



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

PERFIL DE COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES Y
LIGADOS EN EL COPRODUCTO DEL ZUMO DE
NARANJA

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Zago Andrés, Mónica

Tutor/a: Martínez Navarrete, Nuria

Cotutor/a: Camacho Vidal, M^a Mar

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI
NATURAL



**COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES Y LIGADOS EN EL
COPRODUCTO DEL ZUMO DE NARANJA. PERFIL DE
FLAVONOIDES.**

TRABAJO FINAL DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Mónica Zago Andrés

TUTORA: Nuria Martínez Navarrete

COTUTORA: María del Mar Camacho Vidal

Curso académico: 2021-2022

VALENCIA, julio 2022

COMPUESTOS FENÓLICOS LIBRES Y LIGADOS EN EL COPRODUCTO DEL ZUMO DE NARANJA. PERFIL DE FLAVONOIDES

RESUMEN

Como es bien sabido, gran parte de la actividad antioxidante total de los vegetales está relacionada con su contenido fenólico. Sin embargo, los compuestos fenólicos pueden encontrarse libres o ligados principalmente en forma de β -glucósidos. Si bien estos últimos no se absorben a nivel del intestino delgado, llegan intactos al colon, donde pueden actuar como prebióticos, también con efecto beneficioso para la salud. En general, la mayoría de los estudios sobre compuestos fenólicos y propiedades antioxidantes se han realizado determinando principalmente los compuestos fenólicos libres, dando una subestimación de los fenoles totales y su potencial efecto a nivel fisiológico. En este trabajo se han puesto a punto los métodos para la cuantificación y extracción de los compuestos fenólicos libres y aquellos ligados a las paredes celulares. Como materia prima se trabajó con el coproducto del zumo de naranja, antes y después de su liofilización, sin y con biopolímeros estabilizantes/encapsulantes añadidos. Por otra parte, se identificó el perfil de los flavonoides mayoritarios presentes en ambas extracciones y se analizó su actividad antioxidante. El objetivo final del estudio fue conocer la necesidad de sustituir el método convencional de análisis de fenoles totales por uno más específico. Los resultados obtenidos permiten concluir que con el método de extracción convencional sólo se extraen algunos de los compuestos fenólicos libres, obviando gran parte de estos compuestos y aquellos ligados a la pared celular. De esta forma se subestima el contenido total de fenoles, por lo que sería recomendado utilizar, en su lugar, el método de extracción por fracciones.

Palabras clave: coproducto del zumo de naranja; fenoles libres; fenoles ligados; actividad antioxidante; hesperidina; narirutina; didimina; nobiletina.

ALUMNA: Mónica Zago Andrés

TUTORA: Nuria Martínez Navarrete

COTUTORA: María del Mar Camacho Vidal

VALENCIA, julio 2022

PROFILE OF FREE AND BOUND PHENOLIC COMPOUNDS IN THE CO-PRODUCT OF ORANGE JUICE

ABSTRACT

As is well known, much of the total antioxidant activity of vegetables is related to its phenolic content. However, phenolic compounds can be found free or bound mainly in the form of β -glycosides. Although these cannot be absorbed at the small intestine, they arrive intact to the colon, where they can act as prebiotics, also with beneficial effect on health. In general, most of the studies on phenolic compounds and antioxidant properties have been carried out mainly determining free phenolic compounds, giving an underestimation of total phenols and their potential effect at physiological level. This paper aims to develop methods for the quantification and extraction of free phenolic compounds and those linked to cellular walls. As a raw material, it was used the co-product of orange juice, before and after lyophilization, without and with stabilizing biopolymers/encapsulants. Furthermore, the profile of the major flavonoids present in both extractions was identified and their antioxidant activity was analyzed. The aim of the study was to know the need to replace the conventional method of analysis of total phenols with a more specific one. The results obtained allow us to conclude that with the conventional extraction method only some of the free phenolic compounds are extracted, avoiding much of these compounds and those linked to the cell wall. The total phenol content is thus underestimated, and it would be recommended to use the fractional extraction method instead.

Key words: co-product of orange juice; free phenols; bound phenols; antioxidant activity; hesperidin; narirutin; didymine; nobiletin.

STUDENT: Mónica Zago Andrés

ACADEMIC SUPERVISOR: Nuria Martínez Navarrete

ACADEMIC CO-SUPERVISOR: María del Mar Camacho Vidal

VALENCIA, July 2022

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer, en primer lugar, a María del Mar y a Nuria por haberme ayudado en esta última etapa de mi carrera universitaria, por darme la oportunidad de aprender de ellas y por la paciencia que han tenido para resolver mis dudas.

Gracias también a mis compañeros de carrera y, en especial, a Candela por estar cada tarde a mi lado desde el principio de la redacción de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	OBJETIVO	5
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1.	MATERIAS PRIMAS	6
3.1.1.	<i>Coproducto del zumo de naranja</i>	6
3.1.2.	<i>Biopolímeros</i>	6
3.1.3.	<i>Aparatos</i>	6
3.2.	METODOLOGÍA	7
3.2.1.	<i>Obtención del coproducto en polvo</i>	7
3.2.2.	<i>Determinaciones analíticas</i>	8
3.2.2.1.	Humedad	8
3.2.2.2.	Solubilidad	8
3.2.2.3.	Compuestos fenólicos.....	9
3.2.2.3.1.	Extracción de compuestos fenólicos totales (método convencional)	9
3.2.2.3.2.	Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos extraídos por el método convencional	9
3.2.2.3.3.	Extracción de las fracciones de compuestos fenólicos libres y ligados	9
3.2.2.3.4.	Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos extraídos en las fracciones de fenoles libres y ligados	11
3.2.2.4.	Determinación de la actividad antioxidante	11
3.2.2.5.	Perfil de flavonoides.....	11
3.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	12
4.	RESULTADOS.....	13
4.1.	CONTENIDO EN HUMEDAD Y SOLUBILIDAD	13
4.2.	COMPUESTOS FENÓLICOS	13
4.3.	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	17
4.4.	PERFIL DE FLAVONOIDES	19
5.	CONCLUSIONES	23
6.	BIBLIOGRAFÍA	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura general de los flavonoides.	2
Figura 2: Estructura de las subclases de flavonoides.	3
Figura 3: Procedimiento para la extracción de las fracciones para la determinación de los polifenoles libre y ligados.	10
Figura 4: Contenido fenólico en producto sin liofilizar (A) y liofilizado (B) expresados en mg de GAE/100 g solutos de CoP. Muestras CoP, OSA25, OSA45, GA25 y GA45 (códigos de las muestras según la Tabla 1). Las letras indican los grupos homogéneos obtenidos a partir del estudio estadístico (ANOVA). Letras mayúsculas del mismo color identifican, para cada fracción, los grupos homogéneos según el tipo de muestra (sin y con liofilizado). Letras minúsculas iguales y del mismo color identifican, para fenoles totales por el método convencional, los grupos homogéneos según el tipo de muestra (sin y con liofilizado). ...	16
Figura 5: Ejemplo de cromatograma. Perfil de flavonoides de la muestra CoP.	19
Figura 6: Contenido de flavonoides narirutina (NAT), hesperidina (HES), didimina (DID), nobiletina (NOB) y p5, en las muestras CoP, OSA25, OSA45, GA25 y GA45 antes de la liofilización. FT: extracción por el método convencional. FP30: fracción de flavonoides libres extraídos a 30 °C. FP60: fracción de flavonoides libres extraídos a 60 °C. BPB: fracción de flavonoides ligados extraídos en medio básico. BPA: fracción de flavonoides ligados extraídos con ácido.	21
Figura 7: Contenido de flavonoides narirutina (NAT), hesperidina (HES), didimina (DID), nobiletina (NOB) y p5, en las muestras CoP, OSA25, OSA45, GA25 y GA45 liofilizadas. FT: extracción por el método convencional. FP30: fracción de flavonoides libres extraídos a 30 °C. FP60: fracción de flavonoides libres extraídos a 60 °C. BPB: fracción de flavonoides ligados extraídos en medio básico. BPA: fracción de flavonoides ligados extraídos con ácido.	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las diferentes formulaciones del coproducto y códigos asignados a los correspondientes coproductos en polvo obtenidos (muestra).....	7
Tabla 2: Contenido de agua de las muestras, antes (x_w) y después de liofilizar (x_w^L), y solubilidad del polvo liofilizado de cada muestra.....	13
Tabla 3: Contenido fenólico (mg GAE/100 g solutos CoP) en las muestras antes de la liofilización (códigos de las muestras según la Tabla 1). Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones.	14
Tabla 4: Contenido fenólico (mg GAE/100 g soluto CoP) en las muestras liofilizadas (códigos de las muestras según la Tabla 1). Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones.	15
Tabla 5: Contenido fenólico (mg GAE/100 g de biopolímero, bs) en los biopolímeros goma Arábica (GA) y almidón modificado (OSA) utilizados en la formulación de las muestras.....	16
Tabla 6: Actividad antioxidante en producto antes de liofilizar expresados en mmol de Trolox/100 g solutos de CoP (códigos de las muestras según la Tabla 1). Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones.....	17
Tabla 7: Actividad antioxidante en producto liofilizado expresados en mmol de Trolox/100 g solutos de CoP (códigos de las muestras según la Tabla 1). Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones. Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones.....	18
Tabla 8: Actividad antioxidante en biopolímeros goma Arábica (GA) y almidón modificado (OSA) utilizados en la formulación de las muestras expresados en mmol de Trolox/100 g de biopolímero (bs).....	19

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Bp: biopolímero

CoP: coproducto del zumo de naranja

OSA25: coproducto de la naranja con almidón esterificado con ácido octenil succínico al 25%

OSA45: coproducto de la naranja con almidón esterificado con ácido octenil succínico al 45%

GA25: coproducto de la naranja con goma Arábica al 25%

GA45: coproducto de la naranja con goma Arábica al 25%

FP30: Primera fracción de polifenoles libres extraída a 30 °C

FP60: Segunda fracción de polifenoles libres extraída a 60 °C

Extracto BPB: Primera fracción de polifenoles ligados extraídos en medio básico

Extracto BPA: Segunda fracción de polifenoles ligados extraídos en medio ácido

1. INTRODUCCIÓN

El interés por las dietas ricas en frutas y verduras se ha incrementado en los últimos años debido a sus propiedades antioxidantes y sus numerosos beneficios para la salud humana. La elección de consumo de fruta ya no se basa en los gustos personales, sino en tratar de alcanzar un estilo de vida lo más saludable posible. Debido al gran reconocimiento del valor nutricional de los vegetales, además de aumentar su consumo, también ha despertado el interés de la población por conocer la cantidad de los componentes bioactivos presentes en ellos. En particular, las empresas, han mostrado su interés por incluir los antioxidantes naturales en la formulación de sus productos, tanto en alimentos como en bebidas (Montero et al., 2022).

