

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Efecto de la trehalosa y de las altas presiones de homogeneización sobre las propiedades físico- químicas y funcionales del zumo de mandarina

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERIA AGROALIMENTARIA Y DEL MEDIO RURAL

ALUMNA: Dña. CARLA PICARD SANZ

TUTORA: Dra. NOELIA BETORET VALLS

COTUTORA: Dra. LUCÍA SEGUÍ GIL

COTUTORA COLABORADORA: Dña. LAURA CALABUIG JIMÉNEZ

Curso Académico: 2014-2015

Valencia, 7 de Julio de 2015

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".



Efecto de la trehalosa y de las altas presiones de homogeneización sobre las propiedades físico-químicas y funcionales del zumo de mandarina

RESUMEN

Los tratamientos en la industria del procesado de zumos afectan en gran medida las propiedades de los mismos. Estudios previos demuestran que es posible mejorar las propiedades físico-químicas y funcionales de los zumos cítricos mediante la incorporación de ingredientes con efecto protector como la trehalosa o mediante la aplicación de una alta presión de homogeneización. En este estudio se plantea el efecto de ambas variables sobre las propiedades físico-químicas y sobre la capacidad antioxidante del zumo de mandarina.

Para ello, se obtuvo zumo de mandarina de la variedad Ortanique, al que se le añadió trehalosa en una cantidad del 10% y 20%. Los zumos con y sin trehalosa fueron sometidos a presiones de homogeneización de 0, 20, 50, 100, 150 MPa. En todas las muestras se determinó el pH, a_w , grados Brix, capacidad de impregnación, tamaño de partícula, pulpa suspendida y turbidez. Así mismo, se midió el contenido en fenoles y flavonoides y la capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH.

Tanto las propiedades físico-químicas como las propiedades antioxidantes se vieron afectadas por la incorporación de trehalosa y la aplicación del tratamiento de HPH. Los efectos más relevantes derivaron de un aumento en la estabilidad de la nube del zumo junto con la liberación de componentes con actividad antioxidante y de una interacción de la trehalosa con compuestos con actividad antirradical de naturaleza hidrofóbica.

Palabras claves: homogeneización, trehalosa, antioxidante, tamaño de partícula.

Effect of trehalose and high homogenization pressures on the physico-chemical and functional properties of tangerine juice

ABSTRACT

Treatments in the juice processing industry greatly affect their properties. Previous studies show that it is possible to improve the physico-chemical and functional properties of citrus juices by adding ingredients with a protective effect such as trehalose or by applying a high pressure homogenization. In this study the effect of the two variables on the tangerine juice's physico-chemical properties and antioxidant capacity are examined.

To achieve this, the tangerine juice Ortanique variety was obtained, to which trehalose was added in an amount of between 10% and 20%. Juices with and without trehalose were subjected to homogenization pressures of 0, 20, 50, 100, 150 MPa. In all samples the pH, a_w , Brix, impregnation capacity, particle size, turbidity and suspended pulp were determined. Likewise, the flavonoid and phenolic content and antioxidant capacity were measured by ABTS and DPPH methods.

Both physico-chemical and antioxidant properties were affected by the incorporation of trehalose and the application of HPH treatment. The most relevant effects resulted from an increase of the juice cloud stability with the release of components with antioxidant activity and interaction of trehalose with antiradical activity and compounds of an hydrophobic nature.

Key words: homogenization, trehalose, antioxidant, particle size.

Alumna: Dña. Carla Picard Sanz

Tutora: Dra. Noelia Betoret Valls

Cotutora: Dra. Lucía Seguí Gil

Cotutora colaboradora: Dña. Laura Calabuig Jiménez

VALENCIA, 7 de Julio de 2015

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas sin la ayuda y colaboración de las cuáles no habría sido posible la realización de este Trabajo Final de Grado. En especial a la cotutora colaboradora de esta investigación, Laura Calabuig Jiménez, por compartir conmigo todos sus conocimientos y experiencia, pero sobre todo por el continuo apoyo y ánimo recibido por su parte a lo largo de estos meses.

A mi tutora de investigación Noelia Betoret Valls, por su orientación y supervisión, y por todas las sugerencias recibidas. A Lucía Seguí Gil por formar parte del trabajo como cotutora.

