



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica
i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE LIOFILIZACIÓN EN LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ZUMO DE NARANJA Y SU COPRODUCTO.

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Curso académico 2020-2021

Valencia, julio 2021

Autora: Lacuesta Martínez, Sheila

Tutora: García Martínez, Eva

EFFECTO DE LA TEMPERATURA DE LIOFILIZACIÓN EN LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ZUMO DE NARANJA Y SU COPRODUCTO.

Valencia, julio 2021

Resumen

En el proceso de obtención de zumo de naranja se genera un gran volumen de residuos que tienen un contenido abundante en compuestos fitoquímicos con propiedades antioxidantes. Su preciada composición justificaría el interés en su reintroducción en la cadena alimentaria humana para la producción de alimentos funcionales, lo que mejoraría la eficiencia de este tipo de industrias fomentando una economía circular al convertir los residuos en recursos. En este trabajo se utilizó la técnica de liofilización para la deshidratación de zumo de naranja y su coproducto para la obtención de productos de alta calidad que podrían ser utilizados como extractos de compuestos bioactivos y/o como ingredientes. Además, se varió la temperatura de bandeja del liofilizador (30°C y 50°C), para estudiar la influencia del proceso, y se incorporaron biopolímeros naturales (goma arábica y fibra de bambú) como posibles estabilizadores físicos y químicos. Para el estudio, se analizó, antes y después de la liofilización, el contenido en la vitamina C, el ácido L-ascórbico, ácido dehidroascórbico, carotenoides (β -caroteno) y compuestos fenólicos totales. También se analizó la actividad antioxidante y se estudió su bioaccesibilidad tras la digestión *in vitro* de las muestras. Los resultados mostraron que el coproducto del zumo de naranja presentó mayor cantidad de compuestos bioactivos: vitamina C (principalmente en forma de ácido dehidroascórbico), β -caroteno y fenoles totales, y mayor actividad antioxidante que el zumo. Las condiciones de liofilización afectaron a la estabilidad de los compuestos bioactivos y a su bioaccesibilidad. En general, se produjo un descenso en la cantidad de fenoles totales, carotenoides y en la actividad antioxidante, siendo este descenso mayor en las muestras liofilizadas a 50°C que a 30°C. La adición de biopolímeros al coproducto, no supuso ningún cambio significativo respecto a la cantidad de compuestos bioactivos y actividad antioxidante del mismo.

Finalmente, tras las digestiones *in vitro*, el zumo de naranja formulado con biopolímeros presentó mayor bioaccesibilidad en todos los compuestos bioactivos estudiados que el coproducto.

Palabras Clave: Zumo de naranja, coproducto, biopolímeros, compuestos bioactivos, liofilización, bioaccesibilidad.

Autora: Lacuesta Martínez, Sheila

Tutora: García Martínez, Eva

EFFECT OF LYOPHILIZATION TEMPERATURE ON THE BIOACTIVE COMPONENTS AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF THE ORANGE JUICE AND THE ORANGE JUICE CO-PRODUCT

Valencia, July 2021

Abstract

In the process of obtaining orange juice, a large volume of waste is generated, and it has an abundant content of phytochemical compound with antioxidant properties. That composition would justify the interest in its reintroduction into the human food chain for the production of functional foods, which would improve the efficiency of this type of industries by promoting circular economy, converting waste into resources. In this matter, it must be taken into account that the fruits and also the co-products from de processing industry have a high-water content that makes them highly perishable, so some type of processing is necessary that allows their stabilization with techniques that minimize the loss of nutritive bioactive compounds. In this study, the lyophilization technique was used to dehydrate orange juice and its co-product to obtain high-quality products that could be used as extracts of bioactive compounds and/or as ingredients. In addition, the freeze-dryer tray temperature was varied (30°C and 50°C), to study the influence of the process, and natural biopolymers (gum Arabic and bamboo fibre) were incorporated as possible physical and chemical stabilizers. For the study, the content of vitamin C, L-ascorbic acid, dehydroascorbic acid, carotenoids (β -carotene) and total phenolic compounds were analysed before and after lyophilization. The antioxidant activity was also analysed and its bioaccessibility was studied after the in vitro digestions of the samples. After carrying out the analyses, a there was higher quantity of bioactive compounds in the co-product compared to that of the juice, presenting a higher antioxidant activity. Lyophilization of the samples at 30°C maintained more effectively the number of bioactive compounds, compared to lyophilization at 50°C. The addition of biopolymers had no effect on this preservation of bioactive compounds. Finally, after in vitro digestions, the bioaccessibility of the bioactive compounds was very low, especially in the lyophilized samples, because they are compounds sensitive to light, pH, temperature and the presence of digestive enzymes. Therefore, the co-product of orange juice lyophilized at 30°C, without the need for the addition of biopolymers, is a good option as a possible ingredient rich in bioactive compounds for food use.

Key words: Orange juice, co-product, biopolymers, bioactive compounds, lyophilization, bioaccessibility.

Author: Lacuesta Martínez, Sheila

Tutor: García Martínez, Eva

EFFECTE DE LA TEMPERATURA DE LIOFILITZACIÓ EN ELS COMPOSTOS BIOACTIUS I CAPACITAT ANTIOXIDANT DEL SUC DE TANTONJA I EL SEU COPRODUCTE

València, juliol 2021

Resum

En procés d'obtenció de suc de taronja es genera un gran volum de residus que tenen un contingut abundant en components fotoquímics amb propietats antioxidants. La seua pareguda composició justificaria l'interès en la seua reintroducció en la cadena alimentària humana per a la producció d'aliments funcionals, el que milloraria l'eficiència d'aquest tipus d'indústries fomentant una economia circular al transformar els residus en recursos. En aquest sentit, s'ha de tenir en compte que les fruites i també els coproductes provinents de la indústria de la seua transformació presenten un elevat contingut en aigua que els fa altament peribles, pel que es fa necessari algun tipus de processat que permeti la seua estabilització amb tècniques que minimitzen la pèrdua de components nutritius i bioactius. En aquest treball es va utilitzar la tècnica de la liofilització per a la deshidratació del suc de taronja i el seu coproducte per a l'obtenció de productes d'alta qualitat que podrien ser utilitzats com extractes de components bioactius i/o com ingredients. A més, es va variar la temperatura de bandeja del liofilitzador (30°C i 50°C), per a estudiar la influència del procés, i es van incorporar biopolímers naturals (goma aràbiga i fibra de bambú) com a possibles estabilitzadors físics i químics. Per a l'estudi, es va analitzar, abans i després de la liofilització, el contingut en vitamina C, l'àcid L-ascòrbic, àcid deshidroascòrbic, carotenoides (β -carotè) i compostos fenòlics totals. També es va analitzar la activitat antioxidant i es va estudiar la seua bioaccessibilitat després de la digestió *in vitro* de les mostres. Després de la realització dels anàlisis, es va obtenir una quantitat major de components bioactius en el coproducte respecte a la del suc, presentant així una major activitat antioxidant. La liofilització de les mostres a 30°C va mantenir de forma més efectiva la quantitat de components bioactius, en comparació amb la liofilització a 50°C. L'addició de biopolímers no va tenir un gran efecte en aquesta conservació dels components bioactius. Finalment, després de les digestions *in vitro*, la bioaccessibilitat dels components bioactius va ser molt baixa, sobre tot en les mostres liofilitzades, donat que es tracta de components sensibles a la llum, el pH, la temperatura i la presència d'enzims digestius. Per tot, el coproducte del suc de taronja liofilitzat a 30°C, sense necessitat de l'addició de biopolímers, suposa una bona opció com a possible ingredient ric en components bioactius per a ús alimentari.

Paraules Clau: Suc de taronja, coproducte, biopolímers, components bioactius, liofilització, bioaccessibilitat

Autora: Lacuesta Martínez, Sheila

Tutora: García Martínez, Eva

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. COPRODUCTO DEL ZUMO DE NARANJA	8
1.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA NARANJA	10
1.2.1. VITAMINA C	11
1.2.2. CAROTENOIDES	12
1.2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS	12
1.2.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	13
1.3. BIOPOLÍMEROS	14
1.3.1. GOMA ARÁBIGA	14
1.3.2. FIBRA DE BAMBÚ	14
1.4. LIOFILIZACIÓN	15
1.5. DIGESTIÓN	17
2. OBJETIVO	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. MATERIA PRIMA	18
3.2. MÉTODOS	19
3.2.1. PROCESADO DE MATERIA PRIMA	19
3.2.2. DIGESTIONES <i>IN VITRO</i>	20
3.2.2.1. CÁLCULO DE LA BIOACCESIBILIDAD	21
3.2.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	21
3.2.3.1. ANÁLISIS DE HUMEDAD	21
3.2.3.2. ANÁLISIS DE VITAMINA C	21
3.2.3.2.1. DETERMINACIÓN DE AA (Ácido ascórbico)	21
3.2.3.2.2. DETERMINACIÓN DE VITAMINA C	22
3.2.3.2.3. DETERMINACIÓN DE DHAA (Ácido dehidroascórbico)	22
3.2.3.3. ANÁLISIS DE CAROTENOIDES	22
3.2.3.4. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENOLICOS TOTALES	22
3.2.3.5. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	23
3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
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	24
4.2. DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS Y BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS	29
5. CONCLUSIÓN	32
6. BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Miles de toneladas de cítricos consumidos en Europa (Statista, 2021).....	8
Figura 2. Diagrama de flujo de la obtención del zumo de naranja de forma industrial modificada. (Pérez, 2005).....	9
Figura 3. Algunos de los compuestos bioactivos que se pueden encontrar en los alimentos, según su naturaleza química (Gómez, 2010).....	11
Figura 4. Estructura química de la vitamina C: ácido L-ascórbico (AA= y ácido L-dehidroascórbico (DHAA) (Escudero, 2014).....	11
Figura 5. Estructura básica de los principales carotenoides, de las que derivan las estructuras del resto de carotenoides (Sanchez et al., 1999).....	12
Figura 6. Estructura básica de la que derivan las diversas estructuras de los compuestos fenólicos (Gómez, 2010).....	13
Figura 7. Disposición de las fibras de bambú en las paredes celulares de las células de la caña de bambú. (Liu et al; 2012)	15
Figura 8. Diagrama de fases para el agua pura que explica la sublimación del hielo (Armijo et al., 2008).....	15
Figura 9. Diagrama de las fases de los órganos implicados en cada una de las fases de la digestión modificado (Cascales, 2014).....	17
Figura 10. Productos obtenidos a partir de la naranja.....	19
Figura 11. Resultados de la cantidad (mg) de VC por cada 100g FF, en las distintas muestras.....	25
Figura 12. Resultado del análisis de la cantidad (mg) de β -caroteno por cada 100g FF, en las distintas muestras.....	26
Figura 13. Resultados del análisis de la cantidad (mg) de Compuestos fenólicos totales por cada 100g FF, en las distintas muestras.....	27
Figura 14. Resultados cantidad de la actividad antioxidante (mmol Trolox/100g FF) en cada una de las muestras analizadas mediante el método FRAP.....	28
Figura 15. Resultados cantidad de la actividad antioxidante (mmol Trolox/100g FF) en cada una de las muestras analizadas mediante el método DPPH.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición nutricional del zumo de naranja (Escudero, 2014).....	8
Tabla 2. Valor nutricional de la piel de la naranja por cada 100g de piel de naranja (USDA, 2020).....	10
Tabla 3. Cantidad (mg) de flavonoides predominantes en la naranja por cada g de naranja (Tenorio, 2016).....	13
Tabla 4. Condiciones de liofilización aplicadas a las distintas muestras.....	19
Tabla 5. Nomenclatura utilizada para cada muestra obtenida.....	20
Tabla 6. Resultados (Valores medios \pm desviación estándar) del porcentaje de humedad (g agua/ 100g muestra) en cada una de las muestras analizadas.....	24
Tabla 7. Resultados (Valores medios \pm desviación estándar) de los análisis de los digestos obtenidos en las digestiones <i>in vitro</i> (mg/100g FF).....	30
Tabla 8. Resultados (Valores medios \pm desviación estándar) de la actividad antioxidante de los digestos obtenidos en las digestiones <i>in vitro</i> (mmol Trolox/100g FF).....	31
Tabla 9. Bioaccesibilidad (%) de los compuestos bioactivos de las muestras.....	31
Tabla 10. Estimación del % de la actividad antioxidante proporcionada por las muestras tras las digestiones <i>in vitro</i>	31

1. INTRODUCCION

1.1. COPRODUCTO DEL ZUMO DE NARANJA

Las naranjas son una rica fuente de compuestos bioactivos y antioxidantes con reconocidos beneficios para el ser humano, como ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y carotenoides (Sicari et al., 2017). La Tabla 1 muestra la composición nutricional del zumo de naranja.

Tabla 1. Composición nutricional del zumo de naranja (Escudero, 2014).