Parte de estas propiedades de las frutas, se las otorgan los polifenoles, unos metabolitos secundarios propios del reino vegetal. Estas estructuras polifenólicas engloban una numerosa variedad de compuestos que se diferencian entre sí por la posición y el número de los grupos hidroxilos y por la variedad de grupos funcionales que presentan (metilos, azúcares, ácidos orgánicos) (Quiñones et al., 2012). Entre ellos, los más comunes son los ácidos fenólicos y los flavonoides (Brglez et al., 2016). Estos últimos tienen como principales subgrupos los flavonoles, las flavonas y las flavanonas.

Los fenoles, entre otras funciones, son componentes estructurales de las paredes celulares, otorgan las propiedades colorantes y aromatizantes a los vegetales y actúan como protectores de la madera, corcho, semillas y otras estructuras vegetales (Asqui et al., 2022). Además, existen estudios científicos que comprueban que los polifenoles tienen varios beneficios en el organismo humano. Se ha demostrado que su capacidad antioxidante, antiinflamatoria (Brglez et al., 2016), antitrombótica y antimicrobiana (Trueba et al., 2001) no solo disminuye el riesgo de padecer enfermedades crónicas como son las enfermedades cardiovasculares o el cáncer, sino que retrasan la propagación de la enfermedad y facilitan el proceso de curación (Brglez et al., 2016; Montero et al., 2022; Vierci et al., 2018). Pero, cabe tener en cuenta que los polifenoles que presentan mayor abundancia en los alimentos no siempre muestran mayor actividad en el organismo ya que su baja absorción, alta metabolización y rápida excreción están directamente implicadas en su baja actividad intrínseca (Quiñones et al., 2012).

La biodisponibilidad se define como “la proporción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación (Quiñones et al., 2012). La biodisponibilidad de los polifenoles procedentes de los alimentos está marcada por las modificaciones que sufren estos compuestos al llegar al tracto gastrointestinal, las cuales influyen en la absorción de éstos. Aunque algunos polifenoles pueden ser absorbidos en el intestino delgado, la gran mayoría llegan intactos al colon,

donde se modifican por interacción con la microbiota y se transforman en metabolitos fenólicos que ya pueden ser absorbidos y distribuidos por el organismo (Santos-Buelga et al., 2019). Por tanto, cabe tener en cuenta que la concentración de fenoles que realmente llega a los órganos diana puede ser distinta a la de compuestos originales en los alimentos (Brglez et al., 2016; Santos-Buelga et al., 2019)

Si nos centramos en los flavonoides, grupo polifenólico que se va a identificar y cuantificar en este trabajo, la gran mayoría, excepto los flavonoles, presentan formas glicosiladas. La gran parte de los glucósidos son resistentes a la hidrólisis ácida del estómago y llegan intactos al intestino delgado, donde se hidrolizan con las enzimas β -glucosidasa y la lactasa-florizina hidrolasa, y la parte restante, aún sin digerir, pasa al colon para ser digerida por la microbiota para hacer posible su asimilación (Quiñones et al., 2012).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular y presentan una estructura química común, que consta de dos anillos aromáticos (A y B) unidos entre sí por tres átomos de carbono que a su vez forman un anillo heterocíclico oxigenado (C). Tal y como se muestra en la Figura 1.

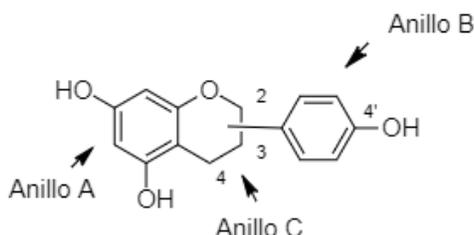


Figura 1: Estructura general de los flavonoides.

Fuente: Arturo-Calvache et al., 2020.

Según la sustitución de este último anillo (C), se identifica la subclase a la que pertenece cada compuesto (flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles) como se observa en la Figura 2.

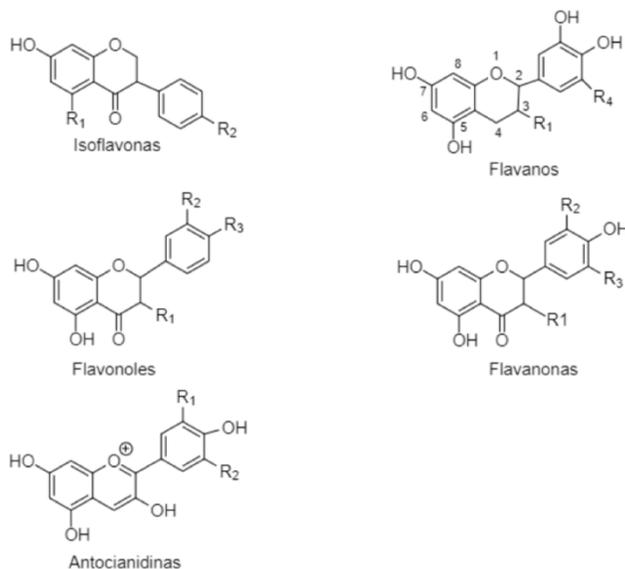


Figura 2: Estructura de las subclases de flavonoides.

Fuente: Arturo-Calvache et al., 2020.

En los cítricos, concretamente en la piel de la naranja, los flavonoides mayoritarios son las flavanonas glicosiladas como son la narirutina y la hesperidina. Además, presentan, en menor cantidad, flavonas polimetoxiladas como son la sinensetina, la nobiletina y la tangerenina (Arturo-Calvache et al., 2020).

Los flavonoides son compuestos exógenos que deben ser adquiridos a través de la dieta y son considerados antioxidantes no enzimáticos y, concretamente, están clasificados como antioxidantes primarios (Arturo-Calvache et al., 2020). Investigaciones exponen que existe una correlación entre la estructura química de los flavonoides con su actividad antioxidante. Pero, como el número de derivados flavonoides es muy amplio, sus actividades antioxidantes también son muy variadas. Estos compuestos previenen la oxidación, o la retrasan, actuando como donantes de electrones (agentes reductores) evitando así la muerte celular en las personas. Además, presentan propiedades quelantes, secuestradoras de hierro y de radicales libres, lo que impide la actuación de las oxidasas. Por este motivo, incluidos de forma regular en la dieta ayudan a prevenir numerosas enfermedades contribuyendo al buen mantenimiento de la salud humana (Rocha-Santafe et al., 2022).

En cuanto a la preparación de las muestras y su posterior análisis, los métodos rutinarios utilizados para la separación, detección e identificación de compuestos están en constante revisión. A día de hoy no existe un procedimiento estándar para la extracción de todos los compuestos polifenólicos ni para separar las diferentes clases de polifenoles. Lo que sí está claro es que existen polifenoles libres y ligados a los tejidos de los vegetales. Estos últimos se asocian a los polisacáridos (fibra dietética), a las proteínas o simplemente unidos entre sí formando compuestos de alto peso molecular, lo que dificulta su extracción (Arranz-

Martínez et al., 2010). Los métodos rutinarios de análisis de estos compuestos no contemplan esta distinción.

Para extraer los polifenoles libres, hay un consenso en la mayoría de las metodologías. Se hace una única extracción en la que se utiliza un disolvente acuoso-orgánico, como es el metanol, bien sea de forma pura o con mezclas de algunos de ellos (etanol, propanol, acetona, agua) (Antolovich et al., 2000; Arranz-Martínez et al., 2010).

Si bien es cierto que la mayoría de polifenoles presentes en los alimentos se encuentran en la fracción libre, en el residuo que queda tras su extracción permanece una parte considerable de los polifenoles totales del alimento (Alu'Datt et al., 2017; Arranz-Martínez et al., 2010). A pesar de ello, la mayoría de los estudios sobre el contenido de polifenoles, se basan en los extractos acuoso-orgánicos desechando el residuo procedente de la misma extracción y, por tanto, desechando parte de los polifenoles totales que han quedado sin extraer. Algunos ejemplos recientes son los estudios de Montero et al. (2022) que, para la extracción de compuestos antioxidantes, realizan una única extracción con una mezcla de acetona y agua; o el ejemplo de Grande-Tovar et al. (2020) en cuyo estudio se dejó macerar la fruta con un disolvente hidrometanólico y etanol en etapas distintas; también el estudio de Herrera et al. (2022), donde se determinó la actividad antioxidante directamente del néctar de fruta sin realizar ninguna extracción previa; o Tierra-Orozco et al. (2022), que llevaron a cabo una extracción solvente-sólido sin el uso de calor y el disolvente empleado fue etanol. Todos estos ejemplos, tienen en común la falta de extracción de los compuestos fenólicos que se encuentran ligados a las estructuras vegetales, ya que, por lo general realizan una única etapa de extracción, en lugar de realizar varias consecutivas, no emplean calor para facilitar las extracciones (en un rango de entre 50-70 °C es suficiente para ayudar a la extracción) (Valdés-Hernández et al., 2015) y, en ningún caso, utilizan reactivos ácidos o básicos para llevar a cabo las reacciones de hidrólisis que facilitan su liberación.

Para poder extraer, además, la fracción ligada de polifenoles, como son los taninos condensados, los polifenoles hidrolizables y los compuestos de alto peso molecular, es necesario realizar reacciones de hidrólisis, tanto ácidas como básicas, con el fin de hidrolizar posibles enlaces éster que impiden la extracción de estos compuestos. No obstante, una vez extraídos los polifenoles totales, en el momento de su cuantificación en base a patrones conocidos, se debe tener en cuenta que es probable que las hidrólisis hayan degradado alguna estructura polifenólica y que es posible que ciertos compuestos no sean del todo cuantificables (Alu'Datt et al., 2017; Arranz-Martínez et al., 2010).

En base a lo descrito, este trabajo pretende demostrar la necesidad de realizar métodos más exhaustivos a la hora de extraer los compuestos polifenólicos de las muestras para que la cuantificación de los mismos tenga la mayor concordancia posible con el contenido real en frutas y verduras.

