen la actividad provitamínica A, pero se ha puesto de manifiesto que la relevancia de estos va más allá, demostrando un papel importante en la prevención de diversas enfermedades degenerativas (Meléndez-Martínez et al., 2004). Se ha observado que los carotenoides actúan como potenciadores positivos de la respuesta inmune (Olson, 1999) y han suscitado interés debido a que hay estudios que demuestran su actividad antioxidante, y con ello la capacidad de disminuir los efectos adversos de especies reactivas como las del oxígeno y el nitrógeno, y la fotoprotección de tejidos, como el epitelial y ocular (Chew y Park, 2004; Sthal y Sies,

2007). Así mismo, un gran número de estudios epidemiológicos observacionales, han demostrado consistentemente que las personas que comen más frutas y verduras ricas en carotenoides y las personas que tienen niveles séricos más altos de  $\beta$ -caroteno, tienen menos riesgo de padecer cáncer, especialmente de pulmón (Vitale et al., 2010).

Las sustancias que reciben el nombre de **compuestos fenólicos**, polifenoles o fenilpropanoides son productos secundarios sintetizados por las plantas que contienen un grupo fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Isaza, 2007). Químicamente, estos compuestos son un grupo muy diverso que comprende fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, cumarinas, taninos (condensados e hidrolizables), ligninas y lignanos (Quiñones, 2016). En gran parte los polifenoles son responsables de las características sensoriales de los productos hortofrutícolas, como el color, la astringencia, el sabor y el aroma (Gómez-Romero et al., 2010). Este grupo de metabolitos son muy interesantes gracias a su marcada acción antioxidante y como moléculas beneficiosas hacia la salud humana (Martín, 2018). Como consecuencia de su acción antioxidante, se ha demostrado que los compuestos fenólicos poseen propiedades antimutagénicas, anticancerígenas, antiinflamatorias y anticoagulantes (Souyoul et al., 2018). Recientemente los investigadores recomiendan el consumo de una dieta rica en alimentos con altos contenidos de polifenoles, ya que, pueden tener efectos benéficos sobre patologías cardiovasculares, virales e incluso antineoplásicas (Tomás-Barberán, 2003).

### 1.3 Liofilización

La **liofilización** es un tipo de secado de amplio interés para el procesado de productos biológicos, farmacéuticos y alimenticios, especialmente termosensibles, reduciendo la humedad de los alimentos sin someterlos a altas temperaturas y evitando en gran medida el daño de los compuestos termolábiles (Grau, 2015). Además, por la alta reducción en la actividad del agua, permite obtener productos estables microbiológicamente.

Consta de las siguientes etapas: congelación, secado primario y secundario. La congelación, a la que se somete el producto, debe ser rápida a fin de obtener pequeños cristales de hielo, los cuales son sublimados a bajas presiones con el secado primario (Barbosa-Cánovas y Vega, 2000), para posteriormente pasar al secado secundario, aumentando la temperatura para evaporar el agua fuertemente ligada (Boñón et al., 2020). Es una técnica que permite obtener productos en polvo de fácil manejo y de alta calidad sensorial, nutritiva y funcional (Egas, 2019). Autores como Boñón et al., (2020) han demostrado que se obtienen mayores porcentajes de retención tanto en capacidad antioxidante como de compuestos fenólicos aplicando el tratamiento de liofilización respecto a otras técnicas de secado, debido tanto a la baja temperatura de procesado como a la ausencia de oxígeno durante el mismo, lo que minimiza las reacciones de degradación. Sin embargo, la principal desventaja de esta técnica son los altos costos que conlleva el uso de bajas presiones y los largos períodos de tratamiento (Barbosa-Cánovas y Vega, 2000). En este sentido, para optimizar las condiciones del proceso de liofilización una alternativa interesante es aumentar la temperatura del proceso sin que la calidad del producto obtenido se vea comprometida, lo cual tiene gran importancia económica, sino también para obtener un producto con menos humedad. Este calor aportado se consigue fijando una temperatura a las bandejas del liofilizador. Egas-Astudillo et al., (2020) comprobó que aumentar la temperatura de las bandejas del liofilizador a 40°C para obtener un producto de pomelo tipo snack, acortó considerablemente el tiempo del proceso (en un 57,5%), no afectando al color ni al contenido de vitamina C del producto.

Con el objetivo de promover el consumo de fruta entre la población hay un continuo interés en el desarrollo de nuevos productos de fruta seguros y saludables. En este sentido, una opción podría ser elaborar un snack a partir de la liofilización del puré de naranja y de su coproducto.

Además este producto podría triturarse y el polvo obtenido podría incorporarse en la formulación de zumos, infusiones, postres, helados, entre otros, con las ventajas de estabilidad y de logística que supone el almacenamiento. Pero este proceso es complicado al aplicarlo en alimentos con un alto contenido en azúcares y ácidos como son las frutas (Egas, 2019), que confieren al producto deshidratado una estructura pegajosa y con una elevada higroscopicidad. Para paliar el problema y mejorar el rendimiento del proceso y la calidad del producto obtenido, se hace necesaria la adición de biopolímeros de alto peso molecular con un efecto encapsulante, antihumectante y antiapelmazante, como la goma arábica (Krishnan et al., 2005; López et al., 2006).

La **goma arábica** procede del árbol de la Acacia (*Acacia Senegal*) y es un heteropolisacárido fibroso que el árbol produce por exudación natural para cerrar sus heridas. Resulta muy eficaz para la encapsulación de compuestos ya que es muy soluble en agua y presenta una baja viscosidad en disolución (Egas et al., 2014; Said et al., 2019). Además, tiene una gran capacidad de retención de sustancias volátiles y protege de la oxidación (Gabas et al., 2007).

Por otra parte, existe un interés por parte de la industria alimentaria en aumentar el contenido de fibras en los alimentos, ya que numerosos estudios han demostrado los efectos beneficiosos del consumo de fibra en la protección contra enfermedades relacionadas con el corazón, regulación de la absorción de glucosa y secreción de insulina y prevención de enfermedades intestinales (Mckee y Latner, 2000).

La **fibra de bambú** procede de la subfamilia Bambusoideae y se extrae de la planta conocida como bambú. Sus constituyentes principales son la celulosa, hemicelulosa y lignina, junto a otros compuestos no estructurales como son la pectina, sales orgánicas, ceras y sales nitrogenadas (Quintero y González, 2006; Majeed et al., 2013). Esta fibra se está utilizando para mejorar la estabilidad en los alimentos además de conferirles algunas de las características beneficiosas propias de las fibras (Colin-Henrior et al., 2009), contribuyendo a la prevención de enfermedades crónicas (Ramírez y Pacheco, 2009).

Asimismo, los biopolímeros pueden actuar como agentes de encapsulación, ayudando a prevenir la degradación de algunos compuestos bioactivos durante el procesado y almacenamiento (Rascón et al., 2011). No obstante, la funcionalidad de los diferentes biopolímeros puede afectar, en mayor o menor medida, a que dichos compuestos bioactivos sean liberados durante la digestión para ser absorbidos por el organismo.

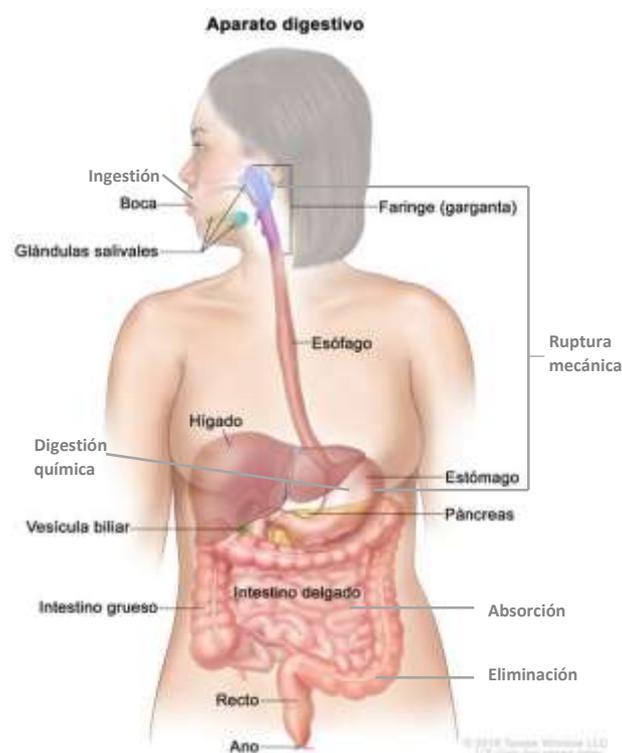
## 1.4 Bioaccesibilidad y digestión

Durante la digestión, los alimentos están sujetos a una serie de procesos que condicionan su llegada a la circulación sistemática, ya que un compuesto bioactivo solo puede ejercer beneficios para la salud si permanece disponible para su absorción después de que hayan tenido lugar todas las fases involucradas en el proceso de digestión gastrointestinal (Rocha, 2013).

El proceso digestivo consiste en una serie de etapas enzimáticas, descritas a continuación, que producen la hidrólisis de los componentes mayoritarios del alimento (grasas, hidratos de carbono y proteínas) con la consiguiente liberación de numerosos nutrientes (Ng et al., 2009). La **bioaccesibilidad** se ha definido como la fracción de un compuesto que se libera de su matriz alimentaria dentro del

tracto gastrointestinal y, por lo tanto, se vuelve disponible para la absorción intestinal (Etcheverry et al., 2012). La bioaccesibilidad puede ser medida mediante la simulación *in vitro* de las etapas de digestión en el tracto gastrointestinal, mediante una serie de tratamientos utilizando enzimas características de cada etapa del proceso de digestión, adecuando las condiciones de temperatura y pH (Quesada, 2018).

La masticación es la primera fuerza mecánica con la que comienza la **etapa oral**, siendo esta la forma que contribuye en mayor grado a desestructurar la matriz alimentaria. Este proceso también sirve para mezclar el alimento con la saliva conformando el bolo alimenticio. El fluido salival contiene  $\alpha$ -amilasa, que es la enzima encargada de iniciar la hidrólisis de los carbohidratos, durante el breve tiempo de residencia que permanece en la boca. Tras la deglución, el bajo pH del estómago inactivará esta enzima.



**Figura 2.** Estructuras y procesos del sistema digestivo (Winslow, 2019).

Posteriormente, la **etapa gástrica** se inicia con la llegada del bolo alimenticio al estómago. Se secreta el fluido gástrico, que contiene el ácido clorhídrico como principal agente que provoca la bajada del pH. Asimismo, el jugo gástrico incluye la pepsina, la principal enzima que se encarga de la proteólisis parcial de las proteínas. Por su parte, las paredes del estómago contribuyen a la homogeneización del contenido gástrico, resultando en el quimo. A medida que avanza esta etapa, el tamaño de partícula del quimo disminuye de forma progresiva. Una vez el quimo ha alcanzado un tamaño de partícula lo suficientemente pequeño, el píloro se contrae y permite el paso a través de él. Es por eso por lo que el vaciado gástrico es un proceso progresivo que puede durar hasta 2 horas en función del alimento ingerido.

Por último, la **etapa intestinal** es la más compleja. A medida que el contenido gástrico pasa al duodeno se va alcalinizando, gracias a la secreción pancreática, conformando el quilo. El páncreas secreta su jugo, que contiene bicarbonato siendo el principal agente responsable del aumento del pH de forma abrupta. Este jugo contiene la pancreatina, una mezcla de enzimas hidrolíticas que incluye proteasas (tripsina y quimiotripsina), amilasas ( $\alpha$ -amilasa) y lipasa (junto con co-lipasa). Las sales biliares, por otro lado, son secretadas por la vesícula biliar, y son el principal agente emulgente en esta etapa. Esta acción surfactante es también necesaria a la hora de la absorción de los productos de la lipólisis, ya que se encarga de englobarlos formando una micela y transportarlos a través del medio acuoso, como es el fluido intestinal, hasta presentarlos a las células de la pared intestinal (enterocitos) que los absorben. Además, estas células se encargan de absorber los monosacáridos y aminoácidos, los productos de la glicólisis y la proteólisis a través de mecanismos más sencillos. A lo largo de la etapa intestinal, los movimientos peristálticos hacen avanzar el quilo por el duodeno, íleon y yeyuno, hasta llegar al colon. En este último tramo, se da la metabolización de los productos de la digestión no absorbidos, como fibras o restos de péptidos, por parte de los microorganismos que conforman la microbiota.

## 2. OBJETIVOS

El presente estudio se enmarca dentro de un Proyecto cuyo objetivo es investigar la valorización del coproducto de la industria del procesado de la naranja para ofrecerlo como un ingrediente alimentario natural, versátil, de alta calidad y estable. En este sentido, este trabajo tiene como objetivo general estudiar la influencia de la liofilización en la bioaccesibilidad de los principales compuestos bioactivos (fenoles, carotenoides y vitamina C) de productos de naranja, concretamente del puré de naranja y de su coproducto. En este último, también se estudiará el efecto de la adición de biopolímeros (goma arábica y fibra de bambú) como coadyuvantes tecnológicos en la estabilidad de los compuestos bioactivos durante el procesado y la digestión.