Composición	Por cada 100mL de zumo	
Energía	45	kCal
Carbohidratos totales	10,4	g
Proteínas	0,7	g
Lípidos totales	0,2	g
Fibra	0,2	g
Potasio	200	mg
Calcio	11	mg
Sodio	1	mg
Magnesio	11	mg
Vitamina C	50	mg
Folato	30	µg

A nivel mundial, el zumo de naranja es el zumo de frutas de mayor consumo, suponiendo un tercio del total de los zumos del mercado mundial. En Europa constituye la preferencia de consumo, y en Estados Unidos es el zumo más consumido por habitante, siendo su consumo 5 veces superior al del zumo de manzana (Escudero, 2014).

A nivel europeo, la naranja es el cítrico más consumido, según muestra la Figura 1:

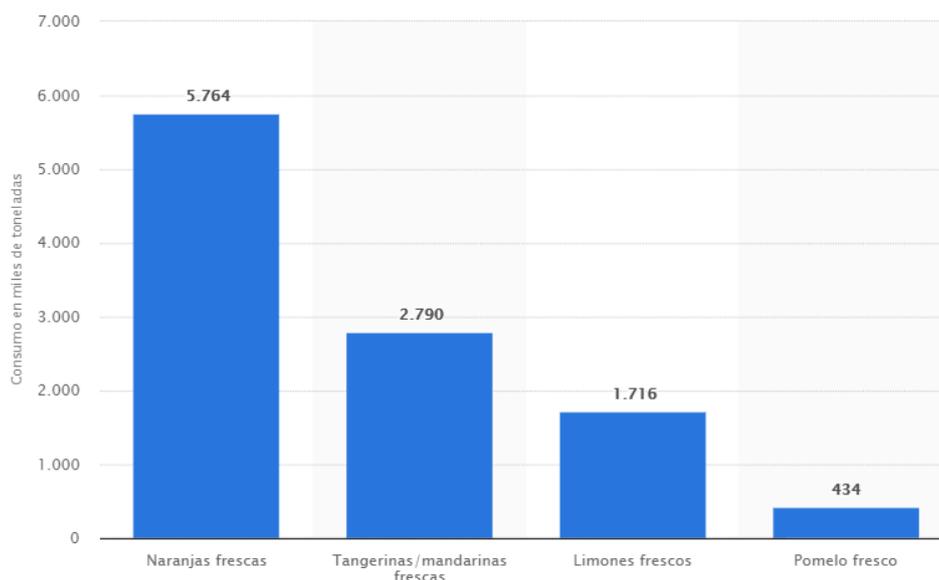


Figura 1. Miles de toneladas de cítricos consumidos en Europa (Statista, 2021)

En 2019 la producción mundial de naranjas fue de 78.699.604 toneladas de naranja, 3.226.870 de las cuales procedían de España. Además, según FAO (2020) en 2018 se produjeron, solo en

España, 257.161 toneladas de zumo de naranja (FAO, 2020). Es por ello que se producen toneladas de coproducto en la industria del zumo de naranja.

En la Figura 2, se muestra el diagrama de flujo del proceso de producción de zumo de naranja a nivel industrial y las vertientes de residuos del proceso.

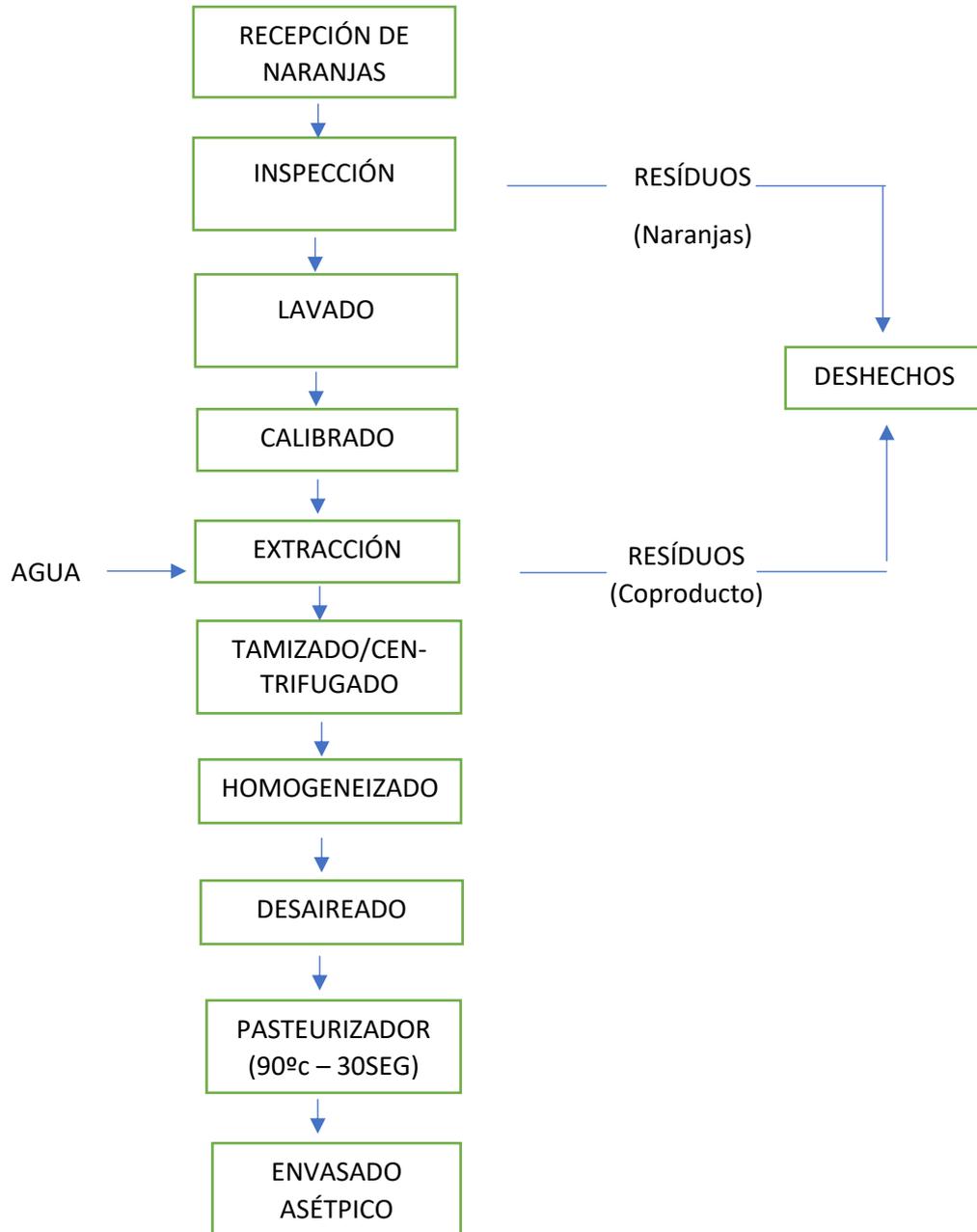


Figura 2. Diagrama de flujo de la obtención del zumo de naranja de forma industrial (Pérez, 2005).

En el diagrama de flujo observamos que, tras la recepción de las naranjas, al realizar la inspección de estas se desechan las que no cumplen los parámetros fijados para la producción de zumo de naranja de calidad. Este residuo, se suma al del coproducto del zumo de naranja en el paso de la extracción, en el que se extrae el zumo y se desecha la piel de la naranja.

Esta gran cantidad de toneladas de zumo de naranja, producen al mismo tiempo una gran cantidad de coproducto (la piel de la naranja), que a su vez conforman una gran cantidad de residuos y, con ello, un alto desperdicio alimentario. Este coproducto podría tener usos alternativos en la industria alimentaria, como la recuperación de sustancias bioactivas y su ampliación como ingredientes funcionales; reduciendo así este alto nivel de desperdicio alimentario, ya que; como se muestra en la Tabla 2, tiene unos valores nutricionales de alto interés biológico.

Tabla 2. Valor nutricional de la piel de la naranja por cada 100g de piel de naranja (USDA, 2020)

Compuesto	Cantidad	Compuesto	Cantidad
Agua	72,5 g	Magnesio	22 mg
Energía	97 kcal	Fósforo	21 mg
Energía	405 kj	Postasio	212 mg
Proteínas	1,5 g	Sodio	3 mg
Grasas	0,2 g	Zinc	0,25 mg
Ác. Grasos saturados	0,024 g	Cobre	0,092 mg
Ác. Mirístico	0,001 g	Selenio,	1 µg
Ác. Palmítico	0,021 g	Vit. C	136 mg
Ác. Esteárico	0,001 g	Tiamina	0,12 mg
Ác. Grasos monoinsat.	0,036 g	Riboflavina	0,09 mg
Ác. Palmitoleico	0,005 g	Niacina	0,9 mg
Ác. Vaccénico	0,032 g	Ác. Pantoténico	0,49 mg
Ác. Grasos poliinsat.	0,04 g	Vit. B-6	0,176 mg
Ác. Linoleico	0,029 g	Folato	30 mg
Ác. Linolénico	0,011 g	Ác. Fólico	0 µg
Colesterol	0 mg		
Cenizas	0,8 g		
Carbohidratos	25 g	Vit. A	21 µg
Fibra Total	10,6 g		
Calcio	161 mg	Vit. B-12	0 µg
Hierro	0,8 mg	Vit. E (alfa-tocoferol)	0,25 mg

Respecto a los compuestos bioactivos en la composición de la cáscara de la naranja, observamos una gran concentración de flavonoides (Martínez-Flórez et al., 2002) y compuestos fenólicos (Escobedo – Avellaneda et al., 2013), que presentan una gran actividad antioxidante beneficiosa para la salud humana (Higdon, 2005). Este alto contenido en compuestos bioactivos hace de interés la cáscara de la naranja para la formulación de nuevos alimentos.

1.2. COMPUESTOS BIOACTIVOS DE LA NARANJA

Los alimentos están compuestos por un gran número de sustancias que se clasifican principalmente en tres tipos: nutrientes, compuestos indeseables o antinutricionales y compuestos bioactivos o fitoquímicos (que pueden ser nutrientes, o compuestos que confieren características sensoriales) (FAO, 2021). En la Figura 3, se muestra una clasificación general de los compuestos bioactivos.

Como ya se ha comentado, la naranja es una fruta cítrica rica en compuestos bioactivos. Los más característicos son la vitamina C, los compuestos fenólicos, los pigmentos carotenoides, y las antocianinas, que a continuación pasamos a detallar.

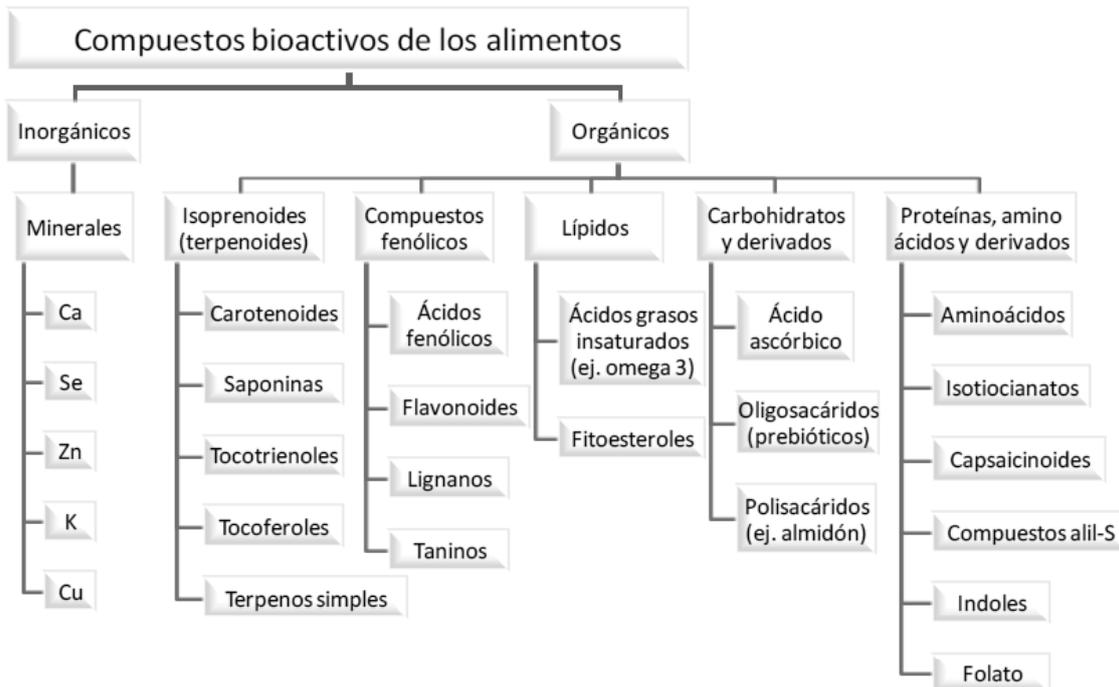


Figura 3. Algunos de los compuestos bioactivos que se pueden encontrar en los alimentos, según su naturaleza química (Gómez, 2010)

1.2.1. VITAMINA C

La vitamina C es un compuesto sensible a la luz y a las altas temperaturas (Blasco et al, 2014) que se oxida rápidamente en presencia de iones metálicos, álcalis y enzimas oxidativas. La cantidad total de vitamina C es la suma del ácido L-ascórbico (AA) y de su forma oxidada, el ácido L-dehidroascórbico (DHAA), cuyas estructuras se muestra en la Figura 4 (Escudero, 2014).