2. OBJETIVO

El principal objetivo de este trabajo final de grado es conocer el interés de cuantificar y extraer los compuestos fenólicos libres y ligados a las paredes celulares, en relación con la actividad antioxidante de cada fracción. Para ello se trabajará con el coproducto del zumo de naranja, antes y después de su liofilización, sin y con diferentes biopolímeros añadidos. Se comparará el contenido en fenoles obtenido por un método convencional, que sólo extrae una fracción, con otro más exhaustivo que permite obtener hasta 4 fracciones. Además, para tratar de identificar los flavonoides mayoritarios y su contribución a la actividad antioxidante, se estudiará su perfil en todos los extractos obtenidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materias primas

3.1.1. Coproducto del zumo de naranja

El coproducto del zumo de naranja, utilizado como materia prima para los análisis realizados en este trabajo, se aprovechó de los descartes, tras obtener el zumo (Speed Up, Zumex, Valencia, España), de la cafetería de la Facultat de Belles Arts Sant Carles, en la Universidad Politècnica de València.

3.1.2. Biopolímeros

Para la obtención de las distintas formulaciones del coproducto utilizado en este trabajo se utilizaron dos biopolímeros, goma Arábica (GA, Scharlab, Sentmenat, España) y almidón esterificado con ácido octenil succínico (OSA, Nutriose FM10 ©, Roquette, Benifaió, España).

3.1.3. Aparatos

- Nevera Liebherr ProfilLine (Bulle, Suiza)
- Baño caliente (Pensilvania, Estados Unidos)
- Bomba de vacío KNF laboport neuberger (Friburgo de Brisgovia, Alemania)
- Centrifugadora Gyrozen 1236r (Gimpo, Korea)
- Emulsionadora Eurofred (Valencia, España)
- Liofilizador Telstar LYOQUEST-55 (Madrid, España)
- Robot de cocina Thermomix TM 21, Vorwerk (Wuppertal, Alemania)
- Estufa J.P. Selecta (Barcelona, España)
- Valorador automático Karl Fischer Mettler Toledo, Compact Coulometric Titrator C10S (Worthington, Estados Unidos).
- Tamizadora AMP0.40 CISA (Barcelona, España)
- Balanza de ± 1 mg de precisión Mettler Toledo MS3035 (Barcelona, España).
- Vortex Advanced Vortex Mixer, ZX3, VELP® SCIENTIFICA (Usmate Velate, Italia).
- Agitador magnético MS-51M Jeio Tech (Oxfordshire, Reino Unido)
- Arcón congelador Liebherr LGT 2325 (Bulle, Suiza)
- Espectrofotómetro V-1200 VWR, VWR, Radnor (PA, USA)
- UHPLC (Jasco, Italia), con bomba ternaria (Jasco PU-1580), generador de gradiente (LG-1580-02 TernaryGradiente Unit), detector UV-visible (MD-1510), columna Synergi 4 μ m Hydro-RP (Phenomenex) (Madrid, España).

3.2. Metodología

3.2.1. Obtención del coproducto en polvo

El coproducto se lavó con agua corriente para eliminar suciedad de tierra y/o impurezas presentes en la piel. También se eliminaron minuciosamente los pedúnculos y las pepitas y se cortó en 4 porciones cada mitad de corteza de naranja. Este producto fue conservado en refrigeración (4 °C) hasta su uso.

Más tarde, con la ayuda de la emulsionadora, se trituró y homogeneizó el coproducto, durante 5 minutos, con agua y/o las disoluciones que se muestran en la **Tabla 1**, para obtener los 5 coproductos en polvo, objeto de este estudio. Las disoluciones de GA y OSA se prepararon 24 horas antes de su incorporación en la emulsionadora y se conservaron en frío.

Los Bp se añadieron en concentraciones de 25 y 45 g de Bp /100 g coproducto (bs). Estos fueron incorporados al coproducto fundamentalmente con fines estabilizantes, aunque también como encapsulantes (González et al., 2019). Para determinar las cantidades de OSA y GA necesarias para formular las muestras, se tuvo en cuenta el trabajo realizado por Silva-Espinoza et al. (2020). En este trabajo se utilizan 0,45 g Bp/g coproducto (bs) porque es la formulación que garantiza la máxima calidad del puré de naranja liofilizado. Sin embargo, el coproducto que se utilizó en este estudio tiene considerablemente una mayor cantidad de fibra que la pulpa de la fruta. Por ello, como los Bp se añaden para retrasar la formación de puentes interpartícula responsables del desarrollo de fenómenos de pegajosidad en el polvo (Silva-Espinoza, Camacho, et al., 2020) y la propia fibra del coproducto puede ejercer este papel estérico, se decidió incorporar también una formulación con menor concentración de GA (0,25 g de biopolímero/g coproducto (bs)). La cantidad de agua utilizada durante el triturado fue la mínima necesaria para garantizar un producto homogéneo, sin excederse para así facilitar el posterior liofilizado.

Tabla 1. Composición de las diferentes formulaciones del coproducto y códigos asignados a los correspondientes coproductos en polvo obtenidos (muestra).

MUESTRA	Coproducto (g)	OSA (g)	GA (g)	H ₂ O (mL)*	H ₂ O (mL)**
CoP	750	-	-	-	283,5
OSA25	750	52,5	-	157,5	126
OSA45	750	94,5	-	283,5	-
GA25	750	-	52,5	157,5	126
GA45	750	-	94,5	283,5	-

*Cantidad de agua en la que se diluye el biopolímero para incorporar en la formulación.

**Cantidad de agua que se añade en la formulación.

Las mezclas obtenidas según lo descrito se extendieron uniformemente en distintas bandejas de aluminio de 25 cm de diámetro con un espesor de 1 cm (comprobado con un pie de rey en distintos puntos de la bandeja). Estas bandejas se conservaron en el arcón congelador a -45 °C.

Una vez transcurridas mínimo 48 horas en congelación a -45 °C, las bandejas se transportaron en una cámara isoterma a secar en el liofilizador. Las condiciones de secado fueron -50 °C en el condensador, presión de 0,05 mbar y bandejas calefactadas a 50 °C

durante 21 horas. Una vez obtenidas las tortas deshidratadas se conservaron en bolsas ZIP herméticas sin aire en su interior, para evitar la humectación del producto seco. Estas bolsas, a su vez, se guardaron dentro de un desecador con sílica gel en refrigeración (4 °C) hasta el momento de trituración.

Las tortas liofilizadas se trituraron, en tandas de 40 g, con ayuda del robot de cocina durante 20 segundos a velocidad 5. El polvo obtenido tras la trituración se tamizó con la tamizadora hasta obtener un polvo de tamaño de partícula <200 µm. Este polvo fino se guardó en bolsas ZIP herméticas y en refrigeración (4 °C).

3.2.2. Determinaciones analíticas

Todas las muestras de coproducto en polvo obtenidas (**Tabla 1**) se analizaron, por triplicado, según se describe a continuación. Además, se determinó el contenido en agua y la solubilidad de las 5 formulaciones preparadas antes de liofilizar.

3.2.2.1. Humedad

Para las formulaciones antes de liofilizar se aplicó el método gravimétrico de doble pesada. Las muestras, previamente pesadas, se secaron en la estufa a vacío a 60 °C hasta peso constante. Una vez secas, las muestras fueron pesadas en la balanza de ±1 mg de precisión. Para determinar el contenido en agua de los coproductos en polvo, se realizó una valoración coulométrica con el valorador automático Karl Fisher. La humedad se expresó en g de agua por 100 g de producto.

3.2.2.2. Solubilidad

Con el fin de calcular la solubilidad, en primer lugar, fue necesario determinar el contenido en sólidos solubles (SS). Para ello se utilizó el método propuesto por Córdoba-Sequeira et al. (2008).

En un tubo graduado de centrífuga de 15 mL se introdujo 1 g de la muestra y 9 mL de agua destilada. A continuación, se agitó durante 30 segundos en el agitador Vortex. Pasadas 24 h de reposo a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min, a 20 °C. Se decantó el sobrenadante en un crisol y se secó en estufa durante 48 h a 60 °C para, posteriormente, proceder a un secado a vacío a 60 °C hasta peso constante (Mss1). Al precipitado obtenido tras la decantación del sobrenadante se le añadieron 8 mL de agua, se agitó con el Vortex y se dejó en reposo 24 horas. Pasado este tiempo se repitió el proceso de centrifuga y decantación y nuevamente se secó el sobrenadante hasta peso constante (Mss2) y se rehidrató el precipitado con 8 mL de agua dejándolo 24 horas en reposo. Finalmente se repitió la centrifugación y la decantación por última vez y, tras el secado del sobrenadante, se obtuvo (Mss3). Los sólidos solubles totales se obtuvieron según la **Ecuación 1**.

$$SS_t = M_{ss1} + M_{ss2} + M_{ss3} \quad \text{Ecuación 1.}$$

Según el procedimiento descrito por Mimouni et al. (2009), la solubilidad es la relación entre los sólidos solubles y los sólidos totales (ST), como se muestra en la **Ecuación 2**. Los sólidos totales se determinaron por diferencia de peso entre el peso del polvo y su humedad.

$$SD = SS/ST * 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

3.2.2.3. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se extrajeron y cuantificaron haciendo uso de un método convencional y de otro que permite extraer, por separado, las fracciones de compuestos fenólicos libres y ligados a las paredes celulares. El contenido fenólico se expresó como mg GAE/100 g solutos CoP. Para este cálculo se tuvo en cuenta la humedad de CoP y la cantidad de Bp añadido en cada muestra.

3.2.2.3.1. Extracción de compuestos fenólicos totales (método convencional)

Para esta extracción, se empleó MeOH:H₂O (70:30) como disolvente de extracción. A 2,5 g de las formulaciones de coproducto preparadas (**Tabla 1**) o a 0,6 g de los correspondientes coproductos en polvo, se le añadieron 9 mL del disolvente de extracción. Se mantuvo en agitación magnética durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se tomó el sobrenadante y se conservó a -45 °C en un arcón congelador en botes herméticos hasta su uso para los análisis correspondientes.

3.2.2.3.2. Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos extraídos por el método convencional

Se utilizó el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu propuesto por Silva-Espinoza et al. (2020). Para ello, en matraces aforados de 25 mL, protegidos de la luz directa, se introdujeron 250 µL del extracto de fenoles obtenido con 15 mL de agua bidestilada y 1,25 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Esta mezcla se dejó reposar durante 8 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación se le añadieron 3,75 mL de una disolución de carbonato de sodio 7,5% (p/v) y se enrasó el matraz hasta 25 mL con agua bidestilada, se dejó reposar durante 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Paralelamente se preparó un blanco con el mismo procedimiento descrito, sustituyendo los 250 µL de extracto por 250 µL agua bidestilada. Se dejó reposar durante 1 hora más, para que se desarrollara el color verde y se midió con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm.