También quiero dar las gracias a mi familia, amigos y compañeros de carrera, por su paciencia, consejo y sus constantes palabras de ánimo. Y sobre todo a mis amigas, Andrea y Raquel por haber estado a mi lado en esta experiencia y siempre.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
3.1. MATERIAS PRIMAS.....	7
3.2. EQUIPOS Y PROCESOS	7
3.2.1. Homogeneización (HPH)	7
3.2.2. Impregnación a vacío.....	8
3.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA.....	9
3.3.1. Actividad de agua (a_w)	9
3.3.2. Sólidos solubles totales (SST)	9
3.3.3. pH	9
3.3.4. Tamaño de partícula	9
3.3.5. Pulpa suspendida y turbidez.....	10
3.4. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES	10
3.4.1. Fenoles totales	10
3.4.2. Flavonoides totales	11
3.4.4. Capacidad antioxidante por el método ABTS	12
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	13
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. Efecto de la incorporación de trehalosa y de la aplicación de altas presiones de homogeneización sobre las propiedades físico-químicas del zumo de mandarina natural.	14

4.1.1. Actividad de agua, Brix y pH	14
4.1.2. Tamaño de partícula	15
4.1.3. Pulpa suspendida y turbidez	18
4.1.4. Capacidad de impregnación	19
4.2. Efecto de la incorporación de trehalosa y de la aplicación de altas presiones de homogeneización sobre las propiedades antioxidantes del zumo de mandarina natural.	22
4.2.1. Contenido en fenoles totales	22
4.2.2. Contenido en flavonoides totales	23
4.2.3. Capacidad antioxidante	25
5. CONCLUSIONES.....	28
6. BIBLIOGRAFÍA.....	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad de agua, grados Brix y pH de los zumos con trehalosa.	14
Tabla 2. Tamaño de partícula de los zumos con diferentes porcentajes de trehalosa tratados a las diferentes presiones.	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del tamaño de partícula de los zumos naturales Ortanique en función de las diferentes concentraciones de trehalosa y presiones de homogeneización.	15
Figura 2. Efecto de la presión de homogeneización y del contenido en trehalosa sobre la variable $D_{(4,3)}$ característica del tamaño de partícula en los zumos.	16
Figura 4. Efecto de la presión de homogeneización sobre parámetros característicos de la impregnación a vacío.	21
Figura 5. Contenido en fenoles del zumo de mandarina natural con diferente presión de homogeneización en función de la concentración en trehalosa.	23
Figura 6. Contenido en flavonoides del zumo natural con diferente porcentaje de trehalosa en función de la presión de homogeneización.	24
Figura 7. Contenido en flavonoides del zumo natural con diferentes presiones de homogeneización en función del porcentaje en trehalosa.	24
Figura 8. Capacidad antioxidante mediante ABTS según las diferentes presiones de homogeneización en función del contenido en trehalosa.	25
Figura 9. Capacidad antioxidante mediante DPPH de los zumos naturales Ortanique en función de las diferentes concentraciones de trehalosa y presiones de homogeneización.	27

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, las nuevas tendencias en alimentación han provocado que los consumidores cada vez sean más conscientes de la influencia de los alimentos en su salud. Buscan productos naturales mínimamente procesados, que recuerden a los alimentos frescos, y que además de aportar un valor nutricional adecuado, proporcionen beneficios al organismo humano. Ante esta necesidad surgen los **alimentos funcionales**, como aquellos alimentos naturales o procesados que además de su aporte nutricional, contiene componentes adicionales que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo humano (Alvídrez *et al.*, 2002). Productos naturales como las frutas y los vegetales representan la forma más simple de alimentos funcionales.

Está demostrado que el consumo de frutas y verduras ayuda a prevenir el cáncer y las enfermedades coronarias (Kuskoski *et al.*, 2005). Esto es debido a las **propiedades antioxidantes y antirradicales** de los componentes de las frutas y en particular de aquellos que se encuentran en sus zumos (Betoret *et al.*, 2008).