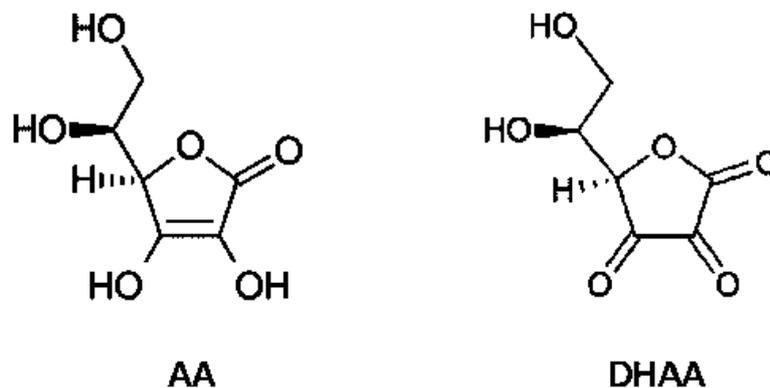


Figura 4. Estructura química de la vitamina C: ácido L-ascórbico (AA) y ácido L-dehidroascórbico (DHAA) (Escudero, 2014).

La vitamina C presenta numerosas funciones en el organismo basadas en sus propiedades oxido-reducción, lo que le confiere una gran actividad antioxidante, ejerciendo un papel protector en el organismo frente a los radicales libres (Agudo et al., 2007).

Como se observa en la composición nutricional del zumo de naranja de la Tabla 1, el zumo de naranja presenta 50 mg de Vitamina C por cada 100 mL de zumo y en coproducto del zumo (Tabla 2) la cantidad es de 136 mg/100g de coproducto.

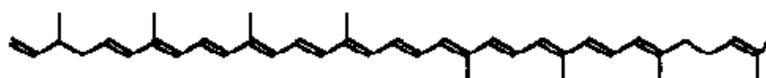
1.2.1. CAROTENOIDES

Los carotenoides son pigmentos ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal, donde desempeñan diversas funciones (Fraser y Bramley, 2004)

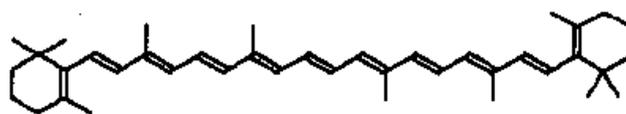
A nivel de estructura química, los carotenoides son hidrocarburos poliénicos sintetizados a partir de 8 unidades de isopreno, y se pueden dividir en dos grupos:

- Carotenos: Son hidrocarburos (ejemplo: beta-caroteno)
- Xantofilas: Contienen al menos un grupo oxígeno (en forma de hidroxilo, epóxido, carbonilo o carboxilo) (Escudero, 2014).

En la Figura 5 se representa la estructura básica del Licopeno y el β -caroteno.



Licopeno



β -Caroteno

Figura 5. Estructura básica de los principales carotenoides, de las que derivan las estructuras del resto de carotenoides (Sanchez et al., 1999)

Están científicamente demostrados los beneficios de la ingesta de carotenoides para la salud humana, ya que algunos de ellos pueden transformarse en vitamina A, la deficiencia de la cual ha sido un problema a nivel mundial, especialmente en niños. Además, se ha demostrado que los carotenoides ejercen protección contra serias enfermedades degenerativas y cardiovasculares. Es por todos estos motivos por los que resulta interesante la ingesta de carotenoides, en especial de beta-caroteno (Sanchez et al., 1999).

En la naranja, los carotenoides se localizan principalmente en el epicarpio (corteza o piel), aunque el zumo de naranja también constituye una fuente rica de carotenoides (Escudero, 2014).

Los carotenoides más abundantes en la naranja y en su zumo (y los responsables de su color característico) son los derivados de la provitamina A (beta-caroteno, alfa caroteno, y beta-criptoxantina), así como otros como la zeaxantina y la luteína (Sánchez et al., 2003).

1.2.3. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por los vegetales en su desarrollo normal. Por lo general, las capas más externas contienen mayor cantidad de compuestos fenólicos que las externas. Los compuestos fenólicos más insolubles se encuentran en las paredes celulares; y lo más solubles se encuentran en las vacuolas (Naczka et al., 2006).

En el hombre, se ha demostrado la relación entre un consumo elevado de compuestos fenólicos y sus efectos positivos para la salud, debido a sus propiedades antioxidantes (Martínez – Flórez et al., 2002).

El término compuesto fenólico engloba a más de 8000 compuestos con una gran diversidad estructural, aunque todos ellos poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Bravo, 1998). La Figura 6 muestra la estructura básica de la que derivan las estructuras de los compuestos fenólicos.

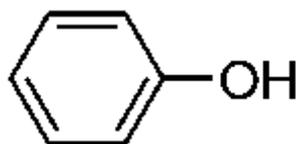


Figura 6. Estructura básica de la que derivan las diversas estructuras de los compuestos fenólicos (Gómez, 2010)

La naranja contiene una variedad de compuestos fenólicos, destacando los flavonoides, que abundan notablemente en la piel, y los ácidos hidroxicinámicos (Nakajima et al., 2014) En la Tabla 3 se muestra la concentración de flavonoides en la naranja.

Tabla 3. Cantidad (mg) de flavonoides predominantes en la naranja por cada g de naranja (Tenorio, 2016).

Flavonoides	mg/g naranja
Naringina	49,94
Herperidina	10,72
Neohesperidina	2,45
Rutina	0,84
Quercetina	0,05
Kaempferol	0,16
Lutolina	0,31
TOTAL FLAVONOIDES	64,47

Podemos observar la abundancia de naringina y herperidina, y una cantidad de 64,47 mg de flavonoides totales por cada gramo de naranja, lo que supone una alta ingesta de compuestos fenólicos con el consumo de naranja.

1.2.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los antioxidantes son sustancias que disminuyen o retardan las reacciones de oxidación de diferentes sustratos y pueden ser naturales o sintéticos (Fuchs; 1998). Los productos vegetales son una fuente de antioxidantes, ya que poseen una gran variedad de compuestos como: antocianos, flavonoides, carotenoides, y ácido ascórbico entre otros, que pueden ser beneficiosos para la salud y que, además, actúan en bajas concentraciones (Rojano et al., 2008)

Los altos contenidos de vitamina C, carotenoides y compuestos fenólicos, dotan al zumo de naranja de una gran actividad antioxidante; dado que cada uno de los compuestos bioactivos realiza un tipo de acción antioxidante distinta en nuestro organismo (Chapin, 2021):

- La vitamina C evita la propagación de nitrosaminas cancerígenas y neutraliza productos químicos mutagénicos tanto endógenos como exógenos (Valdés, 2006).
- Los carotenoides inactivan las moléculas que se encuentran en estado de excitación electrónica, y su principal actividad es la fotoprotección en reacciones fotosensibles y fotoprotección de tejidos (Carranco et al., 2011).
- Los compuestos fenólicos, por otra parte, tienen la capacidad de captar radicales libres y actuar como quelantes de metales (Gimeno, 2004).

1.3. BIOPOLÍMEROS

Un biopolímero se puede definir como un compuesto de alto peso molecular, conformado por unidades repetitivas de monómeros (Cobos de Rangel et al., 2017).

El desarrollo y descubrimiento de nuevos biopolímeros, así como las nuevas tecnologías de síntesis, purificación y modificación, han permitido grandes avances en la encapsulación de principios activos. Algunos polímeros han recibido la denominación de “inteligentes” por su rápida respuesta frente a modificaciones de las condiciones fisicoquímicas ambientales, que involucran cambios pronunciados en algunas de sus propiedades. Es por ello que algunos se utilizan para encapsular los compuestos bioactivos de los alimentos y protegerlos frente al procesado (Cacicedo, 2011).

Los biopolímeros que utilizamos en este trabajo fueron: la goma arábica para la encapsulación de los compuestos bioactivos y la fibra de bambú para estabilizar el producto y aumentar el contenido en fibra.

1.3.1. GOMA ARÁBIGA

La goma arábica (GA) es una goma natural, procedente de la exudación gomosa seca obtenida de varias especies de árboles de Acacia de la familia de las leguminosas (García, 1998).

La estructura química de la GA se compone de un complejo polisacárido que contiene pequeñas cantidades de material nitrogenado. Por esta razón, se ha denominado la GA como complejo proteico-arabinogalactano. Por sus características estructurales presenta un carácter amfifílico, lo que le permite absorber en superficies lipofílicas, actuar como coloide protector y, por lo tanto, como agente formador de películas. (Yadav et al., 2007). Es por ello que la GA es uno de los materiales formadores de películas más efectivos para microencapsular (Kanakdande et al., 2007).

Entre sus propiedades tecnológicas destaca que es altamente hidrosoluble y su viscosidad es relativamente baja respecto a la de otras gomas. Además, la goma arábica presenta propiedades prebióticas. En la industria alimentaria, es un aditivo cuyas funciones principales son: estabilizante, espesante y emulsificante; siendo la más importante esta última. Las concentraciones de goma arábica utilizadas en la industria varían dependiendo del producto elaborado, y pueden ir desde un 2-6% en bebidas, hasta un 45-50% en confitería (Alcocer, 2019).

1.3.2. FIBRA DE BAMBÚ

Entre las fibras naturales provenientes de plantas destaca la fibra de bambú, debido a su rápida tasa de crecimiento y universalidad. La fibra de bambú se ha utilizado durante mucho tiempo para fines de construcción, así como para la industria del papel.

La fibra de bambú se distribuye por el interior de los haces vasculares de la caña del bambú.

Se ha propuesto una estructura jerárquica de fibra de bambú, compuesta de diferentes longitudes de fibra de celulosa. Diminutas fibras cortas en forma de huso, afiladas en ambos extremos, que se intercalan longitudinalmente entre sí a lo largo de la caña de bambú. La laminación consiste en alternar capas de microfibras con diferente orientación (Liu et al., 2012).

Estas microfibras se alternan en capas de diferente orientación en la pared celular de las células de la caña de bambú, y se estabilizan mediante pectinas y moléculas de glicano; como se muestra en la Figura 7.

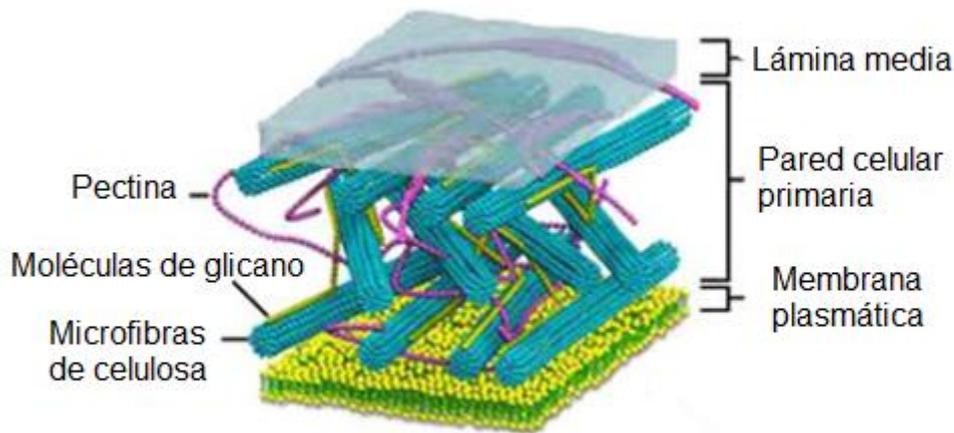


Figura 7. Disposición de las fibras de bambú en las paredes celulares de las células de la caña de bambú (Liu et al., 2012).

1.4. LIOFILIZACIÓN

La liofilización es una operación unitaria por la cual, el agua congelada de un alimento pasa directamente del estado sólido al estado vapor, bajo una presión alta de vacío (Rodríguez, 2005). Para conseguir este cambio de estado, se precisa de una disminución de la presión para que, como se muestra en la figura siguiente, al aumentar la temperatura, el hielo sublima y no se derrita (Figura 8).

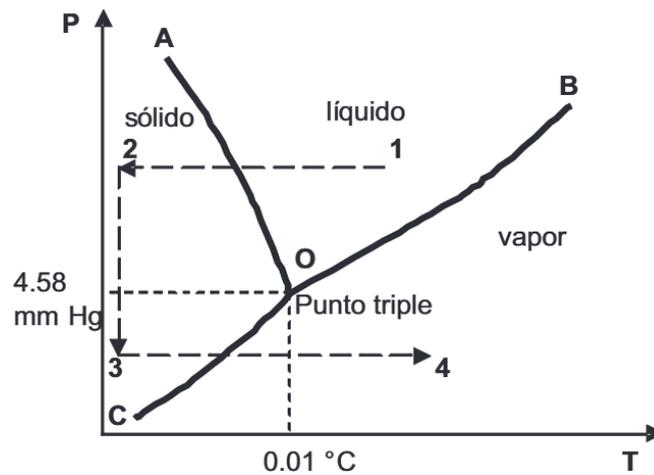


Figura 8. Diagrama de fases para el agua pura que explica la sublimación del hielo (Armijo et al., 2008).