3.2.2.3.3. Extracción de las fracciones de compuestos fenólicos libres y ligados

Para su determinación se llevaron a cabo varias extracciones consecutivas, en las muestras liofilizadas y antes de liofilizar (**Figura 1**).

Los extractos para la determinación de los compuestos fenólicos libres y ligados (FP y BP por las siglas en inglés de *free* y *bound phenolics*, respectivamente) se obtuvieron con el método descrito por Alu'Datt et al. (2017). Para FP se mezcló 1 g de muestra liofilizada o 2,5 g de muestra fresca con 25 mL de metanol y se mantuvo en agitación a 600 rpm, durante 1 hora, a 30 °C, en condiciones de oscuridad. Seguidamente la mezcla se filtró a vacío utilizando papel de filtro (Whatman 1). El filtrado 1 (**Figura 1**) se conservó a -45 °C en el arcón congelador en botes herméticos a la espera de futuros análisis y se identificó como extracto de polifenoles libres a 30 °C (FP30). El residuo 1 (**Figura 1**) se trató nuevamente de la misma forma descrita para la muestra, pero, en este caso, a 60 °C. El filtrado 2 (**Figura**

1) se conservó a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ en botes herméticos y se identificó como extracto de polifenoles libres a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (FP60).

Con el residuo 2 (**Figura 1**), procedente de la extracción de FP60, se realizó una hidrólisis básica para extraer parte de los compuestos ligados. A este residuo se le añadieron 25 mL de NaOH 0,1 N y se mantuvo en agitación a 600 rpm, durante 24 horas, a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, en condiciones de oscuridad. Seguidamente la mezcla se filtró a vacío utilizando el papel de filtro. Al filtrado 3 (**Figura 1**) se le añadió 25 mL de MeOH y se mantuvo en agitación a 600 rpm, durante 1 hora a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se conservó a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ en botes herméticos y se identificó como extracto básico de fenoles ligados (BPB). Por otro lado, se siguieron liberando polifenoles ligados del residuo procedente de la extracción anterior. Para ello, el residuo 3 (**Figura 1**) se hidrolizó con 25 mL de HCl pH 2,0 en agitación a 600 rpm durante 24 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en condiciones de oscuridad. Pasado este tiempo, se filtró a vacío y el filtrado 4 (**Figura 1**) se mezcló con 25 mL de MeOH y se mantuvo en agitación a 600 rpm, durante 1 hora a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se conservó a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$ en botes herméticos y se identificó como extracto ácido de fenoles ligados (BPA).

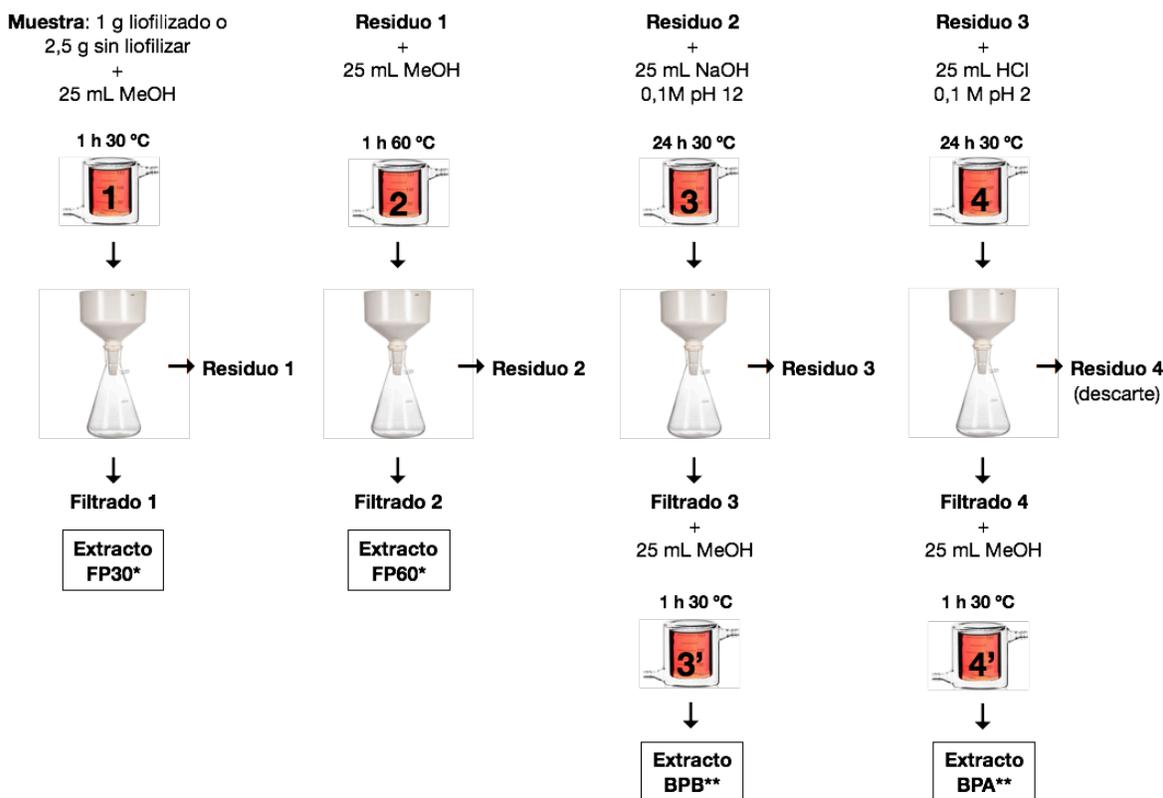


Figura 3: Procedimiento para la extracción de las fracciones para la determinación de los polifenoles libre y ligados.

* Fracciones correspondientes a los polifenoles libres.

** Fracciones correspondientes a los polifenoles ligados.

3.2.2.3.4. Cuantificación del contenido de compuestos fenólicos extraídos en las fracciones de fenoles libres y ligados

Se utilizó el mismo método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu modificado por Alu'Datt et al. (2017). Para la estandarización se utilizó el ácido gálico (1 mg/mL) para realizar una recta patrón. Se preparó un blanco con 8,5 mL de agua destilada con 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Paralelamente se mezcló 1 mL de extracto fenólico con 7,5 mL de agua destilada con 0,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. La mezcla se dejó reposar durante cuatro minutos a temperatura ambiente. Después se le añadió 1 mL de disolución de carbonato sódico al 5% a fin de neutralizar la reacción. Se dejó reposar durante 1 hora más, para que se desarrollara el color verde y se midió con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 725 nm.

3.2.2.4. Determinación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante (AOA) de todas las muestras, antes y después de su liofilización, fue determinada mediante el método del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) basado en la reducción del radical DPPH· a DPPH-H. El radical presenta una coloración violeta y absorbancia a 515 nm. Este análisis se realizó en base al método descrito por (Brand-Williams et al., 1995; Puupponen-Pimiä et al., 2003; Sánchez-Moreno et al., 2003).

Se preparó con 0,003 g de DPPH aforado a 100 mL con MeOH asegurando un valor absorbancia a 515 nm entre 0,9-1. Este reactivo se preparó el mismo día del análisis y se conservó en oscuridad y frío hasta el momento de su uso. A continuación, se preparó un control con 3,9 mL del reactivo DPPH con 100 μ L de disolvente de extracción correspondiente según la muestra. Se midió su absorbancia a 515 nm a tiempo 0 (t_0) y se tomó ese valor como valor de absorbancia control que se denominó Acontrol. A continuación, se prepararon las muestras con 3,9 mL del reactivo DPPH con 100 μ L de extracto. Se midió su absorbancia a 515 nm a los 15 minutos y se tomó ese valor (Amuestra). Para calcular el %DPPH se utilizó la **Ecuación 3**.

$$\%DPPH = \left(Acontrol - \frac{Amuestra}{Acontrol} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

Para determinar cuantitativamente el porcentaje de inhibición del DPPH se prepararon disoluciones de Trolox (Sigma-Aldrich, Alemania) de concentración conocida y se midió su AOA para poder obtener la recta patrón con este reactivo, expresando de esta forma el resultado en milimoles equivalentes de Trolox/100 g s.s.

3.2.2.5. Perfil de flavonoides

Se analizó por UHPLC. Para ello se introdujo 1 mL de cada extracto de fenoles totales en viales opacos de HPLC. Como fase móvil se empleó MeOH y H₂O grado HPLC. La velocidad de flujo fue 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 10 μ L. Una vez obtenidos los perfiles, la identificación se realizó a longitud de onda 284 nm. Para la cuantificación de hesperidina (HES) y narirutina (NAT) se utilizaron las correspondientes rectas patrón en un intervalo de concentraciones de 100 a 2000 ppm (Dr. Ehrenstorfer, Alemania). Para la cuantificación del resto de flavonoides identificados se utilizó el método del patrón interno, empleándose, para ello, la hesperidina (Inbaraj et al., 2010).

3.3. Análisis estadístico

Para poder determinar las diferencias significativas entre las muestras analizadas y las diferencias entre las fracciones de las distintas muestras, se realizó un análisis estadístico de varianza simple (ANOVA) con ayuda del programa informático Statgraphics Centurion versión XVIII con un nivel de confianza del 95% ($p\text{-value} < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Contenido en humedad y solubilidad

La **Tabla 2** muestra los resultados del contenido en agua y la solubilidad de las muestras estudiadas. Los valores de humedad se han utilizado para poder comparar la composición de las muestras en cuanto a compuestos fenólicos y su actividad antioxidante. Tras la liofilización se observa, como era de esperar, un gran descenso del contenido en agua de las muestras desde un 70 y un 85% en muestras sin liofilizar hasta estar por debajo del 4% en muestras liofilizadas. Al realizar este análisis, las muestras que llevan incorporados los biopolímeros (OSA o GA) resultaron tener un contenido en agua ligeramente inferior a la muestra sin biopolímero CoP.

La solubilidad se analizó para comprobar si había relación entre los compuestos fenólicos ligados a la pared celular y relacionados con la fibra insoluble. Las muestras con mayor concentración de biopolímero (OSA45 y GA45) dieron valores de solubilidad más altos que los obtenidos en las muestras con menor cantidad o nula de biopolímero (OSA25, GA25 y CoP).

Tabla 2: Contenido de agua de las muestras, antes (x_w) y después de liofilizar (x_w^L), y solubilidad del polvo liofilizado de cada muestra.