Entre los componentes antirradicales y antioxidantes de los zumos de cítricos, destacan la Vitamina C o ácido ascórbico, los flavonoides, los carotenoides y las antocianinas (solo en zumos de variedades pigmentadas) (Rapisarda *et al.*, 2000). El zumo de naranja es especialmente rico en Vitamina C, que aporta grandes beneficios a la salud humana, como son los efectos beneficiosos sobre el sistema inmunitario o la reducción del riesgo de la enfermedad de Alzheimer (Sánchez-Moreno *et al.*, 2003).

Por otro lado, los fenoles, especialmente los flavonoides, antocianos y carotenoides, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes del estrés oxidativo, atribuyéndoseles a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades cardiovasculares, circulatorias, cancerígenas y neurológicas. Así mismo se ha podido comprobar que también poseen actividad anti-inflamatoria, antialérgica, antitrombótica, antimicrobiana y antineoplásica (Kuskoski *et al.*, 2005; Betoret *et al.*, 2012; Meléndez-Martínez *et al.*, 2004).

A pesar de los avances en el procesado y conservación de alimentos, en la industria alimentaria se continúa utilizando **tecnologías convencionales** que mediante tratamientos térmicos agresivos buscan la destrucción de microorganismos y la inactivación de enzimas. Este tipo de tratamientos afectan negativamente a los alimentos, modificando la calidad nutricional, y las características organolépticas y funcionales propias del producto fresco. Es

el caso de los procesos industriales de elaboración de zumos, en los que se alteran las propiedades físicas y sensoriales del zumo original. La calidad de los zumos obtenidos depende de la calidad de la materia prima, del tratamiento térmico y su intensidad, y de las condiciones de extracción y almacenamiento. Los zumos cítricos son especialmente termolábiles por lo que con la aplicación de tratamientos térmicos pierden el sabor a fresco, adquiriendo un sabor a cocido típico de los zumos procesados (ES 2364515, 2011).

No obstante, el efecto negativo que, en general, las operaciones de procesado ejercen sobre las propiedades funcionales, y particularmente sobre el poder antioxidante, puede reducirse mediante la realización de pretratamientos en los procesos de fabricación o mediante la adición de determinados ingredientes.

El campo de la industria alimentaria continúa desarrollándose y evolucionando en busca de **nuevas técnicas y tratamientos** que permitan obtener productos seguros y estables que mejoren el valor funcional de los alimentos y conserven al mismo tiempo, las propiedades físico-químicas y nutricionales de los alimentos frescos (Monserrat, 2010).

En este sentido, destaca el **tratamiento con presiones de homogeneización** (HPH, siglas del inglés High Pressure Homogenization). Se trata de una operación que consiste en la aplicación de una presión moderada de homogeneización (<300 MPa) sobre productos líquidos durante un periodo muy breve de tiempo. El líquido entra en el equipo alcanzando una alta presión y velocidad mientras es forzado a pasar a través del pequeño orificio de la válvula. Mientras el líquido pasa por el homogeneizador se produce una caída de presión y fenómenos de turbulencia, cavitación, fricción y cizallamiento. Además, como efecto secundario se produce un incremento de temperatura del líquido de 14 °C-18 °C por cada 100 MPa (Thiebaud *et al.*, 2003).

La aplicación de presiones de homogeneización reduce la necesidad de utilizar tratamientos térmicos con altas temperaturas para la **destrucción de microorganismos** y para **la inactivación de enzimas**, ya que combinando alta presión con temperaturas más bajas se consigue un buen nivel de inactivación (Daoudi, 2004; Caminiti *et al.*, 2011). La eficiencia de HPH en el grado de inactivación de microorganismos dependerá del nivel de presión, la temperatura inicial del fluido, la matriz del alimento y el tipo de microorganismo (Castagnini *et al.*, 2004). Dicha inactivación se consigue principalmente mediante la destrucción mecánica de la integridad de la pared celular de los microorganismos. Numerosos estudios prueban la capacidad de HPH para inactivar bacterias (*Lactobacillus*

plantarum, *Listeria innocua*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y esporas bacterianas (*Bacillus spp.*, *Clostridia spp.*) (Castagnini *et al.*, 2014).

El tratamiento de HPH se aplica también en la industria farmacéutica y de cosmética para obtener líquidos y cremas con una granulometría más fina y uniforme (Lippacher *et al.*, 2002; Guamis y Escriu, 2009). En el caso de la industria alimentaria, es utilizado además para reducir el tamaño de los glóbulos de grasa de la leche (Paquin, 1999) y el tamaño de los fragmentos de pulpa en los zumos (Thakur *et al.*, 1995).