En el diagrama de la Figura 8 aparece el punto triple, que es el punto teórico en el que se reúnen las condiciones que permiten que el agua se encuentre en los tres estados: líquido, sólido y vapor. A presiones superiores a 4,58mmHg (como es la presión ambiente, 760mmHg), al aumentar la temperatura del agua en estado sólido, ésta necesita pasar por el estado líquido antes de llegar a la temperatura necesaria para llegar al estado vapor. En presiones inferiores a 4,58mmHg, al aumentar la temperatura del agua en estado sólido, esta cambia a estado vapor directamente, y no es necesario un gran aumento de la temperatura, ya que este cambio se produce a partir de 0,01°C de temperatura; como ocurre en el proceso de liofilización.

El objetivo de este proceso es lograr una reducción de la actividad del agua (a_w), ralentizándose como consecuencia los procesos de deterioro a los que se ve sometido un alimento (Barbosa Cánovas et al., 2006)

La liofilización es un método de conservación de alimentos en el que confluyen tres 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, para posteriormente pasar al secado secundario, aumentando la temperatura para evaporar el agua fuertemente ligada (Barbosa-Cánovas et al., 2006). El resultado es un producto seco, pero con todas las características organolépticas de su estado original, como el aroma, el gusto o el sabor. Alimentos "instantáneos" como frutas finas, sopas, café o comidas que utilizan los astronautas en las misiones espaciales son algunos de los productos que se liofilizan. Este proceso facilita su conservación y ayuda a detener el crecimiento de patógenos, puesto que el resultado es un alimento de menos peso (Chavarrías, 2010).

Los productos liofilizados presentan una humedad residual muy baja y, por tanto, el riesgo de deterioro químico, bioquímico o microbiológico es mínimo. Además, el hecho de que el proceso pueda realizarse a bajas temperaturas hace que los compuestos termolábiles se conserven en gran medida. Por su parte, el vacío hace que el peligro de oxidación del producto sea nulo. Además, la sublimación del hielo da lugar a la obtención de un producto poroso que permite una rehidratación o reconstitución rápida y eficaz (Ratti, 2013).

1.5. DIGESTIONES

La digestión es el proceso de transformación de los nutrientes, previamente ingeridos, en sustancias más sencillas y fáciles de absorber. En este proceso de transformación de los nutrientes participan diferentes tipos de enzimas.

En la Figura 9 se muestra un diagrama de los órganos del sistema digestivo implicados en el proceso de la digestión humana.

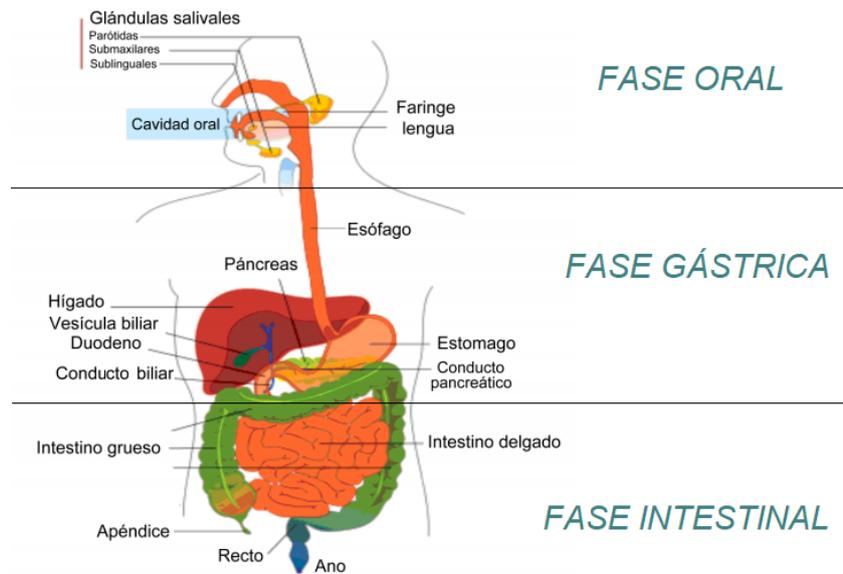


Figura 9. Diagrama de las fases de los órganos implicados en cada una de las fases de la digestión (Cascales, 2014).

La digestión comienza en la boca con la masticación, la cual, no sólo disgrega los alimentos en pequeñas partículas mezclándolas con la saliva y enzimas, sino también actúa enviando un mensaje señalizador al organismo para que se prepare para comenzar el proceso digestivo. La saliva, segregada por las glándulas salivales, se mezcla con el alimento facilitando la masticación. La saliva, además, contiene enzimas que comienzan la degradación del almidón y de las grasas. Por ejemplo, la digestión de los carbohidratos comienza con la enzima salival alfa amilasa.

El esófago es un conducto o músculo membranoso, de aproximadamente de unos 30-35 cm de longitud, que recoge el bolo alimenticio tras la fase bucofaríngea de la deglución.

El estómago se localiza entre el esófago (proximalmente) y el duodeno (distalmente). Es una cavidad amplia. Existen diferentes tipos de células que participan en la secreción del jugo gástrico constituido principalmente por agua, mucina, ácido clorhídrico y pepsina. Los componentes del jugo gástrico son los responsables de la primera degradación que van a sufrir los nutrientes incluidos en el bolo alimenticio.

En el intestino delgado tiene lugar la verdadera digestión de los alimentos en componentes elementales aptos para su absorción, y para ello es fundamental la participación de la bilis, el jugo pancreático, que contiene la amilasa, lipasa y tripsina, y el propio jugo intestinal secretado por las células intestinales. Una vez que los alimentos se han escindido en sus componentes elementales, van a ser absorbidos principalmente en el yeyuno.

El intestino delgado se extiende desde el estómago hasta el colon. Es un conducto de 6 a 8 m de longitud, constituido por tres tramos: duodeno, yeyuno e íleon y está específicamente diseñado para la absorción de la mayoría de los nutrientes

Al final del transporte a través del intestino delgado, han sido absorbidas alrededor del 90% de las sustancias del quimo, vitaminas, minerales y la mayoría de los nutrientes. Además, unos 10 litros de fluido se absorben cada día en el intestino delgado (Cascales y Doadrio et al., 2014).

Los ensayos de digestión *in vitro* simulan las condiciones fisiológicas de la digestión in vivo. Son, por lo tanto, valiosas herramientas para el estudio y comprensión de los cambios, interacciones, así como de la biodisponibilidad y bioaccesibilidad de los nutrientes. La digestión *in vitro* se fundamenta en los conocimientos actuales de la fisiología humana sobre el funcionamiento del aparato digestivo. Estos conocimientos son extrapolados a las condiciones del laboratorio, proporcionando los protocolos pertinentes para llevar a cabo los ensayos de digestión *in vitro* (Lucas, 2016).

2. OBJETIVO

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 de alta calidad y estable. El objetivo general del trabajo fue utilizar la técnica de la liofilización para la deshidratación del zumo de naranja y su coproducto para la obtención de productos de alta calidad que podrían ser utilizados como extractos de compuestos bioactivos y/o como ingredientes, reduciendo así el desperdicio alimentario y la cantidad de residuos de la industria del zumo de naranja.

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 zumo de naranja y su coproducto.
- Estudiar la influencia de la temperatura de liofilización (30°C y 50°C) sobre los compuestos bioactivos y la actividad antioxidante del zumo de naranja y su coproducto.
- Estudiar la influencia de la incorporación de biopolímeros naturales (goma arábica y fibra de bambú) en el coproducto como posibles estabilizadores físicos y químicos.
- Evaluar la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos tras el proceso de digestión *in vitro*, del zumo de naranja y del coproducto, antes y después de liofilizar.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA

La materia prima que utilizamos fueron naranjas de la variedad de navelinas (*Citrus x sinensis* 'Navel orange') de un supermercado de Valencia. La elección de las naranjas realizó mediante inspección visual, en base a la uniformidad y homogeneidad de tamaño, forma, color y ausencia de daños en la piel.

Los biopolímeros utilizados como antiapelmazantes y encapsulantes fueron la goma arábica (GA, Scharlab, Sentmenat, España) y la fibra de bambú (FB, VITACEL®, Rosenberg, Alemania)

3.2. MÉTODOS

3.2.1. PROCESADO DE LA MATERIA PRIMA

En la siguiente Figura 10 se esquematizan los productos obtenidos a partir de la naranja que se utilizarán en este estudio.

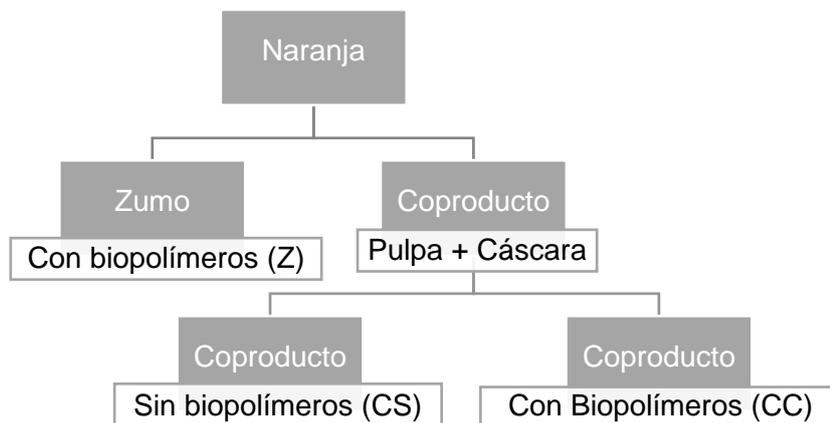


Figura 10. Productos obtenidos a partir de la naranja.

En primer lugar, se exprimieron las naranjas para obtener el zumo, y éste se separó del coproducto formado por la cáscara y la pulpa restante. Se añadieron los biopolímeros al zumo en una proporción de 5 g de GA y 1 g de FB por cada 100 g de zumo, y se homogeneizó en la Thermomix (Thermomix TM 21, Vorwek, España) durante 40 segundos a velocidad 4, y 40 segundos más a velocidad 9.

El coproducto obtenido se dividió en dos partes de masas idénticas: a una de las partes se le añadieron biopolímeros (CC) (en la misma proporción que para el zumo) y a la otra parte no (CS). En ambos casos, para facilitar el procesado se agregaron 150 mL de agua destilada por cada 500 g de coproducto. Los coproductos así formulados se homogeneizaron en un emulsionador (Eufored; España) durante 3 minutos.

De los tres productos de estudio (Z, CC y CS), se guardaron 100 g en tarros de cristal en refrigeración a 4°C (Liebherr, ProfilLine, Alemania) para realizar los correspondientes análisis que se describen en los siguientes apartados. Por último, de la cantidad restante, se aprovechó para realizar el análisis de humedad (detallado en el punto 3.2.3.1).

Obtenidas las muestras frescas control, el siguiente paso fue la liofilización. Para liofilizar tanto el zumo con biopolímeros como los coproductos (con y sin biopolímeros), se llenaron bandejas de aluminio con los productos hasta 1 cm de altura y se congelaron 2 días a -45°C (Liebherr, LGT 2325, Alemania). Finalmente, se liofilizaron (Liofilizador Telstar Lioalfa-6, España) a una presión de 0,084 mBar, a -48°C de temperatura en el condensador y dos temperaturas de bandeja diferentes (30 y 50°C, descritas en la Tabla 4).

Tabla 4. Condiciones de liofilización aplicadas a las distintas muestras.

	Temperatura de bandeja (°C)	Tiempo de liofilización (horas)
L50	50	19
L30	30	26

Al finalizar el proceso de liofilización se obtuvieron muestras en forma de torta, y estas tortas se trituraron en la Thermomix (Thermomix TM 21, Vorwek, España) durante 40 segundos a velocidad 9 para obtener las muestras en polvo. Las muestras liofilizadas en polvo se almacenaron en bolsas estilo *zip*, que a su vez se almacenaron en un desecador y en refrigeración hasta el momento de la realización de los análisis.

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 modo.

A raíz de este procesado, obtuvimos 9 muestras distintas, cuya nomenclatura se describe en la Tabla 5.

Tabla 5. Nomenclatura utilizada para cada muestra obtenida.

Nomenclatura	Muestra
Z	Zumo fresco con Biopolímeros
CC	Coproducto del zumo con Biopolímeros Fresco
CS	Coproducto del zumo sin Biopolímeros Fresco
Z L50	Zumo con Biopolímeros liofilizado a 50°C/20 h
CC L50	Coproducto del zumo con Biopolímeros liofilizado a 50°C/19h
CS L50	Coproducto del zumo sin biopolímeros liofilizado a 50°C/19h
Z L30	Zumo con Biopolímeros liofilizado a 30°C/26h
CC L30	Coproducto del zumo con Biopolímeros liofilizado a 30°C/26h
CS L30	Coproducto del zumo sin biopolímeros liofilizado a 30°C/26h

3.2.2. DIGESTIONES *IN VITRO*

Las digestiones *in vitro* realizadas constaron de tres fases diferenciadas, siguiéndose la metodología propuesta por Miller et al., (1981): Fase oral, fase gástrica y fase 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.