Para lograr este objetivo general, se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- Caracterización de los compuestos bioactivos mayoritarios (vitamina C, carotenoides y fenoles totales) y de la actividad antioxidante del puré de naranja y su coproducto.
- Estudio del efecto de la temperatura de liofilización (30 y 50°C) en los compuestos bioactivos y actividad antioxidante del puré de naranja y su coproducto.
- Estudio de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos tras el proceso de digestión *in vitro*, del puré de naranja y del coproducto, antes y después de liofilizar.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Materias primas

En este estudio se utilizaron naranjas dulces (*Citrus x sinensis* var. 'Navel orange'). Estas fueron compradas en un supermercado de la ciudad de Valencia. En la compra se seleccionaron piezas lo más homogéneas posibles, teniendo en cuenta aspectos visuales como tamaño, color, firmeza y ausencia de daños en la piel. Los biopolímeros utilizados en el proceso como antiapelmazantes, antihumectantes y encapsulantes fueron fibra de bambú (FB) (VITACEL©, Rosenberg, Alemania) y goma arábica (GA) (Scharlab, Sentmenat, España).

### 3.2 Metodología

#### 3.2.1 Preparación de las muestras

Primero, se lavaron las naranjas individualmente con agua y un estropajo, retirando así cualquier impureza que se pudiese encontrar en la superficie. Las naranjas se pelaron con un equipo específico para ello (*Orange peel INOX, Pelamatic, 220V 50W*, España) retirando, mediante dos pasadas de la cuchilla, toda la corteza. Tras realizar esta operación se obtuvo, por una parte, las naranjas completamente peladas y, por otra parte, el coproducto, formado por el albedo y el flavedo.

##### 3.2.1.1 Obtención de las muestras a partir del puré de naranja

El puré se obtuvo triturando las naranjas completamente peladas con un robot de cocina (Thermomix TM21, Vorwerk, España). Se introdujeron tandas de 1 kg cortadas en 6 trozos para facilitar el proceso, durante 40 segundos a velocidad 4 y, de nuevo, 40 segundos a velocidad 9. En cada tanda de trituración, se añadió GA y FB en proporciones de 5 y 1 g /100 g de puré de naranja, respectivamente. Las cantidades utilizadas se seleccionaron tomando en cuenta los resultados optimizados de estudios previos (Agudelo et al., 2017). Una vez se obtuvo el puré de naranja formulado con biopolímeros (PBp), se mezclaron todas las tandas en la Thermomix durante 10 minutos a velocidad 3, para conseguir así un producto más homogéneo.

##### 3.2.1.2 Obtención de las muestras a partir del coproducto de naranja

Por otra parte, el coproducto se dividió en dos partes iguales para hacer distintas formulaciones: el coproducto (Cop) y el coproducto con biopolímeros (CopBp).

A cada parte se le añadieron 150 mL de agua por cada 500 g de coproducto. Para el Cop no fue necesario añadir nada más. En cambio, para la formulación del CopBp, se añadieron primero los biopolímeros al agua, en la misma proporción que en el puré, 5 g de GA/100 g de puré de naranja y 1 g de FB/100 g de puré de naranja. Seguidamente, ambos productos por separado se homogeneizaron en una picadora emulsionadora (Eurofred, España) (**Figura1**).



**Figura 3.** Coproducto con biopolímeros.

De los tres productos de estudio (PBp, Cop y CopBp), se guardaron 100 g en tarros de cristal en refrigeración a 4°C (Liebherr, ProfiLine, Alemania) para realizar los correspondientes análisis que se describen a continuación.

Por otra parte, para posteriormente realizar el proceso de digestión *in vitro* (explicado en el punto 3.2.2) se congelaron a -45°C (Liebherr, LGT 2325, Alemania) en tarros de cristal 400 g.

Por último, de la cantidad restante de puré y coproductos, se aprovechó para realizar el análisis de humedad (detallado en el punto 3.2.3.1).

Para reconocer las muestras de forma más sencilla se utilizó la siguiente nomenclatura a lo largo de este trabajo (**Tabla 2**):

**Tabla 2.** Nomenclatura utilizada para las muestras.

	PRODUCTOS		
	Puré con biopolímeros (PBp)	Coproducto (Cop)	Coproducto con biopolímeros (CopBp)
<b>Control (fresco, F)</b>	PBp-F	Cop-F	CopBp-F
<b>Liofilización a 30°C/26h (L30)</b>	PBp-L30	Cop-L30	CopBp-L30
<b>Liofilización a 50°C/19h (L50)</b>	PBp-L50	Cop-L50	CopBp-L50

### 3.2.1.3 Obtención de los productos liofilizados

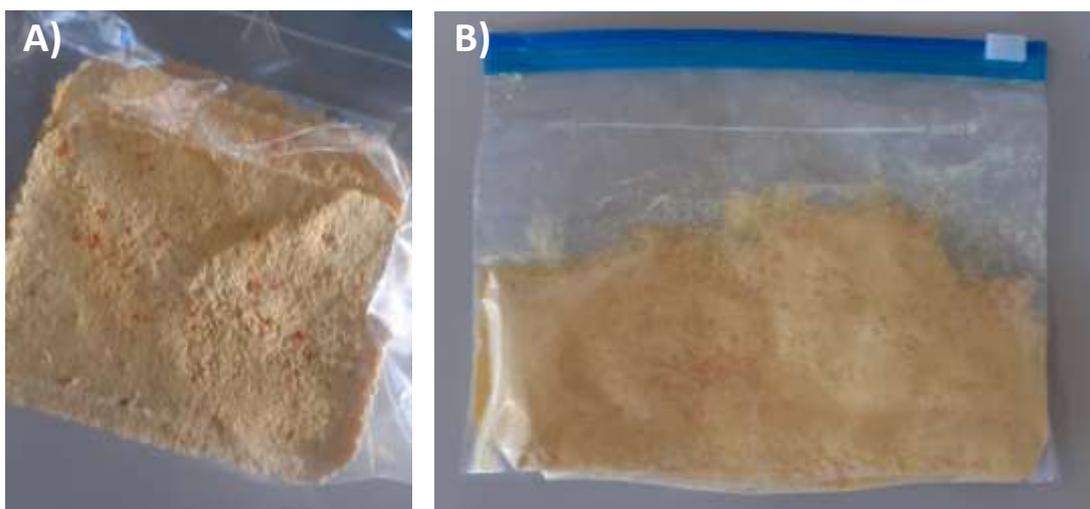
Para la obtención de los productos liofilizados, las distintas muestras se congelaron durante 6 días a -45°C (Liebherr, LGT 2325, Alemania) en bandejas de aluminio con 1 cm de espesor. Se prepararon un total de 18 bandejas (6 de cada producto). La liofilización (Liofilizados TelstarLioalfa-6, España) se

realizó con las siguientes condiciones de acuerdo a estudios previos (Egas-Astudillo et al., 2020; Silva-Espinoza et al., 2020): presión 0,084 mBar, -48°C de temperatura en el condensador y a dos temperaturas de bandeja: 30°C y 50°C. La duración del proceso fue de 26 y 19 horas respectivamente (Figura 2).



**Figura 4.** Liofilizador *TelstarLioalfa-6*, España, con las muestras en bandejas, listas para liofilizar.

Tras la liofilización las diferentes muestras obtenidas se trituraron (Thermomix TM21, Vorwerk, España) durante 20 segundos a velocidad 5 (Figura 3). Las muestras en polvo se guardaron en bolsas herméticas, dentro de tarros de cristal en refrigeración a 4°C (Liebherr, ProfiLine, Alemania).



**Figura 5.** Muestras de coproductos liofilizados antes (A) y después (B) de ser trituradas, respectivamente.

Todas las muestras así obtenidas fueron analizadas antes y después de liofilizar en cuanto a sus compuestos bioactivos y actividad antioxidante, tal y como se describe a continuación. Algunas de ellas se sometieron a un proceso de digestión *in vitro* y se analizaron después del mismo.

### 3.2.2 Digestión *in vitro*

La digestión *in vitro* se realizó mediante la metodología propuesta por [Miller et al., \(1981\)](#), con algunas adaptaciones. El procedimiento se llevó a cabo PBp-F y Cop-F, PBp-L50 y Cop-L50, y PBp-L30. Se hicieron 3 repeticiones por muestra en cada una de las etapas del proceso: digestión oral, gástrica e intestinal. La digestión se realizó en una cámara de temperatura controlada (Nüve, test cabinet TK 120, Turquía) para asegurar que las muestras estuviesen a 37°C (temperatura corporal aproximada) y en agitación (agitador orbital Ovan, España) a 120 oscilaciones por minuto.

#### 3.2.2.1 Fase oral

En esta fase es importante simular los fluidos que se encuentran en la boca, la saliva, que es la principal responsable de la formación del bolo alimenticio gracias a la enzima  $\alpha$ -amilasa ([Hernández y Aranzazu, 2012](#)). Tanto a las muestras frescas como liofilizadas se les adicionó una disolución de 130 mg de  $\alpha$ -amilasa/100 mL de CaCl<sub>2</sub>, 1mM a pH 7, en proporción 250  $\mu$ L/1 g de sólidos totales (Sigma-Aldrich, Alemania) ([Huang et al., 2014](#)). Las muestras fueron incubadas (Nüve, test cabinet TK 120, Turquía) a 37°C durante 10 minutos en constante oscilación, tal y como se ha descrito.

#### 3.2.2.2 Fase gástrica

Concluida la fase oral, el pH de la muestra se ajustó a 2 con HCl 2M (Sigma Aldrich, Alemania). Seguidamente se adicionaron 0,1 g de pepsina de origen porcino (Sigma Aldrich, Alemania), enzima que inicia la digestión de las proteínas ([Sanvodal et al., 2008](#)). La mezcla se mantuvo durante 2 horas a 37°C y en constante oscilación (**Figura 4**).



**Figura 6.** Muestras durante la fase gástrica dentro de la cámara de temperatura controlada.

### 3.2.2.3 Fase intestinal

En esta última etapa, se traspasaron 20 mL del digesto gástrico a una probeta, en la cual se introdujo una membrana de diálisis (Sigma-Aldrich, Alemania), con un tamaño de poro de 14000 daltons, rellena con 25 mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,5N. Las muestras se dializaron dentro de la cámara a 37°C en continua oscilación (**Figura 5**). Una vez que la muestra alcanzó pH 5 (tras 20 minutos aproximadamente) se adicionaron 5 mL de una mezcla de pancreatina (4 g/L, Sigma-Aldrich, Alemania) y extracto de bilis (25 g/L, Sigma-Aldrich, Alemania) en  $\text{NaHCO}_3$  0,5N y agua destilada, y se continuó la incubación durante 2 horas, o hasta que la muestra alcanzase pH 7.



**Figura 7.** Muestras durante la fase intestinal dentro de la cámara de temperatura controlada.

Acabada la digestión intestinal, se guardó el contenido del interior de la membrana (**Figura 6**) en vasos estériles y se congeló (Liebherr, LGT 2325, Alemania) a -45°C para ser analizados. La solución obtenida del interior de la membrana representa la parte absorbida por el organismo que pasa a la sangre.



**Figura 8.** Membrana de diálisis tras finalizar la fase de digestión intestinal.

### 3.2.3 Determinaciones analíticas

Tanto a la materia prima inicial, que llamaremos muestras control o frescas, como a los liofilizados y los digestos obtenidos en la etapa intestinal, se les analizaron el ácido ascórbico, la vitamina C, los carotenoides totales, los fenoles totales y la actividad antioxidante. En todos los métodos, las muestras se analizaron por triplicado. Se calculó la media y la desviación estándar. Con fines comparativos, todos los resultados se expresaron referidos a 100 g de muestra fresca (mf).

#### 3.2.3.1 Humedad

La humedad ( $x_w$ ) de las muestras frescas se analizó según el método gravimétrico de secado en estufa para alimentos en azúcares 934.06 (AOAC, 2000).

En el caso de las muestras liofilizadas, el análisis de  $x_w$  se realizó mediante el método de valoración volumétrica de Karl Fischer (Mettler Toledo, España). Los resultados, en ambos procedimientos, fueron expresados en g de agua/100 g de muestra.