MUESTRA	x_w (%)	x_w^L (%)	Solubilidad (%)
CoP	85,63	3,60	49,14
OSA25	84,99	2,10	62,79
OSA45	71,74	2,20	64,21
GA25	84,58	2,90	58,15
GA45	80,44	3,00	67,44

4.2. Compuestos fenólicos

A continuación, en las **Tablas 3, 4 y 5**, se muestran los resultados obtenidos sobre el contenido fenólico. En estas tablas, está reflejado el resultado del contenido en fenoles totales analizado en las distintas muestras, tanto por el método convencional como por el de las fracciones de fenoles libres y ligados.

De forma global, si para las muestras de coproducto antes y después de liofilizar nos fijamos en la suma de los fenoles cuantificados en las diferentes fracciones y los comparamos con los del método convencional, cabe destacar que, en todos los casos, por el método convencional se extrae entre un 22 y un 53% menos de fenoles que por el de fracciones, para las muestras antes de liofilizar, y entre un 30 y un 55% menos, para las muestras liofilizadas, dependiendo de que las muestras lleven o no biopolímeros añadidos, respectivamente. Con respecto al método de fracciones, también de forma global, podemos observar que la proporción de polifenoles libres:ligados es del orden de 75:25, tanto para las muestras antes de liofilizar como las liofilizadas, siendo FP30 la fracción donde más compuestos se extraen (en torno a un 60% y 70% del total antes y después de liofilizar, respectivamente). En la fracción de fenoles ligados, siempre se extrae mayor cantidad de

polifenoles tras la primera hidrólisis básica (14% del total de fenoles frente al 8% con la hidrólisis ácida).

En la **Tabla 3**, en el producto antes de liofilizar, si nos centramos en los resultados de la extracción de fenoles totales por el método convencional (columna FT) podemos ver cómo las muestras no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$) comparado con los resultados de la fracción FP30, que corresponde a la primera fracción de compuestos libres extraída, excepto la muestra GA45 para la que se extrajeron más fenoles por el método convencional ($p > 0,05$). No obstante, puede verse cómo, por el método de las fracciones, en FP60, BPB y BPA, aunque en menor cantidad, se siguen extrayendo compuestos fenólicos.

Cuando nos fijamos en los resultados del ANOVA según las muestras, vemos como, en el método convencional, GA45 es la que más compuestos fenólicos presenta seguido de CoP y OSA25 y, por último, de OSA45 y GA25 ($p < 0,05$). Siguiendo con la fracción FP30, los grupos homogéneos de muestras corresponden a OSA45, GA25 y GA45, por un lado, y por otro CoP y OSA25 ($p > 0,05$). También ocurre en la fracción FP60 donde se muestra como OSA45, GA25 y GA45 no presentan diferencias significativas, pero sí lo hacen CoP y OSA25 entre ellas mismas y el resto de las muestras. Por último, en las fracciones ligada, apenas hay diferencias significativas entre las muestras.

Tabla 3: Contenido fenólico (mg GAE/100 g solutos CoP) en las muestras antes de la liofilización (códigos de las muestras según la Tabla 1). Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones.

MUESTRA	FT	FP30	FP60	BPB	BPA	Σ fracc.
CoP	501 ± 41 (B,c)	531 ± 50 (B,c)	270 ± 29 (C,b)	163 ± 26 (B,a)	101 ± 29 (B,a)	1065
OSA25	536 ± 62 (B,c)	596 ± 7 (B,c)	191 ± 48 (B,b)	152 ± 28 (B,ab)	77 ± 10 (A,a)	1015
OSA45	384 ± 59 (A,b)	416 ± 42 (A,b)	105 ± 13 (A,a)	82 ± 4 (A,a)	50 ± 3 (A,a)	652
GA25	381 ± 40 (A,c)	446 ± 26 (A,c)	87 ± 26 (A,a)	158 ± 16 (B,b)	59 ± 5 (A,a)	818
GA45	635 ± 3 (C,d)	495 ± 45 (A,c)	110 ± 25 (A,ab)	140 ± 8 (B,b)	72 ± 14 (A,a)	818

Entre paréntesis y en color gris se indican los grupos homogéneos obtenidos a partir del estudio estadístico. Letras iguales en mayúsculas identifican, para cada fracción, los grupos homogéneos según el factor muestra y en minúsculas, para cada muestra, los grupos según el factor fracción.

Tal y como se aprecia en la tabla recién comentada, podemos deducir que, por lo general, en el método convencional se obtiene un extracto fenólico comparable al obtenido en la primera fracción de fenoles libres (extracto FP30). No obstante, con el método de las fracciones aún es posible extraer un 29, 44 o 53% más de estos compuestos para las muestras con GA, OSA o sin Bp, respectivamente. Con este método, para las muestras antes de liofilizar, los extractos FP30, FP60, BPB y BPA suponen un 58, 17, 16 y 8% de los fenoles totales que se consiguen extraer. Por tanto, no parece recomendable evitar ninguna de las 4 extracciones.

En la **Tabla 4**, en el producto liofilizado, los resultados de la extracción de fenoles totales por el método convencional resultaron en un menor contenido fenólico que la fracción libre FP30 del método de fracciones aunque, en este caso, las diferencias no llegaron a ser significativas ($p > 0,05$) para las muestras con OSA. De la misma forma que en el caso

anterior, a medida que se obtienen las siguientes fracciones, se sigue extrayendo contenido fenólico en menor proporción ($p < 0,05$).

Centrándonos en las diferencias entre muestras, según los resultados del análisis estadístico, vemos cómo en los resultados del método convencional, OSA25 presenta menor contenido de compuestos fenólicos ($p < 0,05$) que el resto de las muestras, y de igual forma ocurre con la fracción FP30. La muestra GA45 es la que presenta mayor contenido en fenoles ($p < 0,05$) en FP60 y BPA. Por último, en la primera fracción de ligados BPB, no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguna de las muestras.

Tabla 4: Contenido fenólico (mg GAE/100 g soluto CoP) en las muestras liofilizadas (códigos de las muestras según la Tabla 1). Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones.

MUESTRA	FT	FP30	FP60	BPB	BPA	Σ fracc.
CoP	432 ± 25 (B,b)	505 ± 36 (B,c)	54 ± 15 (A,a)	71 ± 26 (A,a)	64 ± 7 (AB,a)	721
OSA25	372 ± 39 (A,b)	388 ± 39 (A,b)	70 ± 21 (A,a)	85 ± 30 (A,a)	39 ± 3 (A,a)	573
OSA45	488 ± 42 (B,c)	504 ± 12 (B,c)	98 ± 9 (A,b)	57 ± 3 (A,a)	46 ± 11 (A,a)	724
GA25	457 ± 81 (B,b)	571 ± 36 (B,c)	97 ± 15 (A,a)	76 ± 17 (A,a)	56 ± 9 (A,a)	801
GA45	458 ± 30 (B,c)	584 ± 13 (B,d)	144 ± 8 (B,b)	94 ± 27 (A,a)	104 ± 12 (B,ab)	927

Entre paréntesis y en color gris se indican los grupos homogéneos obtenidos a partir del estudio estadístico. Letras iguales en mayúsculas identifican, para cada fracción, los grupos homogéneos según el factor muestra y en minúsculas, para cada muestra, los grupos según el factor fracción.

A modo de resumen, cuando la muestra se encuentra liofilizada, con el método de fracciones, se permite extraer un mayor porcentaje de fenoles que con el método convencional, siendo la fracción FP30 suficiente para superar el contenido en fenoles cuantificado con el método convencional. Con el método de las fracciones se extrae hasta un 47% más en muestras liofilizadas con GA, hasta un 34% en muestras con OSA y hasta un 38% en muestra sin biopolímeros. De esta forma, también en este caso, se recomendaría emplear el método de las fracciones sin obviar ninguna de ellas.

Para analizar el posible efecto de la liofilización en el contenido fenólico se realizaron ANOVAs, para cada muestra, según el factor tipo de muestra (sin y con liofilización) (**Figura 4**). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por el método de extracción convencional, podemos apreciar que se mantuvo el contenido de los fenoles extraídos ($p > 0,05$) en las muestras CoP, OSA25 y GA25 tras la liofilización. Mientras que, en la muestra GA45, por efecto de la liofilización, disminuye ($p < 0,05$), a diferencia de la muestra OSA45, en la que se observa un aumento ($p < 0,05$).

Por otra parte, el contenido total en fenoles analizados a partir de sus fracciones disminuyó con la liofilización en CoP y OSA25 ($p < 0,05$) pero, aunque en el ANOVA no se encontraron diferencias significativas, aumentó en el caso de OSA45, GA25 y GA45 ($p > 0,05$), siendo esta última la que más compuestos fenólicos presentó después de la liofilización. En cuanto al comportamiento de cada una de las fracciones, la muestra CoP manifestó una disminución en FP60 y BPB ($p < 0,05$) tras el liofilizado. En la muestra OSA25 disminuyeron todas las fracciones ($p < 0,05$), excepto BPB que se mantuvo igual ($p > 0,05$). En OSA45 la

liofilización se reflejó sólo en una disminución de los fenoles extraídos en la fracción BPB ($p < 0,05$). En GA25, la fracción FP30 aumentó tras el liofilizado ($p < 0,05$), la fracción BPB disminuyó ($p < 0,05$), y las fracciones FP60 y BPA se mantuvieron iguales ($p > 0,05$). Mientras que, en GA45, se mantuvo sin diferencias significativas ($p > 0,05$), para todas las fracciones extraídas.

Por tanto, la liofilización permite una mayor extracción de los compuestos, cuando el método es en condiciones más extremas, como es el caso del método de fracciones, y cuando lleva incorporado GA o la concentración más alta de OSA. En cuanto a la relación de la extracción de compuestos con la solubilidad determinada de las muestras, no se han encontrado resultados concluyentes. Parece que las diferencias en este parámetro pueden ser debidas a la incorporación de biopolímeros y no al contenido fenólico libre o ligado.

La **Tabla 5** muestra cómo OSA y GA aportan cierta cantidad, aunque mínima, de fenoles a la mezcla. Siendo la hidrólisis básica la que más contenido fenólico extrae, por lo que se deduce que la cantidad significativa a tener en cuenta corresponde a la fracción ligada.

Tabla 5: Contenido fenólico (mg GAE/100 g de biopolímero, bs) en los biopolímeros goma Arábiga (GA) y almidón modificado (OSA) utilizados en la formulación de las muestras.