La **fase oral** empezó tomando en un Erlenmeyer de 250 mL la cantidad de muestra necesaria y añadiéndole 250 µL de solución α -amilasa (32,5 mg de α -amilasa por cada 25 mL CaCl_2 1 mM con el pH ajustado a 7 (Sigma Aldrich, Alemania) con NaHCO_3 0,1 N), por cada gramo de muestra. Esta mezcla se introdujo en la cámara a 37°C (estufa J.P. Selecta S.A. España) y agitación (Agitador orbital Ovan, España) constante durante 10 minutos, tal y como se ha descrito.

En la **fase gástrica**, se añadieron 0,12 g de pepsina de origen porcino (Sigma Aldrich, Alemania) y a continuación se ajustó el pH a 2 con HCl 2 M. Una vez ajustado el pH, se volvió a introducir en la cámara a 37°C, en agitación, durante 2h. Pasada media hora, se comprobó que el pH seguía alrededor de 2 y no había variado de forma significativa.

Pasadas las 2 horas de la fase gástrica, se introdujeron 20 mL del digesto en 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 NaHCO_3 0,5 N. Esta fue la primera parte de la **fase intestinal**. Se introdujeron las probetas en la cámara a 37°C en agitación, y cuando el pH llegó a

5 (alrededor de 10 minutos) se añadieron 5 mL de una solución de bilis-pancreatina preparada con 0,08 g de pancreatina (4 g/L, Sigma-Aldrich, Alemania), 0,5 g de bilis (25 g/L, Sigma-Aldrich, Alemania), 16 mL de agua destilada y 4 mL de NaHCO₃ 0,5 N. A partir de la adición de la bilis-pancreatina, se mantuvo 2 horas más a 37°C y en agitación, hasta conseguir un pH=7. Una vez conseguido este pH, se dio por finalizada la digestión, y se congeló a -45°C (Liebherr, LGT 2325, Alemania) en botes estériles el contenido del interior de las membranas para su posterior análisis. La solución obtenida del interior de la membrana representa la parte absorbida por el organismo que pasa a la sangre.

3.2.3. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

3.2.3.1. ANÁLISIS DE HUMEDAD

Para la determinación de la humedad (x_w) de las muestras frescas, se utilizó el método de secado por estufa (método 934.06 de la AOAC, 2000)

Para determinar x_w de las muestras liofilizadas se utilizó el método de valoración Karl Fisher para productos en polvo (Mettler Toledo, España).

Los resultados, en ambos procedimientos, fueron expresados en g de agua/100 g de muestra.

3.2.3.2. ANÁLISIS DE VITAMINA C

La determinación de la vitamina C (VC) se desdobló en 3 determinaciones: ácido ascórbico (AA), vitamina C y ácido dehidroascórbico (DHAA); ya que la vitamina C es la suma de la cantidad de DHAA y de su forma reducida, el AA.

3.2.3.2.1. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Se tomó la cantidad de muestra necesaria (1g de muestra fresca, 0,5g de muestra liofilizada y se le añadió 9mL de ácido oxálico 0,1%. Después de homogeneizar manualmente, se mantuvo 3 minutos en oscuridad. Se filtró en viales HPLC con filtros de nylon de 45µm, y estos se introdujeron en el equipo de HPLC (Jasco, Italia).

A continuación, se analizó el contenido en AA por HPLC según Xu et al., (2008). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: ácido oxálico 0,1% como fase móvil, flujo de 1 mL/min a 25°C, inyector de 20 µL y longitud de onda de 243 nm 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 µm, 4,6 x 25 mm (España).

El AA fue identificado por su tiempo de retención y cuantificado 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 AA/100 g de Fruta Fresca (FF)

3.2.3.2.2. DETERMINACIÓN DE VITAMINA C

Reducción del DHAA a AA: se siguió el procedimiento descrito por Sánchez-Mata et al., (2000) y Sánchez-Moreno et al., (2003). Se pesó la cantidad de muestra necesaria (0,5 g de muestra fresca, 0,075 g de muestra liofilizada) y se le añadió 2 mL de DTT 20 g/L. Se homogeneizó manualmente y se mantuvo durante 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente, agitando o removiendo constantemente para asegurar una buena reducción.

A continuación, se siguió el mismo procedimiento de cuantificación que para el AA. Los resultados se expresaron como mg de AA/100 g FF

3.2.3.2.3. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO L-DEHIDROASCÓRBICO

El DHAA se calculó a partir de la diferencia entre la cantidad de VC y la de AA.

El resultado obtenido se expresó en mg de ácido dehidroascórbico/100 g de FF.

3.2.3.3. ANÁLISIS DE CAROTENOIDES

La extracción de los carotenoides totales (CT) se realizó según metodología propuesta por Barba et al., (2006), para ello se tomó la cantidad de muestra necesaria (1 g de muestra fresca, 0,15 g de muestra liofilizada) y se le añadió 9 mL del disolvente de extracción Hexano:acetona:etanol 50:25:25. Se mantuvo 30 minutos en agitación magnética, a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasados los 30 minutos se introdujo en la centrifuga (VRW, España) durante 10 minutos a 10000rpm y 4°C. Tras extraer las muestras de la centrifuga, se tomó el sobrenadante y se le añadieron 10 mL de agua destilada por cada 100 mL de extracto. Se agitó durante 2 minutos y finalmente se cuantificaron mediante la medición de la absorbancia del sobrenadante en cubetas de vidrio de 1 mL, mediante espectrofotometría UV-Visible (Espectrofotómetro UV-visible Thermo Eletron Corporation, Estados Unidos) a una longitud de onda de 446 nm.

Se preparó la curva patrón con β -caroteno entre 0,5 ppm-50 ppm y los resultados obtenidos se expresaron en mg de β -caroteno/100 g FF.

3.2.3.4. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS 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).

Se preparó una recta patrón de ácido gálico (GAE) entre 1ppm-1000 ppm y los resultados obtenidos se expresaron en mg GAE/100 g FF.

3.2.3.5. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

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

- 1- 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 (Fe^{3+} - TPTZ) se reduce a ión ferroso a bajo pH, causando la formación de un complejo ferroso-tripiridil-triazina coloreado (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 FF, usando una curva de calibración de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) de 0-200 mg Trolox/1000g.
- 2- 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 (Molyneux, 2004). 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 FF, se necesitó calcular el porcentaje de DPPH con la Ecuación 1, y se empleó una curva de calibración de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) de 0-200 mg Trolox/1000 g.

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

Donde:

A control: Absorbancia a tiempo 0

A muestra: Absorbancia de las muestras después de 15 minutos

3.2.3.6. CÁLCULO DE LA BIOACCESIBILIDAD

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

$$\text{Bioaccesibilidad} = \frac{CD}{CSD} * 100 \quad (\text{Ec 2}).$$

Donde:

CD: Cantidad del compuesto bioactivo en la muestra digerida

CSD: Cantidad del compuesto bioactivo en la muestra sin digerir

3.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para conocer la existencia de diferencias significativas entre las diferentes muestras, se realizaron análisis de varianza simple (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% ($p < 0,05$). 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

La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos en los análisis de x_w de las diferentes muestras.

Tabla 6. Resultados (Valores medios \pm desviación estándar) del porcentaje de humedad (g agua/100g muestra) en cada una de las muestras analizadas.

	Fresco	L30	L50
Z	84,34 \pm 1,36 ^{A^X}	3,97 \pm 0,06 ^{A^Y}	2,10 \pm 0,10 ^{A^Y}
CC	77,17 \pm 0,75 ^{A^X}	1,90 \pm 0,10 ^{B^Y}	1,37 \pm 0,15 ^{B^Y}
CS	74,13 \pm 1,90 ^{B^X}	2,57 \pm 0,15 ^{B^Y}	1,90 \pm 0,20 ^{A^Y}

Z (zumo con biopolímeros), CC (coproducto con biopolímeros), CS (coproducto sin biopolímeros). Por columna, las letras A-B mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tipos de muestra. Por filas, las letras X-Y indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados a las muestras.

La muestra Z presentó unos valores de x_w de 84,34g de agua/100g, similares a los descritos por otros autores para la misma fruta (Moreiras et al., 2013). Los coproductos frescos, CC y CS, presentaron valores de x_w significativamente ($p < 0,05$) menores que el zumo. Los valores de x_w de los coproductos frescos fueron del orden de los encontrados en la bibliografía para la piel de la naranja (USDA, 2020).

Como era de esperar, la liofilización disminuyó significativamente la humedad de las tres muestras ($p < 0,05$), permitiendo obtener productos con humedades comprendidas entre 1,37 y 3,97 g/100 g dependiendo de la temperatura de bandeja y del tiempo del proceso. Estos valores son del orden de los sugeridos en bibliografía para alimentos liofilizados de calidad (Barbosa Cánovas et al., 2006).

La Figura 11 muestra los resultados obtenidos para el análisis de la vitamina C. Se observó que las muestras de zumo presentaron menos vitamina C que las de coproducto ($p < 0,05$). El ácido ascórbico fue más abundante en las muestras de zumo ($p < 0,05$), mientras que el ácido dehidroascórbico fue más abundante en las muestras de coproducto ($p < 0,05$). Similares resultados fueron observados por Ladinaya (2008) y USDA (2020). La liofilización ocasionó un ligero aumento ($p < 0,05$) en la VC de las muestras. Este aumento del contenido de 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). La adición de biopolímeros en el coproducto no resultó significativa para la cantidad de vitamina C de los mismos ($p > 0,05$).

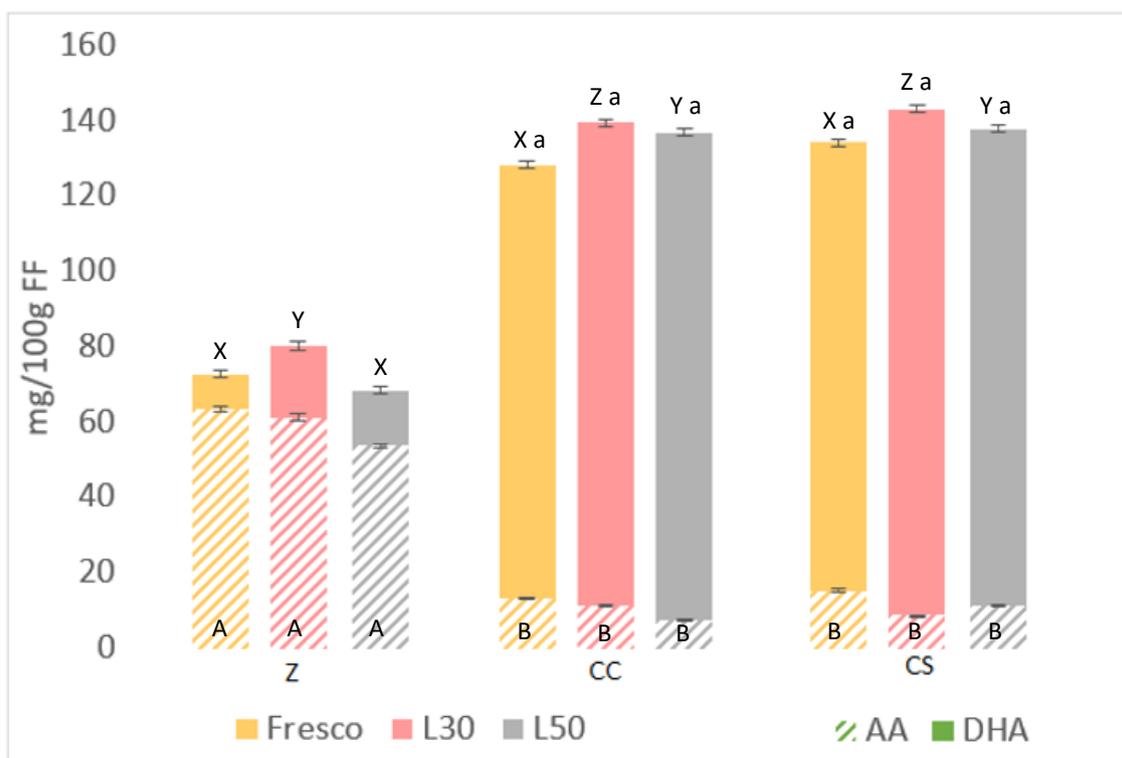


Figura 11. Resultados cantidad de vitamina C (mg/100g FF) en cada una de las muestras analizadas. Z (zumo con biopolímeros), CC (coproducto con biopolímeros), CS (coproducto sin biopolímeros). Las letras A-B mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido en vitamina C entre los tipos de muestra. Las letras X-Y-Z mayúscula indican, para cada producto, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados. Las letras a-b minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los coproductos con y sin biopolímeros.