En el ámbito del procesado de zumos de cítricos, la homogeneización también consigue mejorar la calidad de los mismos, afectando a factores como la viscosidad, el sabor, el color, la turbidez y la estabilidad de los sólidos suspendidos. Distintas condiciones de homogeneización provocan cambios en la distribución del tamaño de las partículas que constituyen la nube de los zumos de cítricos. Se trata de orgánulos celulares y membranas, partículas cromatóforas, gotas de aceite, cristales de flavonoides y restos de pared celular que consta de pectina, celulosa y hemicelulosa (Baker y Cameron, 1999; Betoret *et al.*, 2008). Puede facilitar también la liberación de sustancias adicionales responsables del sabor y mejorar de esta forma los resultados obtenidos en frescura y textura (Lacroix *et al.*, 2005).

En el caso del zumo de mandarina, Betoret *et al.*, 2008 demuestra la eficacia de la aplicación de presiones de homogeneización como pretratamiento a otras operaciones. Reduciendo el tamaño de partícula de la pulpa suspendida del zumo de mandarina mediante HPH se consigue introducir mayor cantidad de zumo en la estructura de alimentos porosos mediante la operación de impregnación a vacío (Betoret *et al.*, 2008).

Por otra parte, se han estudiado los múltiples efectos y aplicaciones de la **trehalosa**. Se trata de un disacárido no reductor compuesto por dos moléculas de glucosa ligadas por un enlace α,α -1,1. Desde que en 1974 se descubriera el papel de la trehalosa como fuente de glucosa, el conocimiento sobre las distintas funciones y aplicaciones de este disacárido se han ido desarrollando con avances destacados y prometedores (Elbein *et al.*, 2003).

En la actualidad se ha demostrado que se trata de una molécula multifuncional que supone una fuente de energía y reserva de carbono y, por ello, se encuentra presente y es producida por distintos organismos vivos como bacterias, hongos, levaduras o plantas, que la producen y acumulan ante situaciones de estrés como método de protección (Elbein, 1974; Higashiyama, 2002).

Se ha comprobado que la trehalosa es estable bajo condiciones de acidez y calor, y puede por tanto mejorar la tolerancia de muchos organismos a condiciones adversas o de estrés actuando como agente protector (Crowe *et al.*, 1984; Li *et al.*, 2010). Protege a las proteínas, lípidos y membranas celulares de la inactivación, degradación o desnaturalización causada por tratamientos agresivos como la deshidratación, la osmopresión, el calor, el frío y la oxidación (Elbein *et al.*, 2003; Higashiyama, 2002). Distintos estudios muestran que el efecto estabilizador de la trehalosa se debe a su estructura y estereoquímica, ya que estas características permiten que la trehalosa se una con facilidad a grupos polares con múltiples puntos de interacción (Rudolph *et al.*, 1990). En el caso de la protección de las membranas, la trehalosa probablemente interactúa directamente con moléculas de proteína por puentes de hidrógeno entre sus grupos hidroxilo y residuos polares (Carpenter y Crowe, 1989).

Costa Morato *et al.*, 2008 sometió la levadura *S. cerevisiae* a condiciones que conducían a la acumulación de trehalosa dentro de las células, demostrando la protección que este azúcar ejerce sobre las proteínas frente al daño oxidativo. Así mismo, este disacárido disminuye los niveles de peroxidación de lípidos durante la deshidratación. En este estudio se demostró que cuando las células de levadura habían acumulado un 10% de trehalosa, las cepas eran más tolerantes al H₂O₂, demostrando por tanto la importancia de este azúcar como agente protector.

Debido al efecto protector que ejerce ante la oxidación, la trehalosa se puede decir que actúa como un agente antioxidante. La trehalosa como antioxidante puede ser de gran utilidad en la industria alimentaria para preservar alimentos mejorando su estabilidad oxidativa (Oku *et al.*, 2003), ya que la oxidación de los lípidos es un factor crítico que conduce al deterioro durante el procesado, transporte y almacenamiento (Kaneda, 1980). Además, este disacárido muestra poca reactividad frente a compuestos amino en los alimentos, ya que tiene una alta estabilidad térmica, amplio rango de estabilidad de pH, y ningún poder reductor. También enmascara sabores y olores desagradables en los alimentos, por lo que es excelente para el mantenimiento de la calidad de los mismos (Higashiyama, 2002).