MUESTRA	FT*	FP30**	FP60**	BPB**	BPA**
OSA	50 (b)	25 (a)	25(a)	66(c)	-
GA	42(b)	8(a)	11(a)	62(c)	-

* Resultados procedentes del análisis de los extractos de fenoles totales

** Resultados procedentes del análisis de los extractos de las fracciones 30, 60, BPB y BPA.

Entre paréntesis, y en color gris se indican los grupos homogéneos obtenidos a partir del estudio estadístico. Letras iguales en minúsculas, para cada muestra, los grupos según el factor fracción.

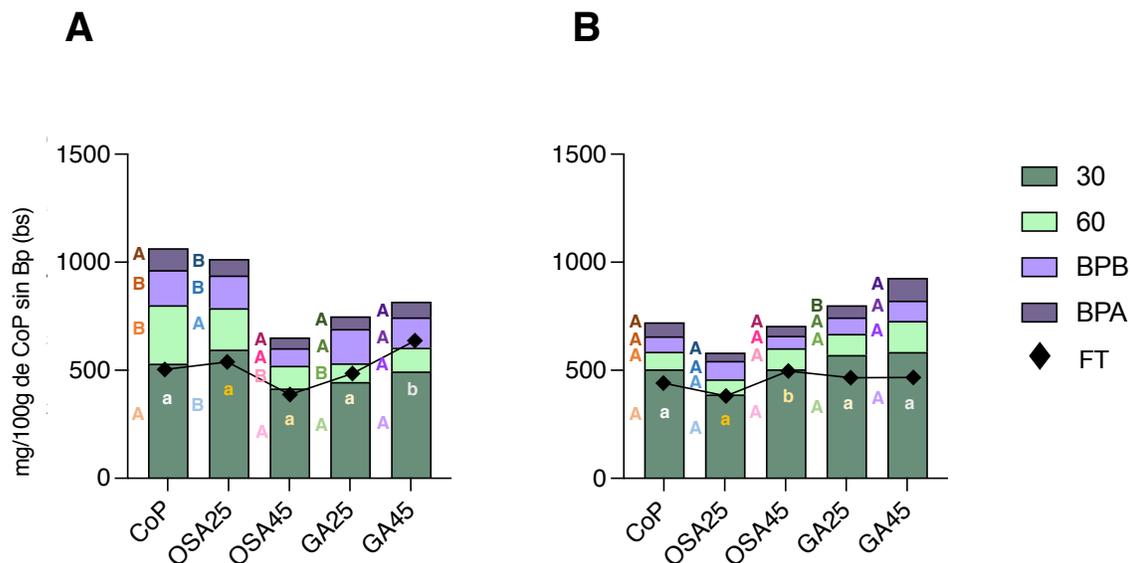


Figura 4: Contenido fenólico en producto sin liofilizar (A) y liofilizado (B) expresados en mg de GAE/100 g solutos de CoP. Muestras CoP, OSA25, OSA45, GA25 y GA45 (códigos de las muestras según la Tabla 1). Las letras indican los grupos homogéneos obtenidos a partir del estudio estadístico (ANOVA). Letras

mayúsculas del mismo color identifican, para cada fracción, los grupos homogéneos según el tipo de muestra (sin y con liofilizado). Letras minúsculas iguales y del mismo color identifican, para fenoles totales por el método convencional, los grupos homogéneos según el tipo de muestra (sin y con liofilizado).

4.3. Actividad antioxidante

En este punto, en concreto en las **Tablas 6, 7 y 8**, se muestran los relacionados con la actividad antioxidante (AOA) de las muestras analizadas.

En la **Tabla 6** se observan los resultados del producto antes de ser liofilizado. De forma general podemos decir que la AOA de las fracciones libres contribuyen entre un 15 y un 35% a la AOA total, mientras que la fracción BPA contribuye entre el 65 y el 80%. Esto implica que la contribución de la fracción BPB en la actividad antioxidantes es mínima. Estos porcentajes dependen del tipo de muestras, cantidad y tipo de biopolímero añadido. De forma más concreta, se observan valores similares de AOA para FT y FP30, aunque existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en las muestras OSA25, OSA45 y GA45 siendo, en los tres casos, mayor la AOA en la fracción FP30. La AOA de FP60 fue menor que FP30 en todos los casos, ($p < 0,05$) y entre las fracciones FP60 y BPB no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). La fracción BPA presentó los valores más altos de actividad antioxidante mostrando diferencias significativas con todos los demás resultados.

Si nos centramos en las diferencias que existen entre las muestras, los valores de AOA mayores ($p < 0,05$), en el caso de FT, se corresponden con OSA25 y GA25. Por otra parte, las muestras GA25 y GA45 son las que presentan mayor AOA en la fracción FP30, como ocurre con las muestras CoP y OSA25 en la fracción FP60, aunque, en ambas fracciones las diferencias entre las muestras son pequeñas. En la fracción ligada BPA fueron las muestras OSA25 y GA25 las que presentaron mayor AOA ($p > 0,05$).

Tabla 6: Actividad antioxidante en producto antes de liofilizar expresados en mmol de Trolox/100 g solutos de CoP (códigos de las muestras según la Tabla 1). Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones.

MUESTRA	FT*	FP30**	FP60**	BPB**	BPA**	Σ fracc.
CoP	1,5 ± 0,2 (B,b)	1,603 ± 0,114 (Ab)	0,658 ± 0,107 (B,ab)	0,12 ± 0,06 (A,a)	4,5 ± 1,1 (A,c)	7
OSA25	2,4 ± 0,2 (B,c)	1,65 ± 0,02 (A,b)	0,70 ± 0,14 (B,a)	0,42 ± 0,18 (B,a)	9,73 ± 0,11 (C,d)	13
OSA45	1,1 ± 0,1 (A,b)	1,6 ± 0,03 (A,c)	0,30 ± 0,11 (A,a)	0,6 ± 0,03 (B,a)	4,76 ± 0,05 (A,d)	7
GA25	1,9 ± 0,2 (B,c)	1,7 ± 0,2 (A,bc)	0,43 ± 0,15 (A,a)	0,78 ± 0,13 (C,ab)	10,1 ± 0,9 (C,d)	13
GA45	0,96 ± 0,5 (A,b)	2,5 ± 0,3 (B,c)	0,26 ± 0,12 (A,a)	0,51 ± 0,08 (B,ab)	7,1 ± 0,3 (B,d)	10

* Resultados procedentes del análisis de los extractos de fenoles totales.

** Resultados procedentes del análisis de los extractos de las fracciones 30, 60, BPB y BPA.

Entre paréntesis, y en color gris se indican los grupos homogéneos obtenidos a partir del estudio estadístico. Letras iguales en mayúsculas identifican, para cada fracción, los grupos homogéneos según el factor muestra y en minúsculas, para cada muestra, los grupos según el factor fracción.

Dados los resultados que se han comentado anteriormente, podemos afirmar que, con el método de fracciones se extraen más compuestos y estos compuestos contribuyen entre un 80 y un 90% más a la actividad antioxidante de las muestras, con respecto a los compuestos extraídos en el método de fracciones y los compuestos extraídos en la última fracción de ligados, tras la hidrólisis ácida, son los que más contribuyen a la AOA total.

En la **Tabla 7** se incluyen los resultados de la AOA en el producto liofilizado. Generalmente, se observa que los extractos obtenidos de las fracciones tienen entre un 15 y 70% más de actividad antioxidante que los extractos obtenidos mediante el método convencional. Estos porcentajes corresponden, de forma muy variada, entre un 15 y un 30% en las fracciones libres, y entre un 65 y un 80% en las fracciones ligadas, según el tipo de muestra y biopolímero que contenga. Además, se aprecia que la AOA de los extractos obtenidos por el método convencional, en todos los casos, es menor a la AOA obtenido con la suma de todas las fracciones.

En cuanto a las diferencias entre muestras, podemos ver cómo para el método convencional la actividad antioxidante no presenta diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ninguna de las muestras. Tampoco las hay en la fracción FP60 y en el caso de FP30 las diferencias son mínimas. En la fracción BPB, los grupos homogéneos ($p > 0,05$) corresponden a las muestras con menor o nula cantidad de biopolímero añadido (CoP, OSA25 y GA25) y en la fracción BPA se ha hallado mayor AOA en la muestra OSA25.

Tabla 7: Actividad antioxidante en producto liofilizado expresados en mmol de Trolox/100 g solutos de CoP (códigos de las muestras según la Tabla 1). Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones. Σ fracc suma del contenido fenólico en las fracciones.

MUESTRA	FT*	FP30**	FP60**	BPB**	BPA**	Σ fracc.
CoP	1,21 ± 0,15 (A,a)	1,18 ± 0,02 (A,a)	0,47 ± 0,13 (A,a)	0,25 ± 0,07 (B,a)	1,2 ± 0,3 (BC,a)	4
OSA25	1,74 ± 0,07 (A,c)	1,29 ± 0,06 (B,b)	0,23 ± 0,08 (A,a)	0,31 ± 0,01 (B,a)	2,8 ± 0,2 (D,d)	4
OSA45	2,2 ± 0,5 (A,c)	1,3 ± 0,1 (B,b)	0,447 ± 0,003 (A,a)	0,45 ± 0,02 (C,a)	1,4 ± 0,1 (C,d)	4
GA25	1,58 ± 0,19 (A,d)	1,25 ± 0,04 (B,c)	0,32 ± 0,04 (A,b)	0,30 ± 0,13 (B,ab)	0,10 ± 0,06 (A,a)	2
GA45	2,3 ± 0,5 (A,c)	1,2 ± 0,1 (A,b)	0,370 ± 0,006 (A,ab)	0,10 ± 0,04 (A,a)	1,1 ± 0,6 (B,b)	3

* Resultados procedentes del análisis de los extractos de fenoles totales

** Resultados procedentes del análisis de los extractos de las fracciones 30, 60, BPB y BPA.

Entre paréntesis y en color gris se indican los grupos homogéneos obtenidos a partir del estudio estadístico. Letras iguales en mayúsculas identifican, para cada fracción, los grupos homogéneos según el factor muestra y en minúsculas, para cada muestra, los grupos según el factor fracción.

La **Tabla 8** muestra la AOA de los biopolímeros OSA y GA. Como se puede ver es una actividad antioxidante mínima la que aportan, considerando, además, que el contenido total de biopolímero supone una parte muy pequeña del total de la muestra.

Tabla 8: Actividad antioxidante en biopolímeros goma Arábica (GA) y almidón modificado (OSA) utilizados en la formulación de las muestras expresados en mmol de Trolox/100 g de biopolímero (bs).

MUESTRA	FT*	FP30**	FP60**	BPB**	BPA**
OSA	0,13	0,04	0	0	-
GA	0,03	0,02	0,6	0,06	-

* Resultados procedentes del análisis de los extractos de fenoles totales.