En la Figura 12 se muestran los resultados obtenidos para el análisis del β -caroteno de las muestras estudiadas. Como era de esperar según otros estudios bibliográficos (Escudero, 2014) los coproductos mostraron mayor contenido en β -caroteno que el zumo ($p < 0,05$). La liofilización disminuyó de forma significativa el contenido en β -caroteno de las tres muestras ($p < 0,05$), resultados que coinciden con los de Yanza (2013). Destacaron las pérdidas en las muestras de zumo, en las que la liofilización disminuyó entre un 50 (L30) y un 74% (L50) la cantidad de β -caroteno. Esta disminución fue más suave en las muestras de coproducto, en las que la liofilización disminuyó entre un 14 (L30) y un 40% (L50) la cantidad de β -caroteno. Esta disminución de la cantidad de β -caroteno por la liofilización se debe a la alta inestabilidad de los compuestos carotenoides, ya que se trata de compuestos muy insaturados que se degradan fácilmente, fundamentalmente debido a los procesos oxidativos. Otros factores como la temperatura y la luz también pueden producir cambios cualitativos en estos compuestos debido a reacciones de isomerización (Meléndez-Martínez, 2004). La adición de biopolímeros en el coproducto no afectó de manera significativa ($p > 0,05$) a la cantidad de β -caroteno de los mismos.

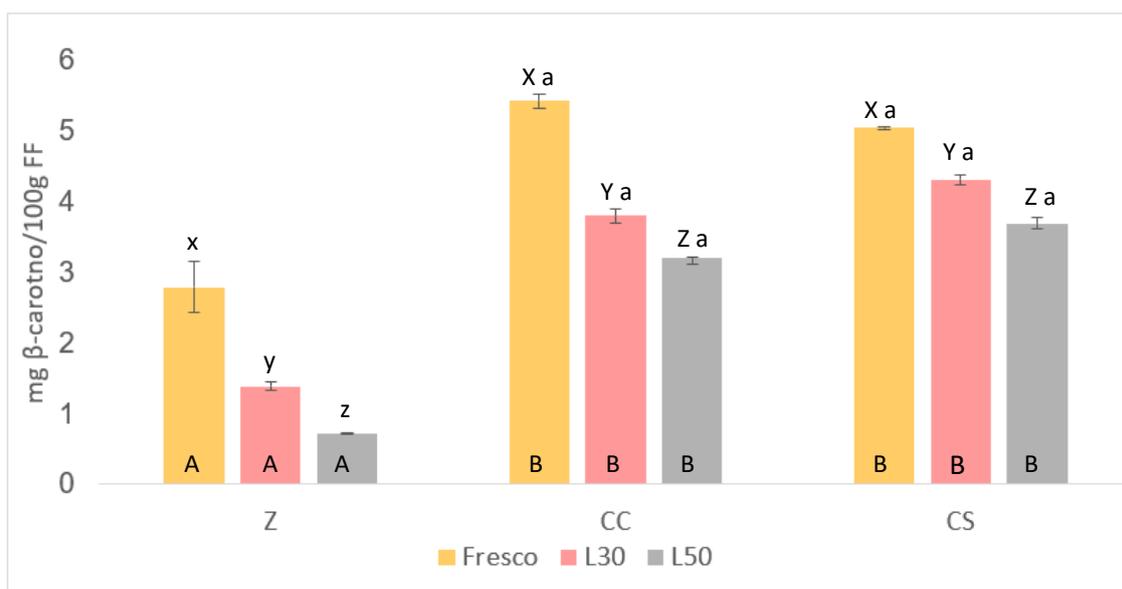


Figura 12. Resultados cantidad de β -caroteno (mg/100g FF) en cada una de las muestras analizadas. Z (zumo con biopolímeros), CC (coproducto con biopolímeros), CS (coproducto sin biopolímeros). Las letras A-B mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido en β -caroteno entre los tipos de muestra. Las letras X-Y-Z mayúscula indican, para cada producto, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados. Las letras a-b minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los coproductos con y sin biopolímeros.

La Figura 13 muestra los resultados obtenidos para el análisis de compuestos fenólicos totales de los distintos productos. En general, el contenido en fenoles del zumo fue del orden del descrito en otros estudios de naranja (Klimckak et al., 2007). Las muestras de coproducto resultaron mucho más ricas en compuestos fenólicos que las muestras de zumo ($p < 0,05$), debido a la alta cantidad de flavonoides contenidos en la cáscara de la naranja, tal y como describen los estudios de Nakajima (2014). La liofilización disminuyó de forma significativa la cantidad de compuestos fenólicos presentes en todas las muestras ($p < 0,05$), no afectando las condiciones del proceso. La adición de biopolímeros en el coproducto no afectó de manera significativa ($p > 0,05$) a la cantidad de compuestos fenólicos en estas muestras.

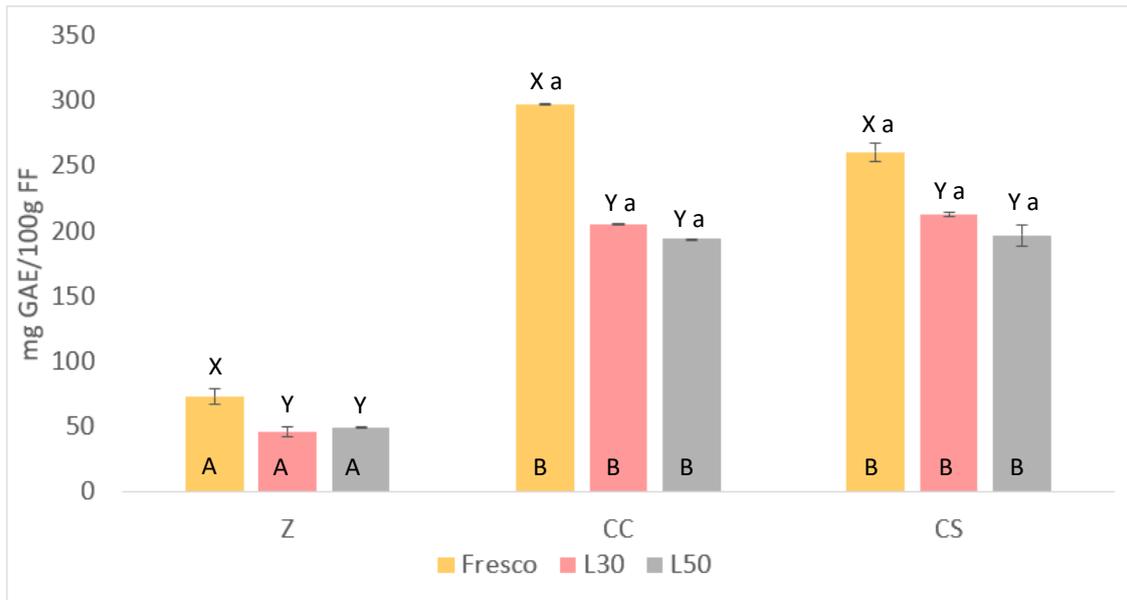


Figura 13. Resultados cantidad de compuestos fenólicos (mg GAE/100g FF) en cada una de las muestras analizadas. Z (zumo con biopolímeros), CC (coproducto con biopolímeros), CS (coproducto sin biopolímeros). Las letras A-B mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido en compuestos fenólicos entre los tipos de muestra. Las letras X-Y-Z mayúscula indican, para cada producto, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados. Las letras a-b minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los coproductos con y sin biopolímeros.

La Figura 14 muestra los resultados obtenidos para el análisis de la actividad antioxidante mediante el método FRAP. La actividad antioxidante presente en las muestras de zumo fue inferior a la de las muestras de coproducto ($p < 0,05$), debido a la mayor cantidad de los compuestos bioactivos presentes (vitamina c, β -Caroteno y compuestos fenólicos) en el mismo. Por otra parte, algunos estudios han descrito el efecto antioxidante de la fibra dietética presente en los cítricos y ubicada de manera mayoritaria en la piel (Zou et al., 2016). También se pudo observar que, en las tres muestras, la liofilización disminuyó de forma significativa ($p < 0,05$) la actividad antioxidante, y esta disminución fue mayor ($p < 0,05$) en las muestras liofilizadas en condiciones L50 que en las liofilizadas en condiciones L30. En cuanto a la adición de biopolímeros, las muestras CC presentaron mayor actividad antioxidante ($p < 0,05$) que las muestras CS.

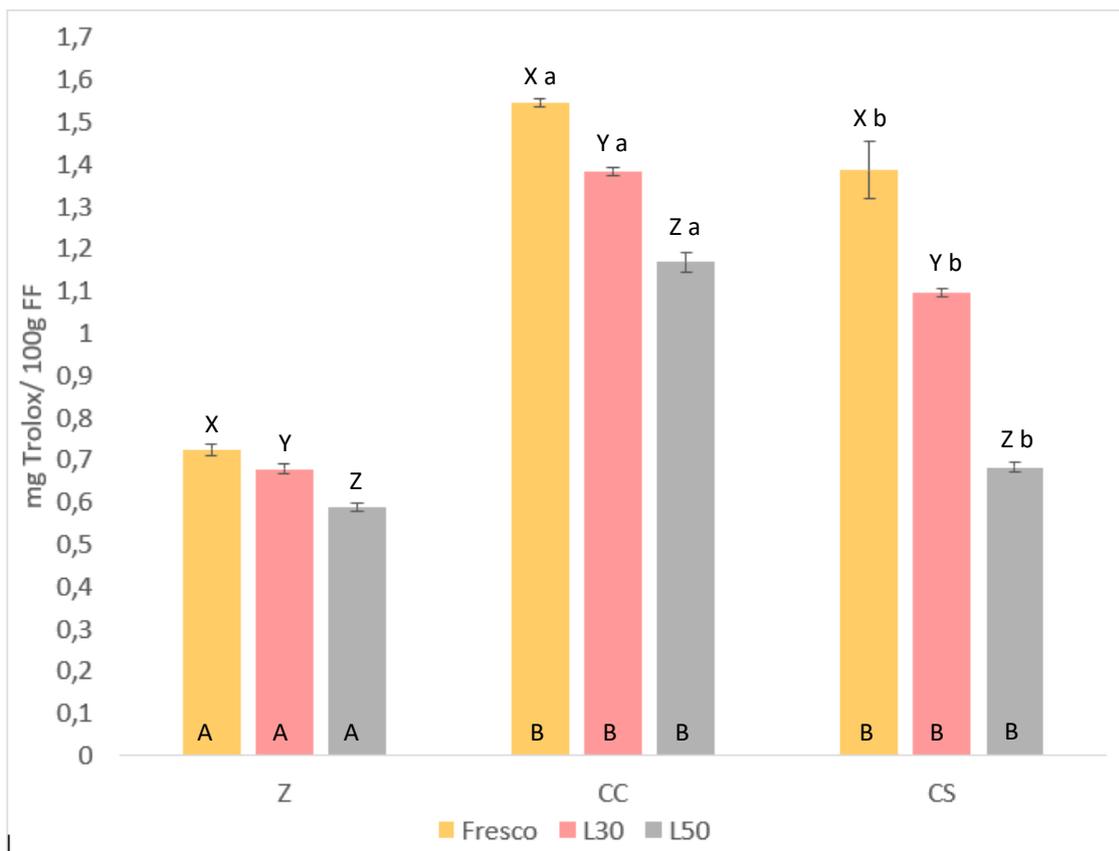


Figura 14. Resultados cantidad de la actividad antioxidante (mmol Trolox/100g FF) en cada una de las muestras analizadas mediante el método FRAP. Z (zumo con biopolímeros), CC (coproducto con biopolímeros), CS (coproducto sin biopolímeros). Las letras A-B mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante entre los tipos de muestra. Las letras X-Y-Z mayúscula indican, para cada producto, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados. Las letras a-b minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los coproductos con y sin biopolímeros.

La Figura 15 muestra los resultados obtenidos para el análisis de la actividad antioxidante mediante el método DPPH. En este caso, las muestras de zumo mostraron similar ($p > 0,05$) actividad antioxidante que las de coproducto. Tal y como se ha observado en el método FRAP, la liofilización disminuyó ($p < 0,05$) la actividad antioxidante de las muestras, siendo esta disminución más acentuada ($p < 0,05$) en las muestras liofilizadas a 50°C que a 30°C. La adición de biopolímeros en el coproducto tampoco resultó significativa ($p > 0,05$) para la actividad antioxidante medida por este método.