Su aplicación se puede extender a una amplia gama de productos disminuyendo así el uso de aditivos químicos en la producción de alimentos. Se puede utilizar en productos congelados, en los que ayuda a proteger y estabilizar las proteínas; en productos salados como conservante; en frutas y verduras, para generar una capa protectora que preserve la humedad y los sabores; y en productos con alto contenido de grasas y aceites, para

prevenir la oxidación de lípidos y prolongar la vida útil de los alimentos. La trehalosa protege el sabor, el color y el aroma, permite la retrogradación del almidón (insolubilización y precipitación espontánea del almidón) y protege la estabilidad de los geles. Esta propiedad convierte a la trehalosa en un glúcido útil para prevenir el desarrollo microbiano, y proteger y extender la vida de productos de panadería frescos, mejorando la textura y evitando la migración de humedad (Vega, 2014).

Por todo ello, los nuevos conocimientos adquiridos en los últimos años sobre la trehalosa han permitido conseguir grandes avances en el campo de la investigación y la alimentación. Sin embargo, pese a las propiedades, funciones y ventajas conocidas, surge la necesidad de profundizar más en el alcance de este azúcar de gran potencial como antioxidante y su capacidad para proteger componentes funcionales de los alimentos frente a otras condiciones de estrés como es la aplicación de alta presión mediante el tratamiento de homogeneización.

En este contexto, el objetivo del trabajo que se expone a continuación consiste en evaluar el efecto de la aplicación de altas presiones de homogeneización y el efecto protector de la trehalosa sobre las propiedades físico-químicas y antioxidantes del zumo de mandarina.

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente Trabajo Final de Grado consiste en la determinación del efecto de la aplicación de altas presiones de homogeneización y de la concentración de trehalosa sobre las propiedades físico-químicas y antioxidantes de zumo de mandarina natural.

Para la consecución del objetivo planteado se estableció el siguiente plan de trabajo:

1. Caracterización físico-química del zumo de mandarina natural, sin trehalosa y con un 10% y un 20% de trehalosa. Se determinará pH, Brix, a_w , tamaño de partícula, pulpa suspendida, turbidez, capacidad de impregnación.
2. Caracterización físico-química del zumo de mandarina natural, sin trehalosa y con un 10% y un 20% de trehalosa y con el tratamiento a las diferentes presiones de homogeneización (0, 20, 50, 100 y 150 MPa). Se determinará pH, grados Brix, a_w , tamaño de partícula, pulpa suspendida, turbidez, capacidad de impregnación.
3. Determinación de las propiedades antioxidantes del zumo de mandarina natural, sin trehalosa y con un 10% y un 20% de trehalosa.
 - a. Método DPPH y ABTS.
 - b. Método Folin-Ciocalteu para la determinación de fenoles totales.
 - c. Método del cloruro de aluminio para la determinación de flavonoides totales.
4. Determinación de las propiedades antioxidantes del zumo de mandarina natural, sin trehalosa y con un 10% y un 20% de trehalosa y con el tratamiento a las diferentes presiones de homogeneización (0, 20, 50, 100 y 150MPa).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAS PRIMAS

Para el presente estudio se seleccionó mandarina de la variedad Ortanique, un híbrido de naranja dulce y mandarina (*Citrus sinensis* x *Citrus reticulata*), adquiridas en la cooperativa agrícola de Benaguacil (Valencia).

El proceso llevado a cabo con las mandarinas para la extracción del zumo consistió en un lavado con agua, secado, extracción (mediante exprimidora eléctrica, Citromatic Deluxe, Braun), tamizado manual con un tamiz de 0,7 mm de ancho de paso (de la marca comercial Ibili) y posterior centrifugado (mediante una centrífuga Medifriger BL, P-Selecta) en un programa de 1221 g (3650 rpm), durante 5 minutos a 25 °C. El zumo obtenido se recogió en tarros de vidrio esterilizados y se congeló inmediatamente a -18 °C hasta la realización de los análisis.