** Resultados procedentes del análisis de los extractos de las fracciones 30, 60, BPB y BPA.

Entre paréntesis y en color gris se indican los grupos homogéneos obtenidos a partir del estudio estadístico. Letras iguales en minúsculas, para cada muestra, los grupos según el factor fracción.

De los datos recién expuestos sobre los resultados de las muestras liofilizadas, a pesar de observarse una disminución en la AOA respecto de las muestras antes de liofilizar, en los extractos obtenidos con el método de las fracciones siempre se analiza mayor actividad antioxidante que con el método convencional.

4.4. Perfil de flavonoides

La **Figura 5** muestra un ejemplo de cromatograma en el que se observan los picos correspondientes a los flavonoides identificados en este estudio: narirutina (NAT), hesperidina (HES), didimina (DID) y nobiletina (NOB). El compuesto denominado p5 podría ser sinensetina o tangerenina según la bibliografía consultada, pero debería de ser comprobado mediante el análisis de patrones de dichos compuestos (Agudelo et al., 2017; Pérez-Nájera et al., 2013). Cabe decir que, aunque los flavonoides identificados en este trabajo son considerados los mayoritarios, en el caso de la DID, la NOB y el p5 están presentes en cantidades muy por debajo de NAT y HES.

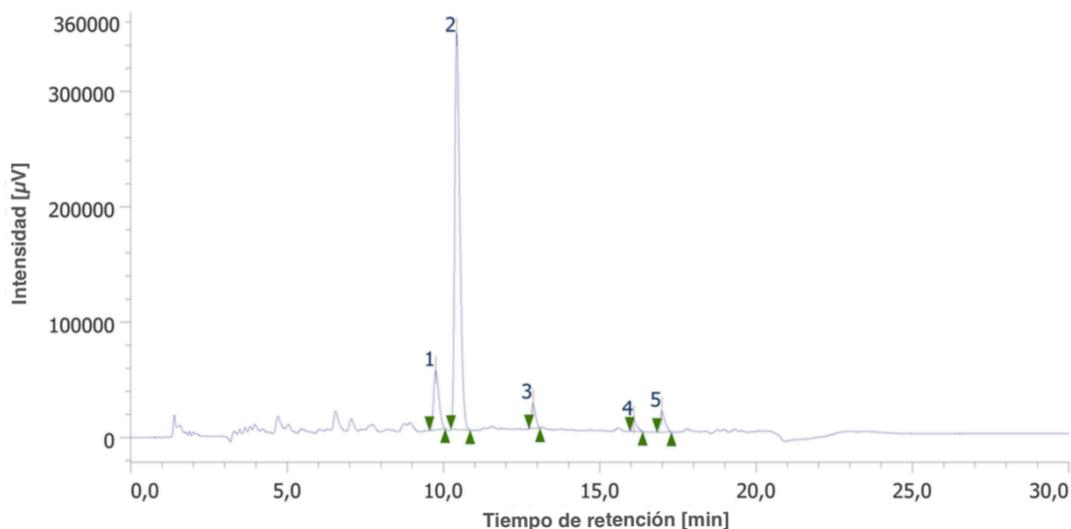


Figura 5: Ejemplo de cromatograma. Perfil de flavonoides de la muestra CoP.

Por orden de aparición en la **Figura 5**, se han identificado los flavonoides. Correspondiendo la narirutina al pico 1, la hesperidina al pico 2, la didimina al pico 3 y la nobiletina al pico 4. Al pico 5 se le ha denominado p5, teniendo en cuenta que se puede tratar de uno de los dos compuestos mencionados anteriormente (sinensetina o tangerenina).

Las **Figuras 6 y 7** muestran el contenido de cada uno de los flavonoides identificados en los perfiles de cada uno de los coproductos analizados, antes y después de ser liofilizados. En todos los casos, después de la liofilización se detectó un menor contenido en flavonoides ($p < 0,05$), del orden de los obtenidos para el puré o el zumo de naranja liofilizado (Silva-Espinoza, Ayed, et al., 2020; Uscanga et al., 2020) cuando la extracción se realiza convencionalmente. Sin embargo, cuando la extracción es por fracciones se observa una pérdida más importante de estos compuestos con la liofilización, debido probablemente al propio proceso de extracción y a la humedad de la muestra.

En una vista general de los resultados obtenidos en cuanto al perfil de flavonoides del coproducto antes y después de ser liofilizado (**Figuras 6 y 7**), se puede afirmar que, la extracción por el método de fracciones, por lo general, es mucho más efectiva ($p < 0,05$). Con este método se llega a extraer entre un 20 y un 95% más que con el método convencional, dependiendo de la muestra, el Bp que lleva incorporado o no y el flavonoide que se cuantifica, en cada caso. Esto ocurre en todos los casos, excepto para el flavonoide narirutina tras liofilizar la muestra.

Por otra parte, entre el 90 y el 95% de cada uno de los flavonoides cuantificados (NAT, HES, DID, NOB y p5) se encuentran en las fracciones libres FP30 y FP60 y, aunque los flavonoides de las fracciones ligadas, BPA y BPB, no contribuyen mucho al total, es suficiente para tenerlas en cuenta, sobre todo la fracción BPB.

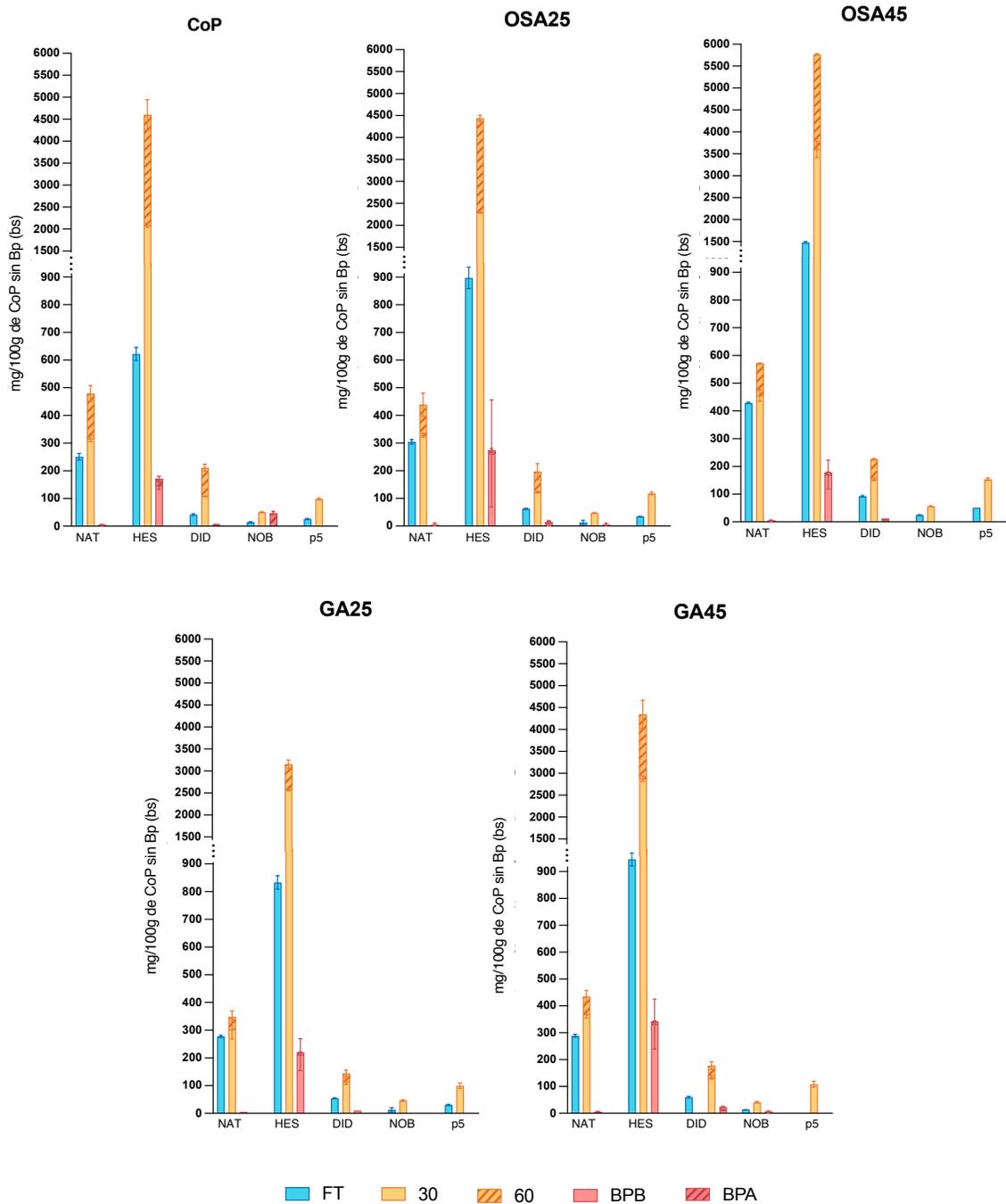


Figura 6: Contenido de flavonoides narirutina (NAT), hesperidina (HES), didimina (DID), nobiletina (NOB) y p5, en las muestras CoP, OSA25, OSA45, GA25 y GA45 antes de la liofilización. FT: extracción por el método convencional. FP30: fracción de flavonoides libres extraídos a 30 °C. FP60: fracción de flavonoides libres extraídos a 60 °C. BPB: fracción de flavonoides ligados extraídos en medio básico. BPA: fracción de flavonoides ligados extraídos con ácido.