#### 3.2.3.2 Vitamina C

Para la extracción del ácido ascórbico (AA) y la vitamina C (VC) se empleó como disolvente una disolución de ácido oxálico en agua. Se mezcló 1 g de la muestra fresca o 0,5 g de producto liofilizado con 9 mL de disolución de ácido oxálico al 0,1% en agua (p/v), se dejó reposar en oscuridad y temperatura ambiente durante 3 minutos. Después se filtró en viales de HPLC con filtros de nylon de 0,45  $\mu$ m. Finalmente se analizó el contenido en AA por HPLC según Xu *et al.* (2008). Para la determinación de VC se tomaron 1 g de muestra fresca o 0,5 g de producto liofilizado, y se sometió a la reducción del ácido dehidroascórbico (DHAA) a AA empleando el reactivo DTT (DL-ditiotreitol) (Sigma-Aldrich, Alemania) según Sánchez-Mata *et al.* (2000) y Sánchez-Moreno *et al.* (2003). A continuación, la VC se determinó también por HPLC según Xu *et al.* (2008). La diferencia entre los valores obtenidos de VC y AA se contabilizaron como DHAA. El HPLC empleado (Jasco, Italia) consta de una bomba ternaria (Jasco PU-1580 HPLC pump), un generador de gradiente (LG-1580-02 Ternary Gradiente Unit) y un detector UV-visible (MD-1510) con un intervalo de medida de longitud de onda entre 190 y 650 nm. El equipo contiene un desgasificador incorporado y un inyector automático. Se utilizó una columna Zorbax SSBC18 de 5  $\mu$ m, 4,6 x 25 mm (España). La VC fue identificada por su tiempo de retención y cuantificada por integración de las áreas de los picos obtenidos de los cromatogramas usando el ácido ascórbico como patrón (Panreac, España). Los resultados se expresaron como mg de VC/100 g mf.

#### 3.2.3.3 Carotenoides totales

Para la determinación de carotenoides totales (CT) se comenzó realizando una extracción (Barba *et al.*, 2006) con el disolvente hexanoa:acetona:etanol (50:25:25, v/v), (VRM, España). Se tomaron 1 g de muestra fresca o 0,15 g de muestra liofilizada junto con 9 mL del disolvente de extracción y se dejó en agitación magnética durante 30 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó (GYROZEN 123GR, Korea) 10 minutos a 10000 rpm a una temperatura de 4°C. Los carotenoides totales se cuantificaron por espectrofotometría (Thermo Electron Corporation, USA),

siguiendo la metodología [AOAC \(1996\)](#). Se midió la absorbancia a 446 nm que corresponde a  $\beta$ -caroteno. Los resultados se expresaron en mg de  $\beta$ -caroteno/100 g de mf.

#### 3.2.3.4 Fenoles totales

Los compuestos fenólicos (FT) se extrajeron en las mismas condiciones y proporciones que para los carotenoides totales (punto 3.2.3.3) pero empleando metanol:agua (70:30, v/v) como disolvente.

Una vez se obtuvo el extracto, se siguió el ensayo Folin-Ciocalteu según [Benzie y Strain \(1999\)](#); y [Selvendran y Ryden \(1990\)](#) para la cuantificación de fenoles. Se midió la absorbancia a 765 nm (Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/100 g mf.

#### 3.2.3.5 Actividad antioxidante

A partir de la extracción realizada para fenoles (en el apartado 3.2.3.4), se determinó la actividad antioxidante de los productos mediante dos métodos, FRAP y DPPH.

**i) Método FRAP.**

Se siguió la metodología propuesta por [Benzie y Strain \(1996\)](#); [Pulido et al. \(2000\)](#) y [Thaipong et al. \(2006\)](#). El método se basa en la reacción que mide la reducción del complejo férrico-2,4,6,tripiridil-s-triazina (TPTZ), en la cual el hierro férrico ( $\text{Fe}^{3+}$  - TPTZ) se reduce a ión ferroso a bajo pH, causando la formación de un completo ferrosotripiridiltriiazina coloreado ( $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ), que absorbe a una longitud de onda de 593 nm ([Valenzuela, 2015](#)) (Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se expresaron en mmol de Trolox/100 g mf, usando una curva de calibración de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) de 0-250 mg TE/1000 g.

**ii) Método DPPH.**

En la realización del método DPPH se siguió la metodología propuesta por [Brand-Williams et al. \(1995\)](#); [Puupponen-Pimiä et al. \(2003\)](#) y [Sanchez-Moreno et al. \(2003\)](#). Este procedimiento se basa en la reducción del radical DPPH• a DPPH-H.

Con el espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation, USA) se midió la absorbancia a 515 nm, a tiempo 0 y tras 15 minutos. Para expresar los resultados como mmol de Trolox/100 g mf, se necesitó calcular el porcentaje de DPPH con la **Ecuación 1**, y se empleó una curva de calibración de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) de 0-250 mg TE/1000 g.

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

Siendo:

A control: Absorbancia a tiempo 0.

A muestra: Absorbancia de las muestras después de 15 minutos.

### 3.2.4 Cálculo de la bioaccesibilidad

Para el cálculo de la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos en las muestras, se empleó la **Ecuación 2** (Silva-Espinoza, 2021).

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \frac{\text{Concentración de bioactivos del digesto intestinal interno}}{\text{Concentración de bioactivos de la muestra inicial}} \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

### 3.2.5 Análisis estadístico

Para conocer la existencia de diferencias significativas entre las diferentes muestras, se realizaron análisis de varianza simple (ANOVA) y multifactorial (MANOVA), usando el test HSD de Tukey para establecer diferencias significativas entre muestras con un nivel de confianza del 95% ( $p < 0,05$ ). Además, se realizaron correlaciones de Pearson entre la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos con un nivel de confianza del 95%. Para ello se utilizó el programa Statgraphics Centurion XVIII bajo licencia de la Universitat Politècnica de València.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización química de los productos. Efectos de la liofilización y de la adición de biopolímeros en los compuestos bioactivos y en la actividad antioxidante

En la **Tabla 3** se presenta el contenido de  $x_w$ , en g de agua/100g de muestra, de todas las muestras estudiadas, antes y después de ser liofilizadas a las dos temperaturas de trabajo 30 y 50°C.

La muestra PBp-F presentó unos valores de  $x_w$  de 82,71 g de agua/100 g de producto, similares a los encontrados por otros autores para la misma fruta (Moreiras et al., 2013). Por otra parte, los coproductos frescos, con y sin biopolímeros, presentaron valores de  $x_w$  significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que el puré. Los valores Cop-F fueron inferiores a los encontrados en bibliografía para la piel de la naranja, con un contenido de 72,5 g de agua/100 g de piel (USDA, 2019).

El secado por liofilización permitió disminuir la humedad de las muestras hasta valores de 1-2,8 g de agua/100 g, dependiendo de la temperatura de bandeja y del tiempo del proceso. Estos valores son del orden de los sugeridos por otros autores para alimentos liofilizados de calidad (Barbosa-Cánovas et Vega, 2000). Se observó también que el proceso de liofilización a 50°C/19h proporcionó productos con un porcentaje de humedad significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que las procesadas a 30°C/26h, no observándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las muestras de PBp y los coproductos liofilizados a la misma temperatura.

**Tabla 3.** Valores medios  $\pm$  desviación estándar de la humedad de las muestras (g de agua/100g).

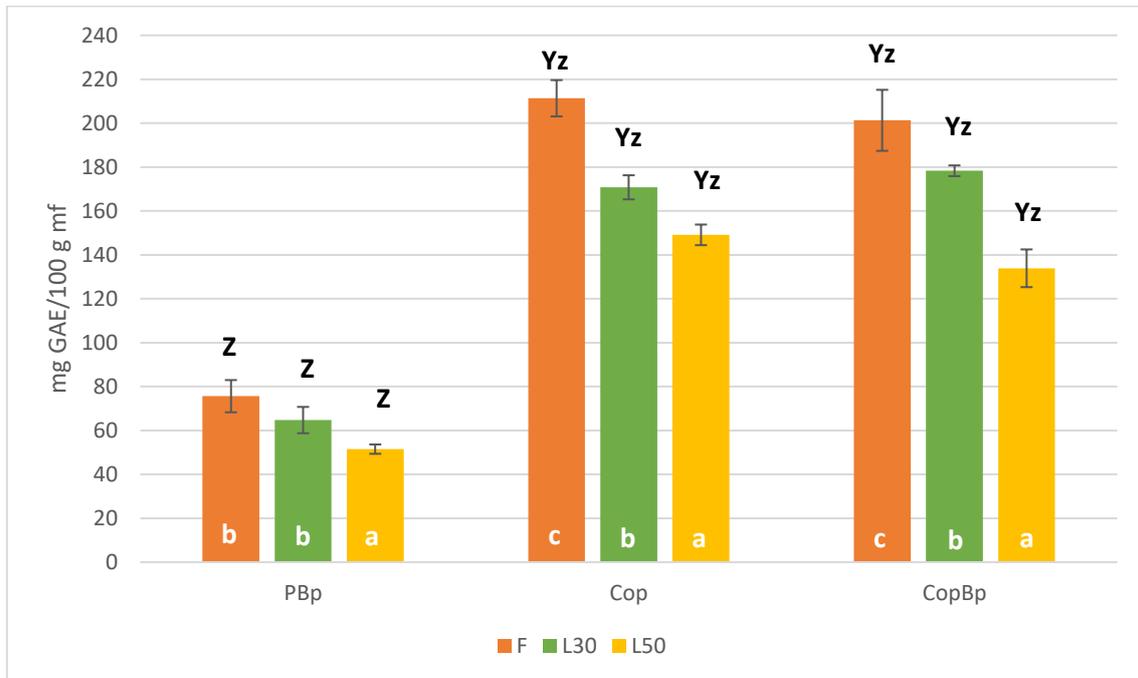
Muestra	Fresco (F)	Liofilizado 30°C/26h (L30)	Liofilizado 50°C/19h (L50)
PBp	82,71 $\pm$ 0,05 <sup>az</sup>	2,8 $\pm$ 0,1 <sup>av</sup>	1,4 $\pm$ 0,1 <sup>ax</sup>
Cop	53,07 $\pm$ 0,08 <sup>bz</sup>	2,4 $\pm$ 0,2 <sup>av</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>ax</sup>
CopBp	49,64 $\pm$ 0,08 <sup>bz</sup>	2,7 $\pm$ 0,0 <sup>av</sup>	1,5 $\pm$ 0,0 <sup>ax</sup>

Por columnas para cada tratamiento (control o fresco, liofilizado a 30°C/26h y a 50°C/19h) diferentes letras en superíndices (a-b) indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ). Por filas, para cada muestra diferentes letras en superíndices (x-z) indican diferencias significativas debidas a las condiciones del proceso de liofilización ( $p < 0,05$ ).

En la **Figura 9** se presentan los resultados obtenidos del análisis de FT de los distintos productos. El contenido en fenoles totales de PBp-F fue de 76 mg ácido gálico/100 g mf, del orden de lo obtenido en otros estudios de naranja (Klimczak et al., 2007). En general, los coproductos, Cop y CopBp, presentaron un mayor contenido en FT ( $p < 0,05$ ) que PBp. Estudios de Escobedo-Avellaneda et al., (2014) también han mostrado que el mayor contenido en FT de la naranja se encuentra en la fracción del albedo. Los mismos autores afirman que en el zumo abundan los fenoles ligados, mientras que en la pulpa, albedo y flavedo destacan los fenoles libres.

Para evaluar el efecto del proceso de liofilización a las dos temperaturas estudiadas sobre el contenido en FT, se calculó el % de pérdida de estos compuestos bioactivos en los productos liofilizados respecto a los respectivos productos control o frescos, sin liofilizar. Así se observó que el proceso de liofilización, en general, a 30°C/26h ocasionó menos pérdidas en los compuestos fenólicos que a 50°C/19h. En concreto, en las muestras PBp se produjo una disminución del 31% de PBp-L50 ( $p < 0,05$ ) respecto a PBp-F, sin observarse diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre PBp-F y su liofilizado a 30°C/26h. Sobre

los coproductos podemos observar que en ambos casos las diferencias entre las condiciones del tratamiento de liofilización causaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en FT. Al liofilizar a  $30^{\circ}\text{C}$  se cuantificaron pérdidas del orden de 19% para Cop-L30 y del 11% para CopBp-L30. En cuanto al procesado a  $50^{\circ}\text{C}$ , las pérdidas cuantificadas fueron del orden del 29% y 33%, para Cop-L50 y CopBp-50, respectivamente. La adición de biopolímeros no afectó significativamente ( $p > 0,05$ ) al contenido en FT de los coproductos.



**Figura 9.** Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico (GAE)/100g mf) en las diferentes muestras analizadas: puré de naranja con biopolímeros (PBp), coproducto (Cop) y coproducto con biopolímeros (CopBp), según el procesado al que se sometieron: productos control o frescos (F), liofilizados a  $30^{\circ}\text{C}/26\text{h}$  (L30), liofilizados a  $50^{\circ}\text{C}/19\text{h}$  (L50). Las letras diferentes (a-c) indican para cada producto diferencias significativas entre los tratamientos realizados ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas diferentes (X-Z) indican diferencias significativas entre los tres productos de estudio ( $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas diferentes (x-z) indican diferencias significativas entre los coproductos debidas a la adición de biopolímeros ( $p < 0,05$ ).

Estos resultados concuerdan con los estudios de otros investigadores como [Mejía-Meza et al., \(2008\)](#), que también observaron pérdidas en compuestos fenólicos de arándanos liofilizados trabajando a  $20^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo de secado de 72h.