A una parte del zumo obtenido se le añadió trehalosa en un porcentaje del 10% y del 20%. Se utilizó trehalosa extraída de almidón de tapioca (TREHA™, Cargill Ibérica, Barcelona, España).

El zumo obtenido con y sin trehalosa se sometió a un tratamiento por altas presiones de homogeneización, utilizando un homogeneizador PandaPLUS de la marca comercial GEA Niro Soavi, a distintas presiones de trabajo: 0, 20, 50, 100, 150 MPa.

3.2. EQUIPOS Y PROCESOS

3.2.1. Homogeneización (HPH)

El equipo empleado para llevar a cabo la operación fue un homogeneizador de modelo PandaPLUS 2000 de la marca GEA Niro Soavi, con presiones que pueden alcanzar los 2.000 bar, con una viscosidad indicativa de hasta 20.000 cP y a una temperatura de hasta 90 °C (GEA Mechanical Equipment Italia S.p.A., 2013).

El equipo HPH consiste básicamente en una bomba de desplazamiento positivo y una válvula de homogeneización. El líquido que entra en el equipo alcanza una alta presión y velocidad y es forzado a pasar a través del pequeño orificio o abertura de la válvula de unos pocos micrómetros de anchura. La caída de presión genera fuerzas mecánicas intensas y

estrés de elongación en el flujo laminar, en la entrada de la válvula y en el orificio de la válvula. Con el HPH se generan fenómenos de turbulencia, cavitación e impactos con superficies sólidas en la salida de la abertura, fricción y cizallamiento (Montserrat, 2010). La presión del proceso se regula ajustando la distancia que hay entre la válvula y el asiento de ésta. Mientras el líquido pasa por el homogeneizador se produce un aumento de temperatura durante un breve periodo. La temperatura del fluido aumenta linealmente con la presión de homogeneización entre 14 °C-18 °C por cada 100 MPa debido a efectos de cizalla y la conversión parcial de energía mecánica en calor (Thiebaud *et al.*, 2003).

En este experimento el zumo de mandarina natural con un 0, 10 y 20% de trehalosa fue sometido al proceso de homogeneización aplicando presiones de 0, 20, 50, 100 y 150 MPa en todos los casos.

3.2.2. Impregnación a vacío

Para los ensayos de evaluación de la capacidad de impregnación se utilizaron manzanas de la variedad Granny Smith, en estado de madurez comercial que fueron adquiridas en un supermercado local. Las manzanas se cortaron con una loncheadora (de la marca comercial Fagor) a 5,5 mm de espesor. Cortadas con un sacabocados de diámetro exterior de 65 mm siguiendo la dirección del eje longitudinal para eliminar la piel y el corazón de las rodajas, se retiró con un sacabocados metálico de 20 mm de diámetro interior. Como disolución de impregnación se utilizó zumo de mandarina natural sin trehalosa y con 10% o 20% de trehalosa tratado a diferentes presiones de homogeneización.

El equipo para el estudio de la capacidad de impregnación consta de una cámara de vacío, conectado a una bomba (Sterling SIHI), y una balanza de precisión con sensibilidad de 0,01 g (Mettler PJ 3600 Delta Range) que permite registrar el peso de la muestra a lo largo del proceso de impregnación.

Los discos de manzana se sumergieron en el líquido de impregnación y fueron sometidas a una presión subatmosférica de 50 mbar durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se restauró la presión atmosférica (1013,2 mbar), manteniéndose las muestras sumergidas en la disolución de impregnación durante 10 minutos más.

Las diferentes pesadas de la muestra realizadas durante la experiencia, permiten determinar los parámetros de impregnación característicos: la penetración por unidad de volumen de muestra (x) (m^3 de líquido incorporado/ m^3 de muestra) y la penetración

volumétrica de líquido en la etapa de impregnación (x_1); deformación neta por unidad de volumen de muestra (γ) y la deformación volumétrica durante la etapa de impregnación (γ_1); y la porosidad efectiva (ϵ_e) (volumen total de gas en una muestra a $t=0$ / volumen inicial de la muestra) (Martínez *et al.*, 1998).