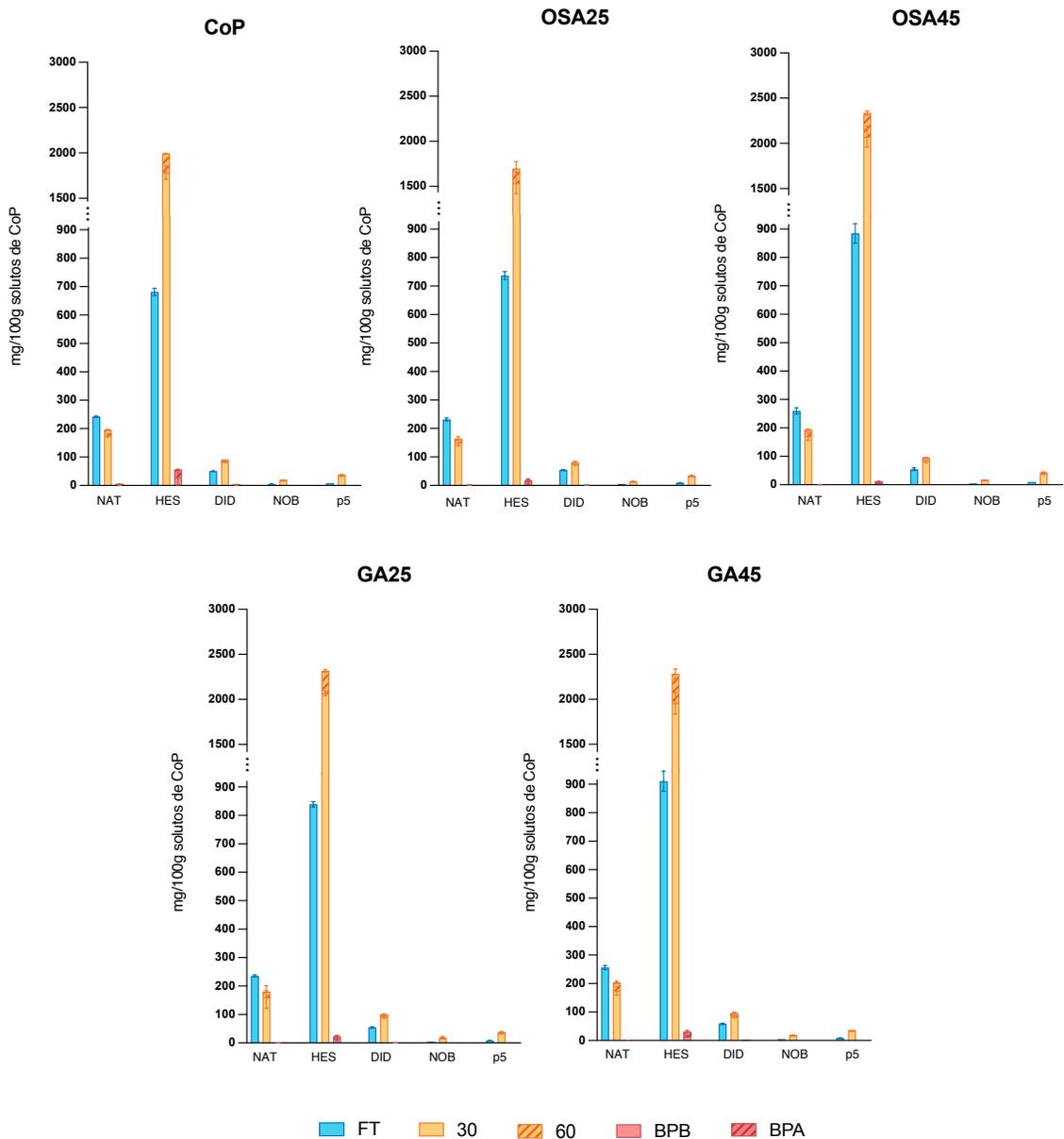


Figura 7: Contenido de flavonoides narirutina (NAT), hesperidina (HES), didimina (DID), nobiletina (NOB) y p5, en las muestras CoP, OSA25, OSA45, GA25 y GA45 liofilizadas. FT: extracción por el método convencional. FP30: fracción de flavonoides libres extraídos a 30 °C. FP60: fracción de flavonoides libres extraídos a 60 °C. BPB: fracción de flavonoides ligados extraídos en medio básico. BPA: fracción de flavonoides ligados extraídos con ácido.

5. CONCLUSIONES

Para el análisis de compuestos fenólicos, se recomienda el método de las fracciones, tanto en las muestras antes de ser liofilizadas como en las liofilizadas. Con este método de extracción, aunque la mayor proporción de polifenoles se obtiene en la fracción libre, los que se encuentran en la ligada no pueden despreciarse, sobre todo teniendo en cuenta la importancia que pueden tener los compuestos ligados a las paredes celulares en la salud, por su mayor capacidad para actuar como prebióticos. Se han podido identificar cuatro compuestos del perfil de flavonoides de las muestras estudiadas, siendo los mayoritarios la hesperidina y la narirutina. Estos flavonoides se encuentran mayoritariamente en la fracción libre.

La actividad antioxidante de los extractos obtenidos mediante el método de las fracciones es mayor que la de los extractos obtenidos por el método convencional, por su mayor contenido en compuestos fenólicos, siendo la actividad antioxidante de la fracción ligada, extraída en medio básico, la más alta. La mayor actividad antioxidante de la fracción ligada, no parece estar relacionada con su contenido de flavonoides, que es bajo, sino con otros compuestos que no se han identificado en este trabajo.

Los biopolímeros incorporados al coproducto parecen proteger a los compuestos durante la liofilización. En el caso de GA, es suficiente con añadirla a la menor de las concentraciones estudiadas, mientras que, en el caso de OSA, sería necesario incorporarlo a la máxima concentración.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo, C. M., & Navarrete-Martínez Nuria. (2017). Selección del mejor proceso para la obtención de pomelo en polvo (*Citrus paradisi*) de alta calidad nutritiva, funcional y sensorial. [Tesis Doctoral]. Universitat Politècnica de Valencia.
- Alu'Datt, M. H., Rababah, T., Alhamad, M. N., Al-Mahasneh, M. A., Ereifej, K., Al-Karaki, G., Al-Duais, M., Andrade, J. E., Tranchant, C. C., Kubow, S., & Ghozlan, K. A. (2017). Profiles of free and bound phenolics extracted from: Citrus fruits and their roles in biological systems: Content, and antioxidant, anti-diabetic and anti-hypertensive properties. *Food and Function*, 8(9), 3187–3197. <https://doi.org/10.1039/c7fo00212b>
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., & Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. In *Analyst* (Vol. 125, Issue 5, pp. 989–1009). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/b000080j>
- Arranz-Martínez, S., & Saura-Calixto, F. (2010). Compuestos polifenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española metodología para su determinación e identificación [Tesis Doctoral]. Universidad Complutense de Madrid.
- Arturo-Calvache, J. E., & Ramírez-Delgadillo, C. J. (2020). Evaluación de la extracción de flavonoides a partir de la cáscara de la naranja. *Protecto integral de grado*. Fundación Universidad de América.
- Asqui, M. A., Cortez, A. A., & Bonilla, S. M. (2022). Efectos de la liofilización en la actividad antioxidante del arazá (*EUGENIA STIPITATA MCVAUGH*).
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity (Vol. 28).
- Brglez, E., Knez Hrnčič, M., Škerget, M., Knez, Ž., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. In *Molecules* (Basel, Switzerland) (Vol. 21, Issue 7). <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>
- Córdoba-Sequeira, A., Martínez-Navarrete, N., & Chiralt-Boix, A. (2008). Caracterización de propiedades relacionadas con la textura de suspensiones de fibras alimentarias. [Tesis Doctoral]. Universidad Politècnica de València.
- González, F., García-Martínez, E., Camacho, M. del M., & Martínez-Navarrete, N. (2019). Stability of the physical properties, bioactive compounds and antioxidant capacity of spray-dried grapefruit powder. *Food Bioscience*, 28, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.009>

- Grande-Tovar, C., Araujo Pabón, L., Flórez López, E., & Aranaga Arias, C. (2020). Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Informador Técnico*, 85(1), 64–82. <https://doi.org/10.23850/22565035.2932>
- Herrera, R. Q., Carlos, J., Ferrel, B., Solís, H. Q., Paredes Valverde, Y., Cahuana Mamani, P., Ángel, M., Coral, V., & Contreras, W. C. (2022). Capacidad antioxidante del néctar de Ungurahui (*Oenocarpus bataua*) Antioxidant capacity of Ungurahui nectar (*Oenocarpus bataua*). *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 42(1), 80–86. <https://doi.org/10.12873/421quispe>
- Inbaraj, B. S., Lu, H., Kao, T. H., & Chen, B. H. (2010). Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(3), 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.09.006>
- Mimouni, A., Deeth, H. C., Whittaker, A. K., Gidley, M. J., & Bhandari, B. R. (2009). Rehydration process of milk protein concentrate powder monitored by static light scattering. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 1958–1965. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.01.010>
- Montero, M. L., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., & Pérez, A. M. (2022). Nutritional composition, content of bioactive compounds, and hydrophilic antioxidant capacity of selected Costa Rican fruits. *Agronomy Mesoamerican*, 33(2). <https://doi.org/10.15517/am.v33i2.46175>
- Pérez-Nájera VC, Lugo-Cervantes EC, Gutiérrez-Lomelí M, & Del-Toro-Sánchez CL. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. www.biotecnia.uson.mx
- 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>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(1), 76–89. <https://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Rocha-Santafe, D. M., & Logroño-Novillo, F. A. (2022). Relación de la estructura química de los flavonoides con la actividad antioxidante. Trabajo fin de grado. Universidad Central del Ecuador.

- 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>
- Santos-Buelga, C., González-Paramás, A. M., Oludemi, T., Ayuda-Durán, B., & González-Manzano, S. (2019). Plant phenolics as functional food ingredients. In *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 90, pp. 183–257). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.012>
- 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). <https://doi.org/10.3390/foods9010032>
- Silva-Espinoza, M. A., Camacho, M.M., & Martínez-Navarrete, N. (2020). Use of different biopolymers as carriers for purposes of obtaining a freeze-dried orange snack. *LWT*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109415>
- Tierra-Orozco, A. G., & Villamarin-Nuñez, H. A. (2022). Efecto de la temperatura en la concentración de la actividad antioxidante del albedo de la toronja Duncan (Citrus Paradisi).
- Trueba, G. P., & Sánchez, G. M. (2001). Los Flavonoides como Antioxidantes Naturales. In *Acta Farm. Bonaerense* (Vol. 20, Issue 4).
- Uscanga, M. A., Camacho, M.M., Salgado, M. A., & Martínez-Navarrete, N. (2020). Influence of an Orange Product Composition on the Characteristics of the Obtained Freeze-dried Cake and Powder as Related to Their Consumption Pattern. *Food and Bioprocess Technology*, 13, 1368–1379. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02485-y/Published>
- Valdés-Hernández, Geidy Vivian, Cruz-Viera, L., & Comet-Rodríguez, R. (2015). Influencia de las condiciones de operación en la extracción de polifenoles a partir de hojas de *Moringa oleifera* Lam. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 46, 135–145.
- Vierci, G. E., & Ferro, E. A. (2018). Capacidad antioxidante total vinculada a la ingesta de vegetales en adultos jóvenes de asunción, paraguay. *Nutrición Hospitalaria*. <https://doi.org/10.20960/nh.02074>