En general los compuestos fenólicos están compuestos por dos anillos bencénicos y uno heterocíclico con oxígeno formando un núcleo fenil-2-benzopirona, que se unen entre sí formando largas cadenas polifenólicas ([Dergal, 2005](#)). El aumento de temperatura podría desencadenar la ruptura entre los enlaces de los grupos y la consecuente formación de otras sustancias fenólicas ([Hayat et al., 2010](#)). Sin embargo, parece ser que existe cierta controversia en las conclusiones obtenidas por distintos autores en relación al efecto de la temperatura en el contenido en compuestos fenólicos de las frutas. La estabilidad de los mismos va a depender de su composición y estructura química. Así, la diferente composición de flavonoides entre el puré y el coproducto hace que a  $30^{\circ}\text{C}$ , en un caso, la estabilidad

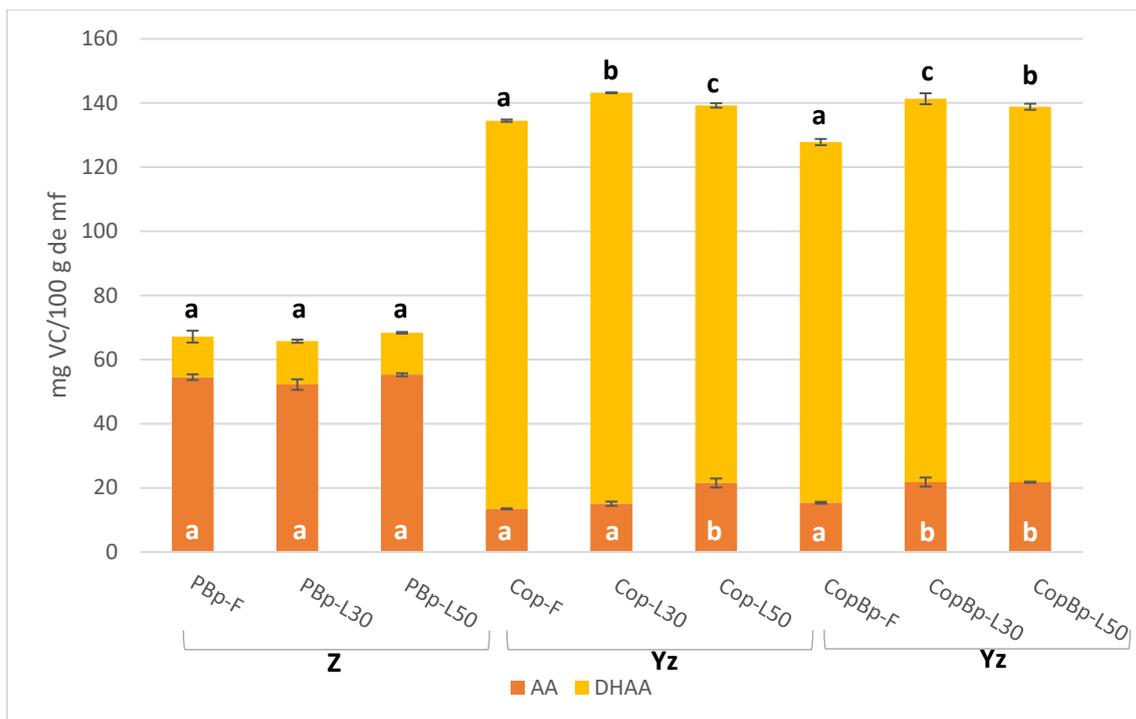
de los FT no se vea comprometida y sin embargo sí disminuyen en el coproducto. Los flavonoides mayoritarios, en el caso de las naranjas, son las flavanonas glucosiladas hesperidina, que representa el 50% de los compuestos fenólicos totales, y está especialmente ubicada en la piel, la didimina y la narirutina (Escobedo-Avellaneda et al., 2014). Las flavanonas agliconas aparecen de forma reducida (naringenina o hesperetina), en ocasiones es resultado de procesos de hidrólisis glucosídica que tienen lugar durante la transformación de los cítricos. La flavona diosmina y las flavonas polimetoxiladas sinensetina, nobiletina y tangeretina se encuentran en mucha menor cantidad en el exocarpio, presentan una concentración prácticamente residual en las membranas del endocarpio y especialmente reducida en el zumo de naranja (Marqués, 2020). Estudios de Escobedo-Avellaneda et al., (2014) cuantificaron hesperidina y didimina en todas las fracciones de naranja, mientras que nobiletina solo en ambos componentes de la piel (flavedo y albedo), y sinensetina y auranetina solo en el flavedo. Es decir, el albedo fue la principal fuente de flavanonas glicosiladas y el flavedo de flavonas metoxiladas. Resultados similares fueron descritos por Xu et al., (2008).

Por otra parte, la disminución de FT ocasionada por el secado por liofilización, también puede ser debida a que la ruptura de la estructura celular producida durante la congelación de las muestras debido a la formación de cristales de hielo, aunque podría facilitar la extracción de los mismos, también puede facilitar la liberación de enzimas oxidativas que al no ser inactivadas posteriormente, al no alcanzarse elevadas temperaturas durante la liofilización, pueden degradar los compuestos fenólicos. Algunos estudios con naranja han descrito la diferente sensibilidad de los compuestos fenólicos frente a factores de degradación como la temperatura, la luz o la acción de enzimas de la misma dependiendo de su composición (Garau et al., 2007).

El contenido de VC presente en los productos, expresado como la suma de AA (forma reducida de VC) y de DHAA (forma oxidada de VC, también con acción vitamínica), se contempla en la **Figura 10**. Los valores fueron similares a los publicados por USDA (2011) para piel y pulpa de naranja. Como puede observarse, los coproductos presentaron significativamente ( $p < 0,05$ ) más VC que el puré. Además, las muestras de PBp presentaron mayor contenido de AA que de DHAA, al contrario que los coproductos, donde predominó el DHAA. En este sentido, autores como Sir Elkhathim et al., (2018) mencionan que el contenido en VC es mayor en la cáscara de diferentes frutos cítricos, como el limón, la naranja y el pomelo, que en la pulpa. Galindo (2019) comprobó también que el contenido en VC era mayor en el flavedo y albedo que en las partes internas de la variedad de naranja Valencia-Late (en el puré de naranja 53,4 mg VC/100 g y en el coproducto, formado por flavedo y albedo, 149 mg VC/100 g).

La adición de biopolímeros no afectó ( $p > 0,05$ ) al contenido ni de VC ni de AA de los coproductos.

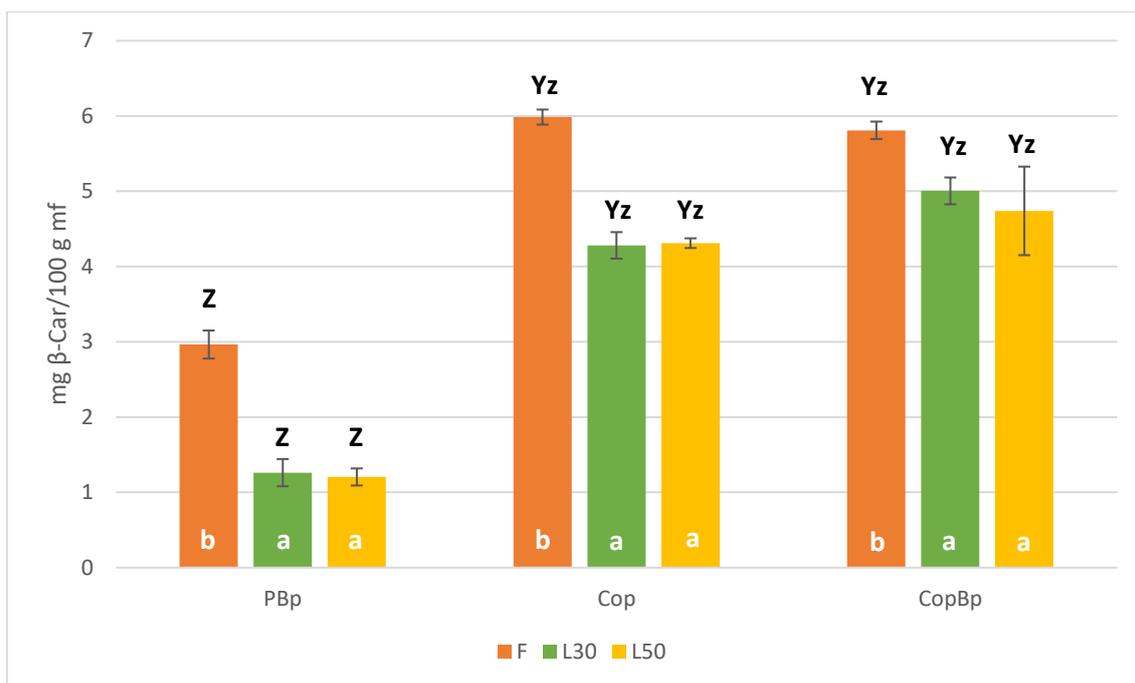
En cuanto al efecto de la liofilización, no parece afectar ( $p > 0,05$ ) al contenido de AA ni VC del puré, sin embargo, en los coproductos se observó un aumento ( $p < 0,05$ ) con el procesado. En el caso de los Cop, Cop-L30 presentó un aumento en VC del orden de 6,46% y de 3,5% en Cop-L50, respecto a Cop-F. De manera similar, en el caso de las muestras CopBp, CopBp-L30 presentó un aumento del 10,56% y CopBp-L50 del 8,6%, respecto a CopBp-F. Este aumento del contenido en VC podría justificarse asumiendo una mayor facilidad de extracción de los compuestos en los productos liofilizados, asociados a su mayor porosidad (Silva-Espinoza et al., 2021).



**Figura 10.** Contenido en vitamina C, ácido ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (DHAA) (mg VC/100 g mf), en los diferentes productos analizados. La nomenclatura de las muestras: puré de naranja con biopolímeros control o fresco (PBp-F), puré con biopolímeros liofilizado a 30°C/26h (PBp-L30), puré con biopolímeros liofilizado a 50°C/19h (PBp-L50), coproducto control o fresco (Cop-F), coproducto liofilizado a 30°C/26h (Cop-L30), coproducto liofilizado a 50°C/19h (Cop-L50), coproducto con biopolímeros control o fresco (CopBp-F), coproducto con biopolímeros liofilizado a 30°C/26h (CopBp-L30) y coproducto con biopolímeros liofilizado a 50°C/19h (CopBp-L50). Para cada producto las letras diferentes (a-c) indican diferencias significativas entre los tratamientos realizados ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas diferentes (X-Z) indican diferencias significativas entre los tres productos de estudio ( $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas diferentes (x-z) indican diferencias significativas entre los coproductos debidas a la adición de biopolímeros ( $p < 0,05$ ).

La **Figura 11** presenta la concentración de CT de las muestras estudiadas. El contenido obtenido fue similar al reportado por [Xu et al. \(2008\)](#) para frutos cítricos. Se puede observar cómo los coproductos presentaron mayor contenido en carotenoides ( $p < 0,05$ ) que el puré, coincidiendo con autores como [Carmona et al., \(2007\)](#) que reportan en sus estudios un mayor contenido de los carotenoides totales en el flavedo respecto a la pulpa.

Respecto al tratamiento de las muestras, en general los productos liofilizados presentaron menor contenido ( $p < 0,05$ ) en CT que las respectivas muestras control, y no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las diferentes temperaturas de liofilización empleadas. La inestabilidad de los carotenoides se debe al hecho de que son compuestos altamente insaturados, degradándose fundamentalmente debido a procesos oxidativos. Otros factores como la temperatura, la luz o el pH también pueden producir importantes cambios cualitativos en estos compuestos debido a reacciones de isomerización ([Meléndez-Martínez et al., 2004](#)). Otros estudios también ponen de manifiesto la inestabilidad de los carotenoides frente a la liofilización ([Silva-Espinoza et al., 2021](#)). La liofilización produjo más pérdidas en CT del puré que en los coproductos. Así en el puré se produjo una disminución ( $p < 0,05$ ) de CT del 57% y 59% en PBp-L30 y PBp-L50.