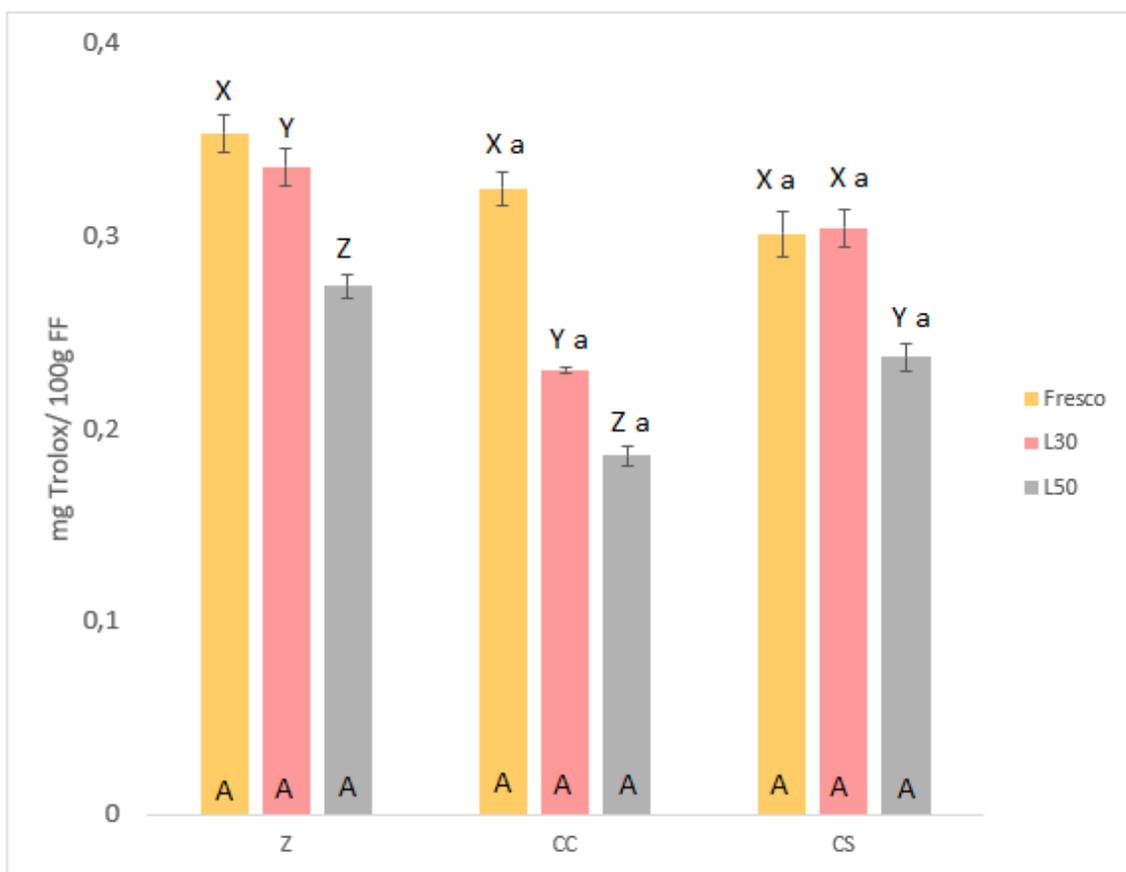


Figura 15. Resultados cantidad de la actividad antioxidante (mmol Trolox/100g FF) en cada una de las muestras analizadas mediante el método DPPH. Z (zumo con biopolímeros), CC (coproducto con biopolímeros), CS (coproducto sin biopolímeros). Las letras A-B mayúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en la actividad antioxidante entre los tipos de muestra. Las letras X-Y-Z mayúscula indican, para cada producto, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos aplicados. Las letras a-b minúscula indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los coproductos con y sin biopolímeros.

4.2. DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS Y BIOACCESIBILIDAD DE LOS COMPUESTOS BIOACTIVOS

La digestión gastrointestinal *in vitro* puede ser considerada como una herramienta útil para la estimación de la liberación, la estabilidad y la bioaccesibilidad de compuestos bioactivos de los alimentos, así como para evaluar la influencia de la matriz alimentaria y del procesado sobre la bioaccesibilidad de estas sustancias. 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 (Tabla 7). Debido al gran volumen de trabajo que suponía realizar la digestión *in vitro* de todos los productos, se decidió elegir las muestras del zumo (Z, L30, ZL50) y del coproducto sin biopolímeros (CS y CSL50) para estudiar el efecto de la liofilización, dado que la adición de biopolímeros no ha supuesto una mejora sustancial en los compuestos bioactivos del coproducto de naranja.

Tabla 7. Resultados (Valores medios \pm desviación estándar) de los análisis de los compuestos bioactivos en los digestos intestinales obtenidos en las digestiones *in vitro* (mg/100g FF).

	AA (mg /100g FF)	VC (mg/100g FF)	β -Caroteno (mg/100g FF)	Fenoles totales (mg GAE/100g FF)
Z	16,3 \pm 0,6 ^A	31,9 \pm 0,3 ^A	0,32 \pm 0,01 ^A	22 \pm 6 ^A
Z L30	2,71 \pm 0,07 ^B	4,9 \pm 0,9 ^B	0,07 \pm 0,01 ^B	2,9 \pm 0,09 ^C
Z L50	0,94 \pm 0,02 ^B	3,50 \pm 0,12 ^B	0,04 \pm 0,01 ^C	3,4 \pm 0,9 ^C
CS	nd	nd	0,35 \pm 0,02 ^A	31,5 \pm 0,4 ^B
CS L50	nd	nd	0,06 \pm 0,01 ^B	5,6 \pm 0,5 ^C

*nd: no detectado

Z (zumo con biopolímeros), Z L30 (zumo liofilizado a L30), Z L50 (zumo liofilizado a L50), CS (coproducto sin biopolímeros), CS L50 (coproducto sin biopolímeros liofilizado a L50). Por columnas Las letras A-B-C indican diferencias significativas entre los tipos de muestra.

En general, el proceso de digestión *in vitro* provocó un descenso en los valores de todos los compuestos bioactivos estudiados. En este sentido, la inestabilidad de la vitamina C se debe 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 este compuesto (Rodríguez-Roque, 2014). En este sentido, esto podría explicar que no se detectara VC en los digestos intestinales de los coproductos CS y CS L50. Puesto que en estas muestras la VC se encuentra de manera mayoritaria en su forma oxidada (DHAA), mucho más susceptible a oxidarse a formas no activas de la vitamina (2,3- ácido dicetogulónico) (Aschoff et al., 2015).

En cuanto a los carotenoides, las condiciones de pH ácidas del estómago les afectarían especialmente, dada la inestabilidad de estos compuestos frente a las condiciones ácidas del medio (Meléndez-Martínez, 2004).

Para entender la disminución de los compuestos fenólicos en el digesto intestinal hay que considerar, por una parte, que el pH alcalino de la fase intestinal provoca que éstos sufran distintas reacciones químicas, principalmente oxidación y polimerización, favoreciendo la formación de otros compuestos fenólicos derivados que no pueden absorberse debido a su baja solubilidad y a su alto peso molecular (Rodríguez-Roque et al., 2013). Además, se ha descrito como las interacciones entre los fenoles y otros constituyentes de la naranja (principalmente la fibra) pueden favorecer la formación de complejos incapaces de atravesar la membrana de diálisis (Rodríguez-Roque et al., 2013).

Por otra parte, también pudo observarse un mayor contenido de bioactivos ($p < 0,05$) en los digestos de las muestras control o frescas Z y CS que en los digestos de los productos liofilizados.

Todos estos compuestos bioactivos generaron una actividad antioxidante en el digesto intestinal que se analizó mediante el método FRAP y DPPH, al igual que la actividad antioxidante de las muestras sin digerir. Los resultados de actividad antioxidante obtenidos se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados (Valores medios \pm desviación estándar) de la actividad antioxidante de los digestos intestinales obtenidos en las digestiones *in vitro* (mmol Trolox/100g FF).

	FRAP	DPPH
Z	0,17 \pm 0,05 ^A	0,12 \pm 0,01 ^A
Z L30	0,01 \pm 0,01 ^A	0,01 \pm 0,01 ^B
Z L50	0,02 \pm 0,01 ^A	0,02 \pm 0,01 ^B
CS	0,12 \pm 0,02 ^A	0,12 \pm 0,01 ^A
CS L50	0,02 \pm 0,01 ^A	0,01 \pm 0,01 ^B

Z (zumo con biopolímeros), Z L30 (zumo liofilizado a L30), Z L50 (zumo liofilizado a L50), CS (coproducto sin biopolímeros), CS L50 (coproducto sin biopolímeros liofilizado a L50). Por columnas, las letras A-B indican diferencias significativas entre los tipos de muestra.

La disminución de la capacidad antioxidante medida por ambos métodos en la etapa intestinal podría deberse a la acción de las enzimas y del pH durante la digestión *in vitro* sobre la estructura química de los 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, pueden suponer una disminución, no solo de la concentración, sino también de la actividad antioxidante de dichos compuestos.

Pudo observarse que la actividad antioxidante analizada por el método FRAP no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al tipo de muestra. En el método DPPH los digestos de las muestras frescas Z y CS mostraron mayor ($p < 0,05$) actividad antioxidante que los digestos de las respectivas muestras liofilizadas, en concordancia con lo observado en cuanto al contenido en compuestos bioactivos de los digestos de estas muestras.

Tras la realización de las digestiones *in vitro* y el análisis de los posteriores digestos, se obtuvieron resultados de bioaccesibilidad de cada compuesto bioactivo (ecuación 2) en las distintas muestras, recogidos en la Tabla 9.

Tabla 9. Bioaccesibilidad (%) de los compuestos bioactivos de las muestras.

	AA	VC	β -Caroteno	Fenoles totales
Z	25,61	43,86	11,39	29,58
Z L30	4,43	6,20	4,93	6,42
Z L50	1,76	5,12	5,45	6,86
CS	-	-	6,94	12,01
CSL50	-	-	1,53	2,87

Z (Zumo con biopolímeros), Z L30 (zumo con biopolímeros liofilizado a L30), Z L50 (zumo con biopolímeros liofilizado a L50), CS (coproducto del zumo sin biopolímeros), CS L50 (Coproducto del zumo sin biopolímeros liofilizado a L50).

La bioaccesibilidad de todos los compuestos bioactivos fue mayor en el zumo fresco con biopolímeros. La liofilización disminuyó la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos en las muestras de zumo, especialmente en las liofilizadas en condiciones de L50. Respecto al coproducto, la bioaccesibilidad de todos los compuestos bioactivos fue menor que la observada para el zumo y también se vio afectada negativamente por la liofilización. En este sentido, a pesar de que los coproductos presentaron mayor contenido en carotenoides y compuestos

fenólicos, su bioaccesibilidad fue menor. Esto puede ser debido a la distinta composición y naturaleza química de estos bioactivos en la piel y en el zumo de la naranja.

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 % de actividad antioxidante proporcionada por cada producto que produce su efecto a nivel corporal (Tabla 10).

Tabla 10. Estimación del % de la actividad antioxidante proporcionada por las muestras tras las digestiones *in vitro*. Z (Zumo con biopolímeros), Z L30 (zumo con biopolímeros liofilizado a L30), Z L50 (zumo con biopolímeros liofilizado a L50), CS (coproducto del zumo sin biopolímeros), CS L50 (Coproducto del zumo sin biopolímeros liofilizado a L50).

	FRAP	DPPH
Z	23,7	33,18
Z L30	8,34	2,87
Z L50	3,41	5,49
CS	2,57	40,48
CSL50	1,43	6,25

La muestra que aportó mayor % de actividad antioxidante, medida por ambos métodos, fue Z. También observamos que el % de actividad antioxidante se mantuvo mejor en las muestras frescas de Z y CS que en las respectivas liofilizadas, tal y como era de esperar dados los resultados observados en la bioaccesibilidad de los compuestos bioactivos que generan esta actividad antioxidante. Por el mismo motivo, las muestras de zumo liofilizados a L30 presentaron un mayor % de actividad antioxidante que los liofilizados a L50.

5. CONCLUSIÓN

El coproducto del zumo de naranja presentó mayor cantidad de compuestos bioactivos: vitamina C (principalmente en forma de ácido dehidroascórbico), β -caroteno y fenoles totales, y mayor actividad antioxidante que el zumo formulado con goma arábica y fibra de bambú.

La adición de biopolímeros al coproducto, no supuso ningún cambio significativo respecto a la cantidad de compuestos bioactivos y actividad antioxidante del mismo.

Las condiciones de liofilización afectaron a la estabilidad de los compuestos bioactivos y a su bioaccesibilidad. En general, se produjo un descenso en la cantidad de fenoles totales, carotenoides y en la actividad antioxidante, siendo este descenso mayor en las muestras liofilizadas a 50°C que a 30°C.

En relación a la digestión *in vitro* de las muestras, el zumo 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 el zumo de la naranja.

En general, podemos concluir que, tanto el zumo de naranja formulado con goma arábica y fibra de bambú, como su coproducto liofilizados a 30°C han mostrado un buen aporte de compuestos bioactivos y actividad antioxidante, lo cual hace interesante su utilización como ingredientes para la elaboración de nuevos productos alimentarios.