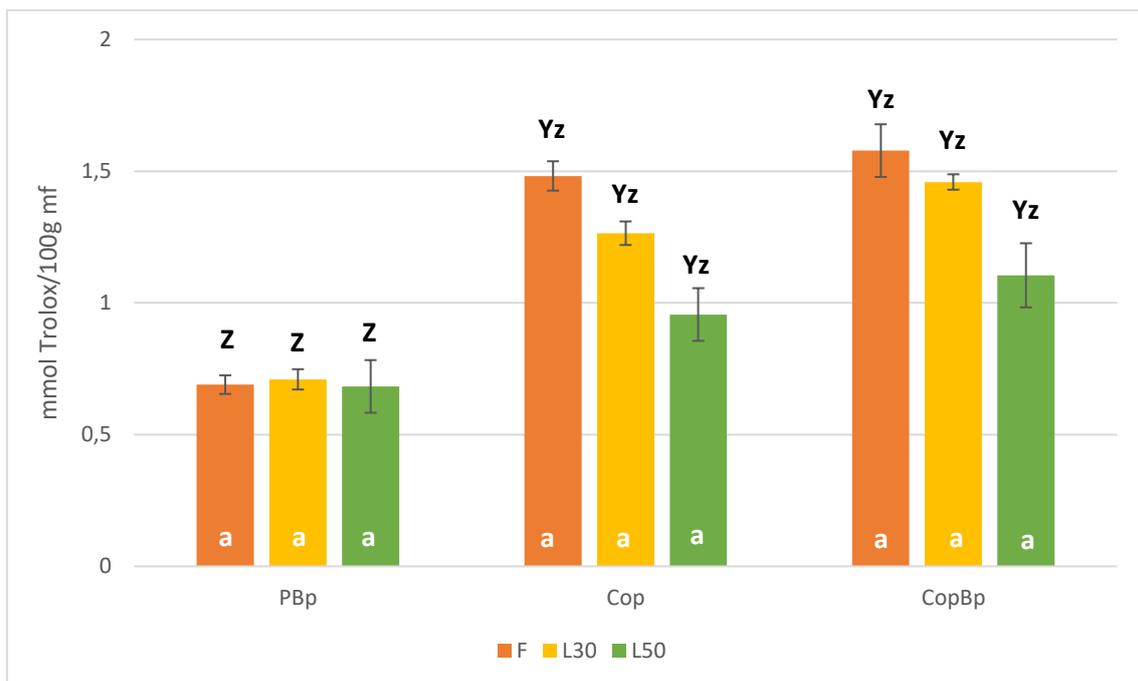
**Figura 11.** Contenido en carotenoides totales (mg  $\beta$ -Caroteno/100 g mf) en las diferentes muestras analizadas: puré de naranja con biopolímeros (PBp), coproducto (Cop) y coproducto con biopolímeros (CopBp), según el procesado al que se sometieron: productos control o frescos (F), liofilizados a 30°C/26h (L30) y liofilizados a 50°C/19h (L50). Las letras diferentes (a-c) indican para cada producto diferencias significativas entre los tratamientos realizados ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas diferentes (X-Z) indican diferencias significativas entre los tres productos de estudio ( $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas diferentes (x-z) indican las diferencias significativas entre los coproductos debidas a la adición de biopolímeros ( $p < 0,05$ ).

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en CT de los coproductos respecto a la adición de biopolímeros. En el caso de CopBp, al liofilizar las muestras, CopBp-L30 sufrió una pérdida ( $p < 0,05$ ) de CT del 14% y CopBp-L50 del 18%. En las muestras de Cop se produce tras liofilizar un descenso significativo ( $p < 0,05$ ) del orden de 27% y 28% para Cop-L30 y Cop-L50, respectivamente.

El efecto de la temperatura y el procesado sobre el contenido en carotenoides genera diversidad de opiniones entre los investigadores. [Fratianni et al. \(2010\)](#) evaluaron la degradación de carotenoides en zumo de naranja en diferentes condiciones tiempo/temperatura y concluyó que la luteína y los carotenoides con actividad provitamina A fueron estables a temperaturas de 60 a 70°C, pero a partir de 85°C, se produjeron pérdidas por degradación del 50%. En ese mismo estudio, el procesado industrial (extracción y pasteurización) resultó en una reducción total del contenido de carotenoides del zumo de naranja. Por otra parte, [Wagner y Warthesen \(1995\)](#) evaluaron la estabilidad de  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno en zanahoria liofilizada encapsulada en diferentes tipos de almidón hidrolizado, comprobando que la degradación de los carotenos estudiados como consecuencia del almacenamiento a temperaturas comprendidas entre 37 y 65°C, se debía fundamentalmente a procesos de autooxidación debido a la presencia de la enzima lipoxigenasa. En este sentido, las pérdidas observadas en CT en nuestro trabajo pueden ser más debidas a oxidaciones producidas

durante el procesamiento de las muestras, efecto de la luz, enzimas, etc, que a la temperatura de liofilización empleada.

En la **Figura 12** se muestra la actividad antioxidante de las muestras analizada mediante el método FRAP. Los valores de actividad antioxidante de las distintas fracciones de naranja son atribuidos principalmente a los compuestos hidrófilos como fenoles totales, flavonoides y vitamina C (Escobedo-Avellaneda et al., 2014). Sin embargo, dentro de éstos, existe cierta controversia en cuanto a que compuestos fitoquímicos aportan mayor actividad antioxidante. Algunos autores afirman que, en los cítricos, el compuesto bioactivo con más actividad antioxidante generalmente es la vitamina C (Sanchez-Moreno et al., 2003; Xu et al., 2008; Igual et al., 2016), mientras que otros estudios afirman que es consecuencia de los fenoles (Bahorun et al., 2004; Franke et al., 2004). De cualquier manera, la actividad antioxidante viene determinada por interacciones antagonistas o sinergistas entre las diferentes sustancias que muestran esta actividad (Palomino et al., 2009), así como por el modo de acción concreto de cada una de ellas, por lo que no hay un acuerdo en el mejor método para su análisis, aconsejándose por lo tanto combinar más de uno para evaluar de manera correcta la capacidad antioxidante de una muestra (Pérez-Jiménez et al., 2008). Los métodos más comúnmente usados son la reducción de metales (FRAP) y la captación de radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (DPPH).



**Figura 12.** Actividad antioxidante (mmol Trolox/100g mf) medida mediante el método FRAP de las diferentes muestras analizadas: puré de naranja con biopolímeros (PBp), coproducto (Cop) y coproducto con biopolímeros (CopBp), según el procesamiento al que se sometieron: productos control o frescos (F), liofilizados a 30°C/26h (L30) y liofilizados a 50°C/19h (L50). Las letras diferentes (a-c) indican para cada producto diferencias significativas entre los tratamientos realizados ( $p < 0,05$ ). Las letras mayúsculas diferentes (X-Z) indican diferencias significativas entre los tres productos de estudio ( $p < 0,05$ ). Las letras minúsculas diferentes (x-z) indican las diferencias significativas entre los coproductos debidas a la adición de biopolímeros ( $p < 0,05$ ).

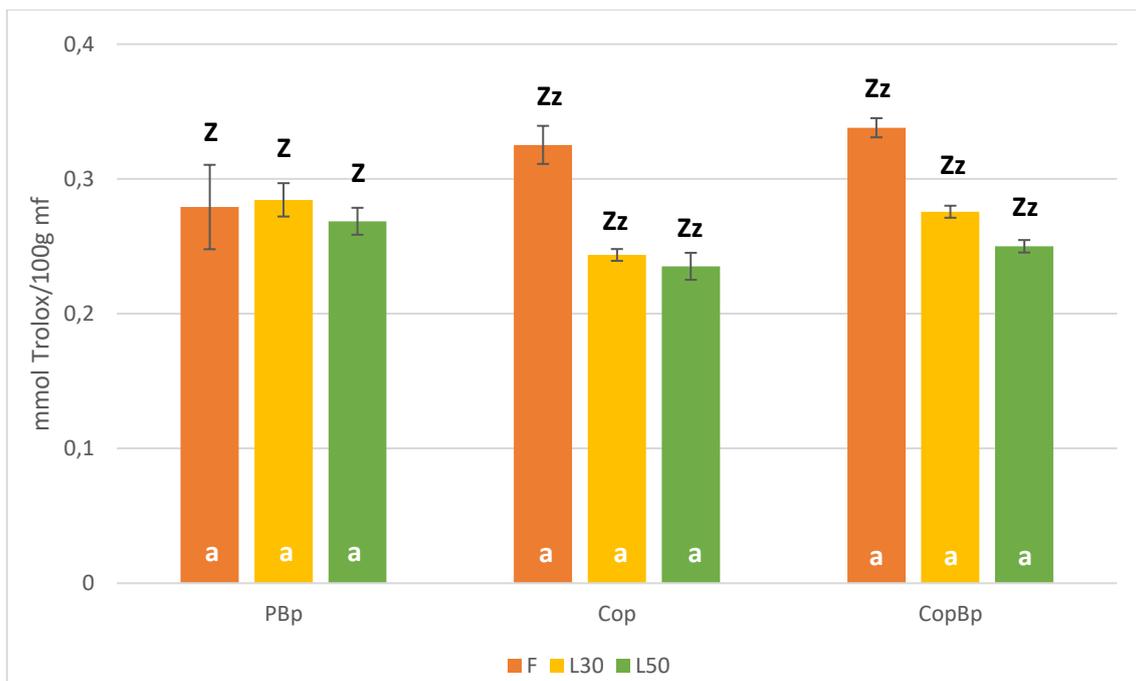
En general, la actividad antioxidante medida por el método FRAP, es mayor ( $p < 0,05$ ) para los coproductos que para el PBp. Algunos estudios han reportado el efecto antioxidante de la fibra dietética presente en los cítricos y ubicada de manera mayoritaria en la piel. En este sentido, el efecto antioxidante de la pectina parece estar relacionado con la mejora de las enzimas endógenas y con la eliminación de radicales libres (Zou et al., 2016). Por su parte la lignina tiene estructura polifenólica, su alta estabilidad térmica ha sido estudiada con el objetivo de convertirla en posible aditivo para mejorar la estabilidad a la termo-oxidación de distintos polímeros sintéticos (Eugenio et al., 2021).

Para cada producto, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) por efecto de la liofilización. Aunque se observaron ligeras pérdidas de actividad antioxidante en los coproductos debido al procesado, relacionadas con la evolución seguida por los compuestos fenólicos y carotenoides. Tampoco se observó en la actividad antioxidante de los coproductos ningún efecto ( $p > 0,05$ ) de la adición de biopolímeros.

El grado de conservación de los compuestos bioactivos estudiados, de las muestras después de la liofilización, especialmente la estabilidad observada en la VC puede ser responsable de la elevada actividad antioxidante de las muestras. Se ha observado una estrecha correlación de VC y FT con la actividad antioxidante determinada por el ensayo FRAP en zumo de naranja (Gardner et al., 2000). La habilidad de los compuestos fenólicos y de la VC para donar átomos de hidrógeno de los grupos hidroxilo está relacionada con su capacidad de reducción (Scott, 1997).

La **Figura 13** muestra la actividad antioxidante analizada mediante el método DPPH. Analizando los resultados del efecto de la liofilización en la actividad antioxidante con el método DPPH en cada muestra, PBp, Cop y CopBp, se obtuvieron tendencias similares a las observadas con el método FRAP, no observándose un impacto significativo ( $p > 0,05$ ) del procesado. Sin embargo, aquí el ANOVA no estableció diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre productos, tampoco se vio efecto ( $p > 0,05$ ) de la adición de biopolímeros en los coproductos.

De nuevo la ligera disminución ( $p > 0,05$ ) observada en la actividad de eliminación de radicales libres DPPH· después de la liofilización, puede estar relacionado principalmente con la pérdida de CT. En este sentido, los carotenoides tales como  $\beta$ -caroteno, criptoxantina, luteína o zeaxantina presentes en las naranjas, han demostrado tener una mejor capacidad de captación del radical DPPH· que de actuar como reductores del ión  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  en el método FRAP (Liu et al., 2008).



**Figura 13.** Actividad antioxidante (mmol Trolox/100 g mf) medida mediante el método DPPH de las diferentes muestras analizadas: puré de naranja con biopolímeros (PBp), coproducto (Cop) y coproducto con biopolímeros (CopBp), según el procesado al que se sometieron: productos control o frescos (F), liofilizados a 30°C/26h (L30), liofilizados a 50°C/19h (L50). Las letras diferentes (a-c) indican para cada producto diferencias significativas entre los tratamientos realizados ( $p < 0,05$ ). Letras mayúsculas diferentes (X-Z) indican diferencias significativas entre los tres productos de estudio ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes (x-z) indican las diferencias significativas entre los coproductos debidas a la adición de biopolímeros ( $p < 0,05$ ).

Para tratar de explicar la relación entre la actividad antioxidante de las muestras y los compuestos bioactivos analizados en este trabajo, se realizaron análisis estadísticos de correlación de Pearson (**Tabla 4**). El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que mide el grado de variación entre distintas variables relacionadas linealmente. El intervalo de variación de este coeficiente es de -1 a +1 y mide la fuerza de relación lineal entre las variables.

**Tabla 4.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las actividades antioxidantes medidas por cada método FRAP y DPPH y los compuesto analizados en las muestras.

	FT	VC	AA	CT
FRAP	0,8184*	0,8240*	0,8807*	0,5911*
DPPH	0,2081	0,0666	0,0857	0,2200

\* Correlaciones estadísticamente significativas (nivel de confianza 95%).

Todos los compuestos bioactivos se correlacionaron de manera significativa con la actividad antioxidante analizada por el método FRAP, siendo AA, VC y CT los que obtuvieron un coeficiente más alto. Con el método DPPH el compuesto que mejor se relacionó fue CT.

## 4.2 Digestión de las muestras y bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos

Las propiedades biológicas de las sustancias bioactivas dependen de su bioaccesibilidad y su biodisponibilidad. Una parte de estas sustancias se libera de la matriz del alimento en la parte superior del tracto gastrointestinal por solubilización directa en los fluidos intestinales en condiciones fisiológicas (37°C, pH 1-7,5) y/o por la acción de las enzimas digestivas, de manera que la hidrólisis enzimática de proteínas, carbohidratos y lípidos favorece la liberación de los fitoquímicos de la matriz alimentaria. Estas sustancias bioactivas bioaccesibles se absorben parcialmente a través de la mucosa del intestino delgado. Otra parte de los antioxidantes ingeridos (la parte no bioaccesible) pasan sin disolverse y sin alterarse a través del intestino superior en asociación con la fibra dietética y llegan al colon, donde pueden fermentarse por la acción de enzimas bacterianas (Andersson et al., 1996).

Puesto que en estudios anteriores (Silva-Espinoza et al., 2021) se ha visto que las etapas de digestión oral y gástrica afectan poco a los compuestos estudiados en este trabajo, sólo se ha analizado el contenido de la etapa intestinal, concretamente los bioactivos que pasan a través de la membrana de diálisis, lo que hace referencia a la parte de los compuestos que se absorbe en el intestino delgado. Tal y como se ha comentado en Material y Métodos (apartado 3.2.2) se realizó la digestión *in vitro* de las muestras del PBp (PBp-F, PBp-L30 y PBp-L50) y del Cop (Cop-F y Cop-L50). Debido al gran volumen de trabajo que suponía realizar la digestión *in vitro* de todas las muestras, se decidió elegir las citadas para estudiar el efecto de la liofilización en el puré y en el coproducto, dado que la adición de biopolímeros no ha supuesto una mejora sustancial en los compuestos bioactivos del coproducto de naranja.

A partir de los valores obtenidos para el contenido en FT, VC, AA, DHAA y CT analizados tras la etapa de digestión intestinal interna (Tabla 5) y la cantidad presente en las muestras no digeridas, se calculó la bioaccesibilidad (Ec. 2) de dichos compuestos en las diferentes muestras (Tabla 6), así como la estimación de la actividad antioxidante de cada producto que finalmente tiene efecto en el cuerpo (Tabla 7). En general, los resultados obtenidos para la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante de PBp-F fueron comparables a los obtenidos en anteriores estudios para el puré de naranja (Silva-Espinoza et al., 2021).

**Tabla 5.** Contenido en fenoles totales (TF, mg GAE/100g mf), vitamina C (VC, mg VC/100g mf), ácido ascórbico (AA, mg VC/100g mf), ácido dehidroascórbico (DHAA, mg/100g mf) y carotenoides totales (CT, mg  $\beta$ -Caroteno/100g mf) de las muestras.

Muestra	FT	VC	AA	DHAA	CT
PBp-F	26 ± 2 <sup>b</sup>	16 ± 8 <sup>b</sup>	13,2 ± 0,3 <sup>b</sup>	3,2 <sup>b</sup>	0,116 ± 0,002 <sup>b</sup>
PBp-L30	4,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,2 <sup>a</sup>	0,015 ± 0,005 <sup>a</sup>
PBp-L50	3,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>
Cop-F	37 ± 4 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	0,134 ± 0,007 <sup>b</sup>
Cop-L50	5,9 ± 0,7 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>

\*nd: No detectado; Por columnas para cada compuesto las letras diferentes en superíndice (a-b) indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 6.** Porcentaje de bioaccesibilidad (%) de los compuestos bioactivos en las muestras.

Muestra	FT	VC	AA	DHAA	CT
PBp-F	34,24	24,38	24,16	25,33	3,93
PBp-L30	6,82	3,85	4,46	1,46	1,21
PBp-L50	7,30	1,74	1,17	4,18	1,31
Cop-F	17,75	-	-	-	2,23
Cop-L50	3,99	-	-	-	0,49

En relación a FT, puede observarse un mayor contenido ( $p < 0,05$ ) en los digestos de las muestras control o frescas PBp-F y Cop-F que, en los digestos de los productos liofilizados, no observándose diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre éstos últimos. Ello queda reflejado en el menor % de bioaccesibilidad de los productos liofilizados (**Tabla 6**). Para entender la disminución de FT en el digesto intestinal hay que considerar, por una parte, que el pH alcalino de la fase intestinal provoca que los compuestos fenólicos sufran distintas reacciones químicas, principalmente oxidación y polimerización, favoreciendo la formación de otros compuestos fenólicos derivados (como las chalconas) que no pueden absorberse debido a su baja solubilidad y a su alto peso molecular (Rodríguez-Roque et al., 2013a). Por otra parte, se ha descrito como las interacciones entre los compuestos fenólicos y otros constituyentes de la naranja (minerales, fibra) pueden favorecer la formación de complejos incapaces de atravesar la membrana de diálisis (Rodríguez-Roque et al., 2013b).

La muestra PBp-F fue la que más porcentaje de bioaccesibilidad presentó. A pesar de que los coproductos presentaron mayor contenido en FT, su bioaccesibilidad fue menor. Esto puede ser debido a, que como ya se ha comentado anteriormente, la distinta composición y naturaleza química de los FT en la piel y en la pulpa de la naranja. Así, los flavonoides glicosilados, que son más abundantes en la piel de la naranja, son más difíciles de absorber que los que tienen estructura de aglicona, ya que para ello la parte azucarada (glicósido) adherida al esqueleto del flavonoide debe ser previamente eliminada (Palafox-Carlos et al., 2011).

También hay que considerar que en la piel de la naranja hay mayor cantidad de fibra dietética, que se une a los fenoles e impide que se absorban a través de las paredes del intestino. El complejo fibra-fenoles pasa al intestino grueso, donde son degradados por la microbiota intestinal a ácidos fenólicos simples que pueden ser absorbidos por el sistema circulatorio o ejercer su efecto beneficioso sirviendo de sustrato de fermentación para la microbiota intestinal. En este proceso se producen finalmente distintos compuestos (acetato, propionato y butirato, amoníaco, gases, H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, aminas, fenoles), energía y biomasa (Saura-Calixto, 2011). Este mecanismo hace posible una función que es esencial para el ecosistema intestinal: el mantenimiento de la microbiota del colon y la mejora del sistema inmunológico (Cummings et al., 1991).

En cuanto la VC (AA + DHAA), se observó una menor bioaccesibilidad que para FT, siendo la muestra PBp-F, la más ( $p < 0,05$ ) bioaccesible. Estos resultados en los digestos intestinales muestran la inestabilidad de la vitamina C respecto a las condiciones intestinales, como el pH alcalino y la acción de las enzimas propias de esta etapa (Silva-Espinoza et al., 2021). Otros factores como la temperatura, la agitación y el oxígeno pueden propiciar también la oxidación de la vitamina C (Rodríguez-Roque, 2014). En este sentido, esto podría explicar que no se detectara VC en los digestos intestinales de los coproductos. Puesto que en esta muestra la VC se encuentra de manera mayoritaria en su forma oxidada (DHAA), se encuentra mucho más susceptible a oxidarse a formas no activas de vitamina (2,3-ácido dicetogulónico) al pH básico de la digestión intestinal (Aschoff et al., 2015).

Sobre el contenido de CT en los digestos intestinales, se puede observar que las muestras con mayores valores ( $p < 0,05$ ) son Cop-F y PBp-F, respecto a los productos liofilizados. Estas muestras también fueron las más bioaccesibles ( $p < 0,05$ ). Los resultados obtenidos son comparables con los obtenidos en otros estudios con zumo de naranja (Rodríguez-Roque et al., 2015), que sugirieron que la bioaccesibilidad y la tasa de absorción de los carotenoides se ve afectada negativamente por la presencia de fibra. Otros estudios sugieren que la pectina cítrica intrínseca puede tener un fuerte efecto inhibitorio en la absorción del  $\beta$ -caroteno y de otros compuestos liposolubles de la dieta (Aschoff et al., 2015). Además, los datos tanto de contenido en carotenoides como de los digestos y de la bioaccesibilidad son lo más bajos en comparación con el resto de bioactivos, esto es así debido a que estos compuestos son moléculas altamente susceptibles a la oxidación debido a los numerosos dobles enlaces de su estructura química. Otros autores también observaron la inestabilidad de los carotenoides durante la digestión, sobre todo durante la fase gástrica; las condiciones ácidas de esta fase provocan cambios estructurales, así como reacciones de oxidación (Mun y McClements, 2017). Por otra parte, su absorción también se ve dificultada por el hecho de que se trata de sustancias que tienen baja capacidad para liberarse de la matriz alimentaria y de solubilizarse, ya que, al ser compuestos muy hidrofóbicos, resulta difícil su dispersión en el medio acuoso del tracto digestivo (Fernández et al., 2009).

Las muestras que mayor ( $p < 0,05$ ) actividad antioxidante presentaron en los digestos intestinales fueron PBp-F y Cop-F (Tabla 7), en concordancia con lo observado en cuanto al contenido en compuestos bioactivos de los digestos de estas muestras. Dado que el concepto de bioaccesibilidad solo se aplica a los compuestos bioactivos, se puede utilizar la misma ecuación (Ec. 2) para obtener una estimación del porcentaje de actividad antioxidante proporcionada por cada producto que produzca su efecto a nivel corporal. La disminución de la capacidad antioxidante medida por ambos métodos en la etapa intestinal podría deberse a la acción ya comentada de las enzimas y del pH durante esta etapa sobre la estructura química de algunos compuestos bioactivos (Bouayed et al., 2011). El cambio de algunas estructuras químicas y/o la formación de complejos con otras sustancias presentes en las muestras ya comentadas, puede suponer una disminución, no solo de la concentración, sino también de la actividad antioxidante de dichos compuestos.

**Tabla 7.** Actividad antioxidante de las muestras digeridas analizadas mediante el método FRAP y DPPH (mmol Trolox/100g mf) y estimación de la actividad antioxidante (% AAO) de las muestras.

Muestra	mmol Trolox/100g mf (FRAP)	% AAO (FRAP)	mmol Trolox/100g mf (DPPH)	% AAO (DPPH)
PBp-F	0,133 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	19,30	0,076 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	27,32
PBp-L30	0,02 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	3,30	0,007 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	2,31
PBp-L50	0,0102 $\pm$ 0,0003 <sup>a</sup>	1,50	0,0025 $\pm$ 0,0004 <sup>a</sup>	0,92
Cop-F	0,112 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	7,58	0,090 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	7,77
Cop-L50	0,021 $\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	2,22	0,015 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	6,33

Por columnas para cada análisis de la actividad antioxidante (FRAP y DPPH) las letras diferentes en superíndice (a-b) indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

## 5. CONCLUSIONES

El coproducto del puré de naranja presentó valores significativamente más altos de compuestos bioactivos: fenoles totales, vitamina C (principalmente en forma de ácido dehidroascórbico) carotenoides totales y mayor actividad antioxidante que el puré de naranja formulado con goma arábiga y fibra de bambú.

La adición de biopolímeros, cuya incorporación es necesaria para facilitar el proceso y estabilizar al coproducto deshidratado, no afectó ni al contenido en fitoquímicos ni a su actividad antioxidante.

La liofilización disminuyó los fenoles totales y los carotenoides del puré y los coproductos, independientemente de las condiciones del proceso (temperatura de la bandeja del liofilizador 30 y 50°C, tiempo 26 y 19 h, respectivamente). Sin embargo, la actividad antioxidante no se vio afectada, por lo que ésta parece estar más relacionada con la vitamina C, que fue la que resultó más estable.

En este sentido, los resultados obtenidos permiten proponer a la liofilización como técnica para obtener productos de naranja con un contenido en vitamina C y actividad antioxidante adecuados, trabajando a 50°C, para acortar el tiempo de secado.

En relación a la digestión *in vitro* de las muestras, el puré de naranja formulado con biopolímeros presentó mayor bioaccesibilidad en todos los compuestos bioactivos estudiados que el coproducto. Aunque el coproducto presentó más fitoquímicos, éstos resultaron ser menos absorbibles, debido a la distinta composición y naturaleza química de los compuestos fenólicos, vitamina C y carotenoides en la piel y en la pulpa de la naranja. Además, la fibra presente mayoritariamente en la piel de la naranja podría ejercer un efecto inhibitor sobre la absorción de los fenoles y carotenoides. Estos compuestos bioactivos unidos a la fibra pasarían al intestino grueso, donde actuarían como prebióticos, sirviendo de sustrato para la microbiota intestinal.

El puré de naranja formulado con goma arábiga y fibra de bambú liofilizado ha mostrado un excelente aporte funcional, permitiendo ofrecer al consumidor un producto de alta calidad en un formato tipo snack, estable y de fácil consumo, alternativo al consumo de fruta tradicional.