6. BIBLIOGRAFÍA

AGUDO, A., CABRERA, L., AMIANO, P., ARDANAZ, E., BARRICARTE, A., BERENGUER, T., CHIRLAQUE, M.D., DORRONSORO, M., JAKSZYN, P., LARRAÑAGA, N., MARÍNEZ, C., NAVARRO, C., QUIRÓS, J.R., SÁNCHEZ, M.J., TORMO, M.J., & GONZÁLEZ, C.A. (2007); "Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrient, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain)" en *American Journal of Clinical Nutrition*, volumen 85, p.1634-1642

ALCOCER, J.C., PAZ, N.F., CRUZ, V.E., GARAY, P.A., GONCALVEZ DE OLIVEIRA, E, VILLALVA, F.J., CURTI, C.A., RIVAS, M.A., & RAMÓN, A.N. (2017); "Goma arábica, un ingrediente funcional para la formulación de productos saludables" en *Revista de la Facultad de Ciencias de la salud*, volumen 2, número 10.

ARMIJO, C.J., CONDORHUAMAN, C.C., & HILARIO, R.B. (2008); "Estudio experimental del ciclo de liofilización de productos orgánicos naturales" en *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, Volúmen 11, número 2, p 23-28

ASCHOFF, J.K., KAUFMANN, S., KALKAN, O., NEIDHART, S., CARLE, R., & CHEWEIGGERT, R.M. (2015); "In vitro Bioaccessibility of Carotenoids, Flavonoids, and Vitamin C from Differently Processed Oranges and Orange Juices" en *Journal of Agricultural and food chemistry*, volumen 63, número 2, p.578-587

BARBA, L.R., QUEZADA, I.C., RODRÍGUEZ, C.R., & MAJEM, L.S. (2006); "Misreporting in nutritional surveys: methodological implications" en *Nutrición Hospitalaria*, volúmn 31, número 2, p.119-127.

BARBOSA-CÁNOVAS, GUSTAVO, V.; ORTEGA R.E., JULIANO, P., & YAN, H. (2006); "Food powders: Physical Properties, Processing, and Functionality" *Kluwer Academic/Plenum Publishers*.

BENZIE, F.F., & STRAIN J.J. (1999); "Ferric Reducing/antioxidant power assay: direct mesure of total antioxidant activity of biological fluids and modified versión for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration" en *Methods in Enzymology*, volumen 299, p.15-27

BLASCO, R., ESTEVE, M.J., FRÍJOLA, A., & RODRIGO, M. (2004); "Ascorbic acid degradation kinetics in mushrooms in a high-temperature short-time process controlled by a thermoresistometer. LWT" en *Food Science and Technology*, volumen 37, p.171-175

BOUAYED, J., HORFFMANN, 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" en *Food Chemistry*, volumen 128, número 1, p.14-21

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

BRAVO, L. (1998); " Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance" en *Nutrition Reviews* 56, p317-333

BROWN, M. G. (2004); "World Orange-juice production and consumption trends" (nº 823-2016-54550).

CACICEDO, M.L. (2011); "Encapsulación y liberación controlada de Enrofloxacin utilizando matrices biopoliméricas" Tesis de Licenciatura en Biotecnología y Biología Molecular para la Universidad Nacional de la Plata.

CARRANCO, M.; CALVO, M.; & PÉREZ, F. (2011); "Carotenoides y su función antioxidante: Revisión" en *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, volumen 68, número 24, p.259-256

CASCALES, A.M., & DOADRIO, VILLAREJO, A.L. (2014); "Fisiología del aparato digestivo" *Anales de la Real Academia de Medicina y Cirugía*, p.12-27

CHAPIN PATIÑO, J.G. (2021); "Valoración de las propiedades nutricionales, capacidad antioxidante y compuestos bioactivos en la producción de néctar de naranja" Examen complejo para la Universidad Técnica de Machala.

CHAVARRÍAS, M. (2010); "Liofilización para una mejor conservación" en *Consumer*

COBOS DE RANGEL, O., BUITRAGO, G., & OSPINA, S. (2017); "GRUPOS DE BIOPOLÍMEROS Y BIOFUNCIONALES. Los biopolímeros, compuestos que mejoran la salud" en *Revista Colombiana de Biotecnología*, p.11-13

DHUIQUE-MAYER, C., TBATOU, M., CARAIL, M., CARIS-VEYRAT, C., DORNIER, M., & AMIOT, M.J. (2017); "Thermal degradation of antioxidant micronutrients in citrus juice: kinetics and newly formed compounds" en *Agric Food Chem*, volumen 55, número 10, p.4209-4216

ELEJALDE GUERRA, J.I. (2001); "Oxidación, entre la vida y la enfermedad" en *Anales de Medicina Interna*, volumen 18, número 1, p.1-4

ESCOBEDO-AVELLANEDA, Z., GUTIÉRREZ-URIBE, J., VALDEZ-FRAGOSO, A., TORRES, J.A., & WELTICHANES, J. (2013); "Phytochemicals and antioxidant activity of juice, flavedo, albedo and comminuted Orange" en *Journal of functional foods*, número 6, 470 – 481.

ESCUDERO LÓPEZ, B. (2014); "Caracterización de compuestos bioactivos de una novedosa bebida de naranja obtenida por fermentación alcohólica y evaluación de su potencial efecto saludable" en Tesis doctoral para la Universidad Pablo Olavide

FAO. (2020) FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> Visto el 30/06/2021

FAO. Directrices para el uso de declaraciones nutricionales y saludables: CAC/GL 23-1997. Codex Alimentarius, 22º período de sesiones (1997) y enmendadas en su 24º período de sesiones. Roma; 2001

FUCHS, J. (1998); "Potentials and limitations of the natural antioxidants Alpha-Tocopherol, L-Ascorbic Acid and Beta-Caroteno in cutaneous photoprotection" en *Free Radic Biol Med*, Volumen 27, número 7, p.848-873.

GIMENO, E. (2004); "Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud" en *Offarm*, volumen 23, número 6, p.80-84

HIGDON, J. (2005); "Flavonoids" *Linus Pauling Institute, Oregon State University*.

KANAKDANDE, D., BHOSALE, R., & SINGHAL, R.S. (2007); "Stability of cumin oleo-resin microencapsulated in different combinations of gum arabic, maltodextrin and modified starch" en *carbohyd Polym*, volumen 67, número 4, p.536-541

- KLIMCZAK, I., MALECKA, M., SZLACHTA, M., & GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A. (2007); "Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices" en *Journal of Food Composition and Analysis*, volumen 20, número 3-4, p.313-322
- LADINAYA, M. (2008); "Citrus fruit: biology, technology, and evaluation" en *Elsevier*, número 6, p-576.
- LIU, D., SONG, J.P., ÁNDERSON, D. R., CHANG, P., & HUA, Y. (2012); "Bamboo fiber and its reinforced composites: structure and properties" en *Cellulose*, volumen 19, p.1449-1480
- LUCAS GONZÁLEZ, R. (2016); "Digestión de alimentos: tendencias en los modelos de digestión in vitro" en *Revista Doctorado Universidad Miguel Hernández de Elche*, volúmen 2, número 2, p5
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S, GONZÁLEZ-GALLEGO, J, CULEBRAS, M, & TULÓN, M^a. J. (2002); "Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes" en *Nutrición Hospitalaria XVII* (6) 271-278 ISSN 0212-1611 – CODEN DUHOEQ S. V. R. 318
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., VICARIO, I., & HEREDIA, F.J. (2004); "Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos" en *ALAN*, volumen 54, número 2, p.209-215
- MILLER, D.D., SCHRICKER, B.R., SARMUSSEN, R.R., & VAN CAMPEN, D. (1981); "An in vitro method for estimation of iron availability from meals" en *The American Journal of Clinical Nutrition*, volumen 34, número 10, p.2248-2256
- MOREIRAS, O., CARBAJAL, A., CABRERA, L., & CUADRADO, C. (2013); "Composición nutricional y funcional de la naranja [Tabla]. En Tablas de composición de alimentos.
- NACZK, M. & SHAHIDI, F. (2006); "Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis" en *J. Phatm. Anal*, número, 41, p1523-1542
- NAKAJIMA, V.M., MACEDO, G.A., & MACEDO, J.A. (2014); "Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment" en *Food Science and Technology*, volumen 59, número 2, p.1205-1212
- NOWICKA, P. & WOJDYLO, A. (2016); "Stability of phenolic compounds, antioxidant activity and colour through natural sweeteners addition during storage of sour Cherry puree" en *Food Chemistry*, volumen 196, p.925-934.
- PÉREZ AYALA, M. (2005); "Línea de elaboración de zumo de naranja pasteurizado y refrigerado de 6000L/h en Lorquí (Murcia)" Proyecto fin de carrera para la Universidad Politécnica de Cartagena.
- PIOR, R.L., WU, X., & SCHAICH, K. (2005); "Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements" en *Journal of Agricultural and food chemistry*, volumen 53, número 10, p.4290-4303.
- PULIDO, R., BRAVO, L., & SAURA-CALITXO, S. (2000); "Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols as Determined by a Modified Ferric Reducing/antioxidant power assay" en *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, volumen 48, número 8, p.3396-3402
- PUUPPONEN-PIMIÄ, R., NUUTILA, A.M., AARNI, M, & OKSMAN-CALDENTY, K.M. (2003); "Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity" en *Food Chemistry*, volumen 81, número 4, p.485-493

- RATTI, C. (2013). "Freeze drying for food powder production." Ed. Woodhead publishing. Cambridge
- RODRÍGUEZ-ROQUE, M.J., ROJAS-GRAÜ, M.A., ELEZ-MARTÍNEZ, P., & MARTÍN-BELLOSO, O. (2014); "In vitro bioaccessibility of health-related compounds as affected by the formulation of fruit juice- and milk – based beverages" en *Food Research International*, volumen 62, p.771-778
- ROJANO, B., GAVIRIA, C., & SAEZ, J. (2008); "Determinación de la actividad antioxidante en un modelo de peroxidación lipídica de mantequilla inhibida por el isoespintanol" en *Vitae, Revista de la Facultad de química farmacéutica*, volumen 15, número 2, p.1-9
- RODRIGUEZ-ASCO, J.C. (2005); Tesis doctoral "Tecnología de la liofilización de productos vegetales" para la Universidad Nacional Mayor de San Marcos
- SANCHEZ, A., FLORES-COTERA, L.B., LANGLEY, E., MARTIN, R., MALDONADO, G., & SANCHEZ, S. (1999); "Carotenoides: estructura, Función Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones" en *Revista Latinoamericana de Microbiología* número 41, p:175-191
- SÁNCHEZ-MATA, M.C., CÁMARA-HURTADO, M, DÍAZ-MARQUÉS, C, & TORIJA-ISASA, M.E. (2000); "Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C análisis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.)" en *European Food Research and Technology*, volumen 210, p.220-225
- SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., DE ANCOS B., & CANO M^a.P. (2003); "Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of comercial Orange juices" en *Journal of the Science of Food and Agriculture*, volumen 83, número 5, p.430-439
- SEL VENDRAN, R., R., & RYDEN, P. (1998); "Methods in plant biochemistry" en *Academy Express-London*, volumen 2, p-549
- SICARI, V., DORATO, G., GIUFFRÈ, A.M., RIZZO, P., & ALBUINA, A.R. (2017); "The Effect of Different Packaging on Physical and Chemical Properties of Oranges during Storage" en *J. Food Process. Pres.* 2017, 41:e13168. DOI:10.1111/jfpp.13168.
- SILVA-ESPINOZA, A.M., 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" en *Food Chemistry*, volumen 357, 129724
- STATISTA (2021): "Volumen de cítricos frescos consumidos en Europa en 2019/2020, por tipo de fruto" Visto en "Statista" en 30/06/21 <https://es.statista.com/estadisticas/493928/consumo-de-citricos-en-espana-por-fruto/>
- TENORIO, D.M. (2016); "Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sachá inchi (*Plukenetia volubilis*)" en *Scientia Agropecuaria*, volumen 7, número 4, p.419-431
- THAIPONG, K., BOONPRAKOB, U., CROSBY, K., CISNEROS-ZEVALLOS, L., & HAYKINS, D. (2006); "Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruits extracts" en *Journal of Food Composition and Analysis*, volumen 19, número 6-7, p.669-675

USDA (2020). "Orange peel, raw". Visto el 15 de junio de 2021, en: <https://ndb.nal.usda.gov/fdcapp.html#/food-details/169103/nutrients>

VALDÉS, F. (2006); "Vitamina C" en *Actas Dermo-sifiling*, volumen 97, número 9, p.5557-568

XU, G., LUI, D., CHEN, J., YE, X., MA, Y., & SHI, J. (2008); "Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China" en *Food Chemistry*, volumen 106, número 2, p.545-551

YADAV, M.P., IGARTUBURU, J.M., YAN, Y., & NOTHANGEL, N.A. (2007); "Chemical investigation of the structural basis of the emulsifying activity of gum arabic" en *Food Hydrocolloid*, volumen 21, número 2, p.297-298.

YANZA, E. & MALDONADO, L. (2013); "Efecto del proceso de liofilización en la conservación de β -tocoferol y α - β - carotenos presentes en el tomate de árbol (*Cyphomandra Betacea Cav sendt*)" Tesis de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos para la Universidad de Pamplona.

ZOU, Z., XI, W., HU, Y., NIE, C., & ZHOU, Z. (2016); "Antioxidant activity of Citrus fruits" en *Food Chemistry*, volumen 196, p.885-896