Por su parte, la preciada composición del coproducto permitiría su reintroducción en la cadena alimentaria humana como ingrediente para la producción de alimentos funcionales, lo que mejoraría la eficiencia de las industrias de procesamiento de naranja fomentando una economía circular al convertir los residuos en recursos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- AGUDELO, C., IGUAL, M.M., CAMACHO, M.M., & MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2017). Effect of process technology on the nutritional, functional, and physical quality of grapefruit powder. *Food Science and Technology International*, 23(1), 61–74. <https://doi.org/10.1177/1082013216658368>
- AHMED, O. M., HASSAN, M. A., ABDEL-TWAB, S. M., & ABDEL, M. N. (2017). Navel orange peel hydroethanolic extract, naringin and naringenin have anti-diabetic potentials in type 2 diabetic rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.094>
- AL-DOAISS, A. A., & AL-SHEHRI, M. A. (2020). Protective effect of gum arabic/insulin against histological changes in testes of diabetic rats. *International Journal of Morphology*, 38(2), 340–347. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022020000200340>
- ALESÓN-CARBONELL, L., FERNÁNDEZ-GINES, J. M., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., SAYAS-BARBERA, E., & PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. (2002). La fibra en los alimentos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 169, 83–91.
- ANDAMAY, M., & ACOSTA, E. (2020). Impregnación al vacío de proteínas de lactosuero concentrado en las cáscaras de naranja valencia (*Citrus sinensis*). *Revista chilena de nutrición*, 47(6), 975–982. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182020000600975>
- ANDERSSON, H., BOSSAEUS, I., ELLEGARD, L., LANGKILDE, A. M., & SCHWEIZER, T. (1996). Amount and composition of substrates entering the colon. In *Dietary Fibre and Fermentation in the Colon: Office of Official Publications of the European Community: Luxembourg*, 24-27.
- AROZARENA, I. (2021). *Partes de una naranja y compuestos bioactivos del subproducto* [Ilustración]. Partes-naranja. <https://asindesperdicio.files.wordpress.com/2018/05/partes-naranja.png>
- ASCHOFF, J. K., KAUFMANN, S., KALKAN, O., NEIDHART, S., CARLE, R., & SCHWEIGGERT, R. M. (2015). In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids, and vitamin C from differently processed oranges and orange juices [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(2), 578–587. <https://doi.org/10.1021/jf505297t>
- AVELLO, M., & SUWALSKY, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494(II), 161–172. <https://doi.org/10.4067/s0718-04622006000200010>
- BAHORUN, T., LUXIMON-RAMMA, A., CROZIER, A., & ARUOMA, O. I. (2004). Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(12), 1553–1561. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1820>
- BARBA, A. I., CÁMARA, M., SÁNCHEZ, M. C., FERNÁNDEZ, V., & LÓPEZ, M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95(2), 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.028>
- BARBOSA-CÁNOVAS, G. V., VEGA-MERCADO, H., & RIBAS, A. I. (2000). *Deshidratación de alimentos*. Alianza Editorial.
- BASTÍAS, J. M., & CEPERO, Y. (2016). La vitamina C como un eficaz micronutriente en la fortificación de alimentos. *Revista chilena de nutrición*, 43(1), 81–86. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182016000100012>

- BELTRÁN, B., ESTÉVEZ, R., CUADRADO, C., JIMÉNEZ, S., & OLMEDILLA, B. (2012). Base de datos de carotenoides para valoración de la ingesta dietética de carotenos, xantofilas y de vitamina A; utilización en un estudio comparativo del estado nutricional en vitamina A de adultos jóvenes. *Nutrición Hospitalaria*, 27(4). [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0212-16112012000400055](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112012000400055)
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- BENZIE, I. F., & STRAIN, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)99005-5)
- BOÑÓN, C., VEJARANO, R., & SALAS, F. (2020). Efecto del secado por túnel, liofilización y atomización sobre la capacidad antioxidante y compuestos fenólicos de huacatay. *Proceedings of the 18th LACCEI International Multi-Conference for Engineering, Education, and Technology: Engineering, Integration, And Alliances for A Sustainable Development "Hemispheric Cooperation for Competitiveness and Prosperity on A Knowledge-Based Economy"*. Published. <https://doi.org/10.18687/laccei2020.1.1.223>
- BOUAYED, J., HOFFMANN, L., & BOHN, T. (2011). Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chemistry*, 128(1), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.02.052>
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., & BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- CARMONA, L., ZACARÍAS, L., & RODRIGO, M. J. (Eds.). (2007). *Efecto de la temperatura de conservación en la síntesis y acumulación de carotenoides en frutos cítricos*. [https://www.researchgate.net/publication/228506786\\_Efecto\\_de\\_la\\_temperatura\\_de\\_conservacion\\_en\\_la\\_sintesis\\_y\\_acumulacion\\_de\\_carotenoides\\_en\\_frutos\\_citricos](https://www.researchgate.net/publication/228506786_Efecto_de_la_temperatura_de_conservacion_en_la_sintesis_y_acumulacion_de_carotenoides_en_frutos_citricos)
- CHAFER, M. T., ORTOLÁ, M. D., CHIRALT, A., & FITO, P. (2000). Aprovechamiento de la corteza de cítricos mediante deshidratación osmótica con pulso de vacío. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 19(9), 55–61.
- CHEDEA, V. S., KEFALAS, P., & SOCACIU, C. (2010). Patterns of carotenoid pigments extracted from two orange peel waster (Valencia and Navel Var.). *Journal of Food Biochemistry*, 34(1), 101–110. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2009.00267.x>
- CHEW, B. P., & PARK, J. S. (2004). Carotenoid action on the immune response. *The Journal of Nutrition*, 134(1), 257S–261S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.1.257s>
- CILLA, A., ALEGRÍA, A., DE ANCOS, B., SÁNCHEZ-MORENO, C., CANO, M. P., PLAZA, L., CLEMENTE, G., LAGARDA, M. J., & BARBERÁ, R. (2012). Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7282–7290. <https://doi.org/10.1021/jf301165r>

- COLIN-HENRION, M., MEHINAGIC, E., RENARD, C. M., RICHOMME, P., & JOURJON, F. (2009). From apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell wall polysaccharides. *Food Chemistry*, 117(2), 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.03.109>
- CORDOVA, C., GUILLÉN, J., & TUESTA, T. (2020). Extracción por microondas libre de solvente del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) y el efecto de las condiciones de proceso en su rendimiento, composición y actividad antimicrobiana. *Revista chilena de nutrición*, 47(6), 965–974. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182020000600965>
- CUMMINGS, J., & MACFARLANE, G. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), 443–459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02739.x>
- DERGAL, S. B. (2005). *Química de los alimentos* (4.a ed.). Ed. México.
- DESMARCHELIER, C., & CICCIA, G. (1998). Antioxidantes de origen vegetal. *Ciencia Hoy*, 8(44). <https://cienciahoy.org.ar/antioxidantes-de-origen-vegetal/>
- EGAS, L. A. (2014). *Optimización del proceso de atomización de pomelo. Influencia de la temperatura y de la adición de solutos de alto peso molecular*. [Trabajo Fin de Máster, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/57151>
- EGAS, L. A. (2019). *Aplicación de la atomización y la liofilización para la obtención de polvo y snack de pomelo*. [Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València] <https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/129860>
- EGAS-ASTUDILLO, L., MARTÍNEZ-NAVARRETE, N., & CAMACHO, M. M. (2020). Impact of biopolymers added to a grapefruit puree and freeze-drying shelf temperature on process time reduction and product quality. *Food and Bioprocess Processing*, 120, 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.01.004>
- ESCOBEDO-AVELLADEDA, Z., GUTIÉRREZ-URIBE, J., VALDEZ-FRAGOSO, A., TORRES, J. A., & WELTI-CHANES, J. (2014). Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted orange. *Journal of Functional Foods*, 6, 470–481. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.11.013>
- ETCHEVERRY, P., GRUSAK, M. A., & FLEIGE, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in Physiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>
- EUGENIO, M. E., MARTÍN-SAMPEDRO, R., SANTOS, J. I., WICKLEIN, B., & IBARRA, D. (2021). Chemical, thermal and antioxidant properties of lignins solubilized during Soda/AQ pulping of orange and olive tree pruning residues. *Molecules*, 26(13), 3819. <https://doi.org/10.3390/molecules26133819>
- EVANS, W. J. (2000). Vitamin E, vitamin C, and exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2), 647S-652S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/72.2.647s>
- FERNÁNDEZ-GARCÍA, E., CARVAJAL-LÉRIDA, I., & PÉREZ-GÁLVEZ, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29(11), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2009.09.016>
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2003). *Prioridad mundial al consumo de fruta y hortalizas*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (OMS). <http://www.fao.org/spanish/newsroom/focus/2003/fruitveg1.htm>

- FRANKE, S. I. R., CKLESS, K., SILVEIRA, J. D., RUBENSAM, G., BRENDEL, M., ERDTMANN, B., & HENRIQUES, J. A. P. (2004). Study of antioxidant and mutagenic activity of different orange juices. *Food Chemistry*, 88(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.021>
- FRATIANNI, A., CINQUANTA, L., & PANFILI, G. (2010). Degradation of carotenoids in orange juice during microwave heating. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 867–871. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.01.011>
- FUNDACIÓN ESPAÑOLA DE LA NUTRICIÓN. (2020). Frutas. En *FRUTAS* (pp. 287–288). <https://www.fen.org.es/storage/app/media/flipbook/mercado-alimentos-fen/008-Frutas.pdf>
- GABAS, A. L., TELIS, V. R., SOBRAL, P. J., & TELIS-ROMERO, J. (2007). Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. *Journal of Food Engineering*, 82(2), 246–252. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.02.029>
- GALINDO, R. G. (2019). *Estabilidad de la vitamina C y la hesperidina de los coproductos del zumo y puré de naranja liofilizados*. [Trabajo Fin de Máster, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/129066>
- GARAU, M. C., SIMAL, S., ROSSELLÓ, C., & FEMENIA, A. (2007). Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. Canoneta) by-products. *Food Chemistry*, 104(3), 1014–1024. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.009>
- GARDNER, P. T., WHITE, T. A., MCPHAIL, D. B., & DUTHIE, G. G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68(4), 471–474. [https://doi.org/10.1016/s0308-8146\(99\)00225-3](https://doi.org/10.1016/s0308-8146(99)00225-3)
- GÓMEZ-ROMERO, M., SEGURA-CARRETERO, A., & FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. (2010). Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. *Phytochemistry*, 71(16), 1848–1864. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.08.002>
- GRACIA, R. A., & ALBISU, L. M. (2004). Evolución de la Industria Agroalimentaria Española en las dos últimas décadas. *Economía Industria*, 355(6), 197–200.
- GRAU, A. (2015). *Formulación de pomelo para la obtención de productos nutraceuticos por liofilización*. [Trabajo Fin de Grado, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/55723>
- GROSSO, G., BEI, R., MISTRETTA, A., MARVENTANO, S., CALABRESE, G., MASUELLI, L., GIGANTI, M. G., MODESTI, A., GALVANO, F., & GAZZOLO, D. (2013). Effects of vitamin C on health: A review of evidence. *Frontiers in Bioscience*, 18(3), 1017–1029. <https://doi.org/10.2741/4160>
- HAYAT, K., ZHANG, X., CHEN, H., XIA, S., JIA, C., & ZHONG, F. (2010). Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 73(3), 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.04.026>
- HERNÁNDEZ CASTAÑEDA, A. A., & ARANZAZU MOYA, G. C. (2012). Características y propiedades fisicoquímicas de la saliva: Una revisión. *UstaSalud*, 11(2), 102–112. <https://doi.org/10.15332/us.v11i2.1123>
- HERNÁNDEZ, F. (2004). Nutrientes esenciales en la prácticas deportivas. *Cuadernos Psicología Deportiva*, 4 (1 y 2) 215-221.

- HORWITZ, W. (1996). *Official method of analysis of Association of Official Analytical Chemist* (16.a ed.). Gaithersburg, Md.
- HORWITZ, W. (2000). *Official method of analysis of Association of Official Analytical Chemist* (17.a ed.). Gaithersburg, Md.
- HUANG, X., SHI, L., CAO, J., HE, F., LI, R., ZHANG, Y., MIAO, S., JIN, L., QU, J., LI, Z., & LIN, X. (2014). The sterile 20-like kinase tao controls tissue homeostasis by regulating the hippo pathway in *Drosophila* adult midgut. *Journal of Genetics and Genomics*, 41(8), 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2014.05.007>
- IGUAL, M., GARCÍA-MARTÍNEZ, E., CAMACHO, M., & MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2015). Stability of micronutrients and phytochemicals of grapefruit jam as affected by the obtention process. *Food Science and Technology International*, 22(3), 203-212. <https://doi.org/10.1177/1082013215585417>
- ISAZA, M. J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et Technica*, 1(33). <https://doi.org/10.22517/23447214.5817>
- JIMÉNEZ, S., PITA, G., & PADRÓN, M. (2019). *La anemia por deficiencia de hierro. Aspectos generales para su prevención y control*. Nutrinet Cuba. <https://issuu.com/cuba.nutrinet.org/docs/manualequipo>
- JIMÉNEZ-ESCRIG, A., RINCÓN, M., PULIDO, R., & SAURA-CALIXTO, F. (2001). Guava fruit (*Psidium guajava*L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5489–5493. <https://doi.org/10.1021/jf010147p>
- KEITH, M. E., JEEJEEBHOY, K. N., LANGER, A., KURIAN, R., BARR, A., O’KELLY, B., & SOLE, M. J. (2001). A controlled clinical trial of vitamin E supplementation in patients with congestive heart failure. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 219–224. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.219>
- KIM, Y. D., & MORR, C. V. (1996). Microencapsulation properties of gum arabic and several food proteins: Spray-dried orange oil emulsion particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(5), 1314–1320. <https://doi.org/10.1021/jf9503927>
- KLIMCZAK, I., MAŁECKA, M., SZLACHTA, M., & GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 313–322. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.02.012>
- KONDO, Y., HIGASHI, C., IWAMA, M., ISHIHARA, K., HANDA, S., MUGITA, H., MARUYAMA, N., KOGA, H., & ISHIGAMI, A. (2012). Bioavailability of vitamin C from mashed potatoes and potato chips after oral administration in healthy Japanese men. *British Journal of Nutrition*, 107(6), 885–892. <https://doi.org/10.1017/s0007114511003643>
- KRISHNAN, S., KSHIRSAGAR, A. C., & SINGHAL, R. S. (2005a). The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.03.020>
- LIU, D., SHI, J., COLINA, A., KAKUDA, Y., & JUN, S. (2008). The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and  $\beta$ -carotene mixtures on the DPPH free radical. *LWT - Food Science and Technology*, 41(7), 1344–1349. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.08.001>
- LÓPEZ, O. D., MUÑOZ, A., CARMONA, R., TORRES, L., & GONZÁLEZ, M. L. (2006). Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión de extracto acuoso de *Calendula officinalis* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11(1). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962006000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000100008)

- MARDONES, L. (2020). Vitamina C y Cáncer ¿amigos o enemigos? *Revista médica de Chile*, 148(7), 1047–1048. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872020000701047>
- MARQUÉS, R. (2020). *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, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/159934>
- MARTÍN, D. A. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- MARTÍNEZ DE VICTORIA, E. (2015). Compuestos bioactivos y salud: mitos y realidades. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 65(1). <https://www.proquest.com/scholarly-journals/compuestos-bioactivos-y-salud-mitos-realidades/docview/2085028054/se-2?accountid=28445>
- MCKEE, L. H., & LATNER, T. A. (2000). Underutilized sources of dietary fiber: A review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 55(4), 285–304. <https://doi.org/10.1023/a:1008144310986>
- MEJÍA-MEZA, E. I., YÁÑEZ, J. A., DAVIES, N. M., RASCO, B., YOUNCE, F., REMSBERG, C. M., & CLARY, C. (2008). Improving nutritional value of dried blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) combining Microwave-Vacuum, Hot-Air drying and freeze-drying technologies. *International Journal of Food Engineering*, 4(5). <https://doi.org/10.2202/1556-3758.1364>
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J., VICARIO, I. M., & HEREDIA, F. J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2). [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06222004000200003&script=sci\\_arttext](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06222004000200003&script=sci_arttext)
- MILLER, D. D., SCHRICKER, B. R., RASMUSSEN, R. R., & VAN CAMPEN, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248–2256. <https://doi.org/10.1093/ajcn/34.10.2248>
- MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN. (2020, 15 septiembre). *El Ministerio de Agricultura comunica un aforo de cítricos estimado de 6,93 millones de toneladas para la campaña 2020/2021* [Comunicado de prensa]. [https://www.mapa.gob.es/es/prensa/200915campanacitricos\\_tcm30-543753.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/prensa/200915campanacitricos_tcm30-543753.pdf)
- MOREIRAS, O., CARBAJAL, A., CABRERA, L., & CUADRADO, C. (2013). Composición nutricional y funcional de la naranja [Tabla]. En *Tablas de composición de alimentos*.
- MUN, S., & MCCLEMENTS, D. J. (2017). Influence of simulated in-mouth processing (size reduction and alpha-amylase addition) on lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in starch-based filled hydrogels. *LWT*, 80, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.011>
- NG, J. C., JUHASZ, A. L., SMITH, E., & NAIDU, R. (2009). *Contaminant bioavailability and bioaccessibility - Part 2: Guidance for industry*. CRC for contamination Assessment and Remediation of the Environment. Technical Reports nº 14.
- OLSON, J. A. (1999). Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49(1-5), 7–11.
- OMS & FAO. (2003). *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas* (N.o 916). [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42755/WHO\\_TRS\\_916\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42755/WHO_TRS_916_spa.pdf?ua=1)

- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2013). OMS | *Fomento del consumo mundial de frutas y verduras*. <https://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/>
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (2019). *Aumentar el consumo de frutas y verduras para reducir el riesgo de enfermedades no transmisibles*. Organización Mundial de la Salud (OMS). [https://www.who.int/elena/titles/fruit\\_vegetables\\_ncds/es/](https://www.who.int/elena/titles/fruit_vegetables_ncds/es/)
- PALAFX-CARLOS, H., AYALA-ZAVALA, J. F., & GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. (2011). The role of dietary fiber in the bioaccessibility and bioavailability of fruit and vegetable antioxidants. *Journal of Food Science*, 76(1), R6-R15. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01957.x>
- PALOMINO, L. R., GARCÍA, C. M., GIL, J. H., ROJANO, B. A., & DURANGO, D. L. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 388–395.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, J., ARRANZ, S., TABERNERO, M., DÍAZ-RUBIO, M. E., SERRANO, J., GOÑI, I., & SAURA-CALIXTO, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3), 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.12.004>
- PICÓN, E (2013). *Capacidad antimicrobiana de subproductos cítricos de limón, naranja y mandarina frente a Escherichia coli 0157:H7 y Salmonella typhimurium* [Trabajo de Fin de Máster, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/33275>
- PULIDO, R., BRAVO, L., & SAURA-CALIXTO, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402. <https://doi.org/10.1021/jf9913458>
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R., HÄKKINEN, S. T., AARNI, M., SUORTTI, T., LAMPI, A. M., EUROLA, M., PIIRONEN, V., NUUTILA, A. M., & OKSMAN-CALDENTEY, K. M. (2003). Blanching and long-term freezing affect various bioactive compounds of vegetables in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(14), 1389–1402. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1589>
- QUESADA, D. R. (2018). *Efecto del procesamiento en el contenido y bioaccesibilidad de carotenoides presentes en un colado de pejibaye, tomate y ayote, para infantes de 6 meses de edad en adelante* [Trabajo Final de Grado, Universidad de Costa Rica]. <http://hdl.handle.net/10669/77011>
- QUIÑONES. (2016). *Compuestos fenólicos bioactivos a partir del cultivo de callos con estructuras embriogénicas de Theobroma cacao l.* (2016). Editorial Universitaria.
- QUINTERO, S. L., & GONZÁLEZ, L. O. (2006). Uso de fibra de estopa de coco para mejorar las propiedades mecánicas del concreto. *Ingeniería y Desarrollo*, 20, 134–150.
- RAMÍREZ, A., & PACHECO, E. (2009). Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 34(4). [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442009000400014&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442009000400014&lng=es&tlng=es)
- RAO, A., & RAO, L. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 55(3), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.012>
- RASCÓN, M. P., BERISTAIN, C. I., GARCÍA, H. S., & SALGADO, M. A. (2011). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 549–557. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.08.021>

- ROCHA, R. (2013). *Fluoruro en alimentos: contenidos, bioaccesibilidad y absorción por el epitelio intestinal* [Tesis doctoral, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/27667>
- RODRÍGUEZ, M. J. (2014). *In vitro bioaccessibility of health-related compounds from beverages based on fruit juice, milk or soymilk: Influence of food matrix and processing* [Tesis Doctoral, Universitat de Lleida]. <http://hdl.handle.net/10803/146285>
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J., de ANCOS, B., SÁNCHEZ-MORENO, C., CANO, M. P., ELEZ-MARTÍNEZ, P., & MARTÍN-BELLOSO, O. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.020>
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J., ROJAS-GRAÜ, M. A., ELEZ-MARTÍNEZ, P., & MARTÍN-BELLOSO, O. (2013). Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1859–1867. <https://doi.org/10.1021/jf3044204>
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J., ROJAS-GRAÜ, M. A., ELEZ-MARTÍNEZ, P., & MARTÍN-BELLOSO, O. (2013a). Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(8), 1859–1867. <https://doi.org/10.1021/jf3044204>
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J., ROJAS-GRAÜ, M. A., ELEZ-MARTÍNEZ, P., & MARTÍN-BELLOSO, O. (2013b). Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 136(1), 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.115>
- SÁNCHEZ-MATA, M. C., CÁMARA-HURTADO, M., DíEZ-MARQUÉS, C., & TORIJA-ISASA, M. E. (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *European Food Research and Technology*, 210(3), 220–225. <https://doi.org/10.1007/pl00005516>
- SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., DE ANCOS, B., & CANO, M. P. (2003). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 430–439. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1392>
- SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., de ANCOS, B., & CANO, M. P. (2003b). Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(5), 430–439. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1392>
- SANVODAL, M., AYALA, S., ORÉ, R., LOLI, R., & HUAMÁN, O. (2008, septiembre). Estimulación de la actividad péptica del jugo gástrico, inducida por látex de *Croton palanostigma* (sangre de grado). *Anales de la Facultad de Medicina*, 69(3). [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832008000300003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832008000300003&lng=es&tlng=es)
- SAURA-CALIXTO, F. (2011). Dietary fiber as a carrier of dietary antioxidants: An essential physiological function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 43–49. <https://doi.org/10.1021/jf1036596>
- SCOTT, G. (1997). *Antioxidants in Science, Technology, Medicine and Nutrition*. (1.a ed.). Albion Publishing.

- SELVENDRAN, R. R., & RYDEN, P. (1999). Methods in plant biochemistry. *Academy Express - London*, 2, 549.
- SILVA, M. A. (2015). *Estudio del comportamiento reológico de zumo de fruta obtenido a partir de pomelo liofilizado* [Trabajo Fin de Máster, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/56750>
- SILVA-ESPINOZA, M. A., AYED, C., FOSTER, T., CAMACHO, M. M., & MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2020). The impact of freeze-drying conditions on the physico-chemical properties and bioactive compounds of a freeze-dried orange puree. *Foods*, 9(1), 13–20. <https://doi.org/10.3390/foods9010032>
- SILVA-ESPINOZA, M. A., GARCÍA-MARTÍNEZ, E., & MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2021). Protective capacity of gum Arabic, maltodextrin, different starches, and fibers on the bioactive compounds and antioxidant activity of an orange puree (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) against freeze-drying and in vitro digestion. *Food Chemistry*, 357, 129724. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129724>
- SOUYOUL, S. A., SAUSSY, K. P., & LUPO, M. P. (2018). Nutraceuticals: A review. *Dermatology and Therapy*, 8(1), 5–16. <https://doi.org/10.1007/s13555-018-0221-x>
- STAHL, W., & SIES, H. (2007). Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. *Molecular Biotechnology*, 37(1), 26–30. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0051-z>
- STERN, D. (2005). *Desarrollo de métodos analíticos para la detección de cambios metabólicos frente a situaciones de estrés en fruta fresca* [Tesis Doctoral no publicada, Universitat Politècnica de València]. <http://hdl.handle.net/10251/1931>
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6–7), 669–675. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud*, 10(2), 41–53. <http://hdl.handle.net/10261/18042>
- TRIANA, E., LEAL, F., CAMPO, Y., & LIZCANO, H. (2014, 1 mayo). Evaluación de ensilaje a partir de dos subproductos agroindustriales (cáscara de naranja y plátano de rechazo) para alimentación de ganado bovino. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 22(31). <https://alimentos hoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/254>
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). (2019). *Orange peel, raw*. Agricultural Research Service. <https://ndb.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/169103/nutrients>
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (2011). *National nutrient 539 database for standard reference*. Agricultural Research Service. <https://fdc.nal.usda.gov/>
- VALENZUELA, P. D. (2015). *Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de fenoles totales y flavonoides de hojas de diferentes genotipos de Ugni molinae Turcz* [Tesis Pregrado, Universidad de Chile]. <http://repositorio.uchile.cl/handle>
- VEGA, A., AMPUERO, N., DÍAZ, L., & LEMUS, R. (2005). El aloe vera (*Aloe barbadensis* miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista chilena de nutrición*, 32(3). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182005000300005>

- VITALE, A. A., BERNATENE, E. A., & POMILIO, A. B. (2010). Carotenoides en quimioprevención: Licopeno. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44(2). <http://www.natruzeutia.com/wp-content/uploads/2015/06/Carotenoides-y-quimioprevencion.pdf>
- WAGNER, L. A., & WARTHESEN, J. J. (1995). Stability of spray-dried encapsulated carrot carotenes. *Journal of Food Science*, 60(5), 1048–1053. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb06290.x>
- WINSLOW, T. (2019). *Anatomía del aparato digestivo* [Medical Illustration]. <https://visualsonline.cancer.gov/details.cfm?imageid=12232>
- XU, G., LIU, D., CHEN, J., YE, X., MA, Y., & SHI, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106(2), 545–551. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.06.046>
- ZAMORA, J. D. (2007). Antioxidantes: Micronutrientes en lucha por la salud. *Revista chilena de nutrición*, 34(1). <https://doi.org/10.4067/s0717-75182007000100002>
- ZOU, Z., XI, W., HU, Y., NIE, C., & ZHOU, Z. (2016). Antioxidant activity of Citrus fruits. *Food Chemistry*, 196, 885–896. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.072>