3.3. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA

La caracterización físico-química de los productos consistió en el análisis de la actividad de agua (a_w), sólidos solubles totales (grados Brix), pH, tamaño de partícula y pulpa suspendida y turbidez.

3.3.1. Actividad de agua (a_w)

La actividad de agua se determinó con un higrómetro de punto de rocío (Aqualab 4TE) con una precisión de $\pm 0,0001$, previamente calibrado. Las determinaciones se realizaron por triplicado para las 5 presiones de trabajo.

3.3.2. Sólidos solubles totales (SST)

Se midieron los sólidos solubles totales (SST) de cada uno de los azúcares por refractometría, mediante la determinación de los grados Brix. Se realizó con un refractómetro modelo ABBE ATAGO, 3-T termostatado a 21 °C. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

3.3.3. pH

El pH del zumo homogeneizado se determinó por triplicado mediante pH-metro digital (Mettler Toledo Inlab), previamente calibrado con disoluciones tampón a pH 4, 7 y 9.

3.3.4. Tamaño de partícula

Para las determinaciones de tamaño de partícula se empleó el equipo Malvern Mastersizer (Modelo 2000, Malvern Instruments Limited, Worcestershire, UK) que cubre un rango de medida entre 0,02 y 2000 micras y que dispone de una fuente de luz azul de 470 nm de longitud de onda. Los valores que se usaron para los índices de refracción de la nube y de la fase dispersa fueron de 1,73 y 1,33 respectivamente, y se utilizó 0,1 como índice de absorción de las partículas de la nube (Correding *et al.*, 2001). Las medidas se realizaron por triplicado y cada vez se medía 10 veces.

La distribución del tamaño de las partículas obtenida por esta técnica está basada en el volumen, de tal manera que para un rango de tamaño de partícula el valor que se obtiene representa el porcentaje de volumen total de todas las partículas con un diámetro incluido en este rango con respecto al volumen total de las partículas de la distribución.

En el caso de las distribuciones monomodales se determinó el diámetro medio de la distribución considerado en volumen ($D_{[4,3]}$) (1)

$$(D_{[4,3]}) = \frac{\sum_i n_i d_i^4}{\sum_i n_i d_i^3} \quad (1)$$

Donde n_i es el número de partículas de diámetro d_i .

3.3.5. Pulpa suspendida y turbidez

Las muestras de zumo homogeneizadas a las diferentes presiones (10 mL) se centrifugaron a 366 g y a 3000 g durante 10 minutos, utilizando la centrífuga (Medifriger BL, P-Selecta). Tras la centrifugación, se determinó el volumen de sobrenadante y por diferencia con el volumen total el volumen de pulpa suspendida. Para determinar la turbidez se midió la transmitancia del sobrenadante por refractometría a 650 nm con un espectrofotómetro UV/Visible (Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific). Todas las medidas se hicieron por triplicado a las distintas presiones.

3.4. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

La evaluación del contenido en fenoles y flavonoides totales se realizó en todas las muestras, mediante el método de Folin-Ciocalteu (FC) y el método colorimétrico del cloruro de aluminio, respectivamente.

3.4.1. Fenoles totales

Para la determinación de fenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Wolfe *et al.*, 2003; Singleton *et al.*, 1999). Este método espectrofotométrico se fundamenta en el carácter reductor del reactivo Folin-Ciocalteu (FC). El reactivo FC es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico en medio básico, que se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando un color azulado medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 765 nm.

Para llevar a cabo el ensayo, se añade en las cubetas de espectrofotometría 0,5 mL de agua bidestilada, 0,125 mL de una dilución 1:5 de muestra y 0,125 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) y se deja reaccionar el conjunto en oscuridad durante 6 minutos. Seguidamente se para la reacción añadiendo 1,25 mL de carbonato sódico al 7% en agua bidestilada y se añade a la mezcla 1 mL de agua bidestilada para alcanzar 3 mL de la cubeta. Tras 90 minutos de reacción en oscuridad, se produce el desarrollo del color y seguidamente se procede a la medida de la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific.

Como patrón se utilizó ácido gálico con una pureza mayor o igual al 98% (Sigma-Aldrich) y se prepararon disoluciones de concentración comprendida entre 0 y 0,3 g/L. El contenido total de fenoles se expresa como miligramos equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de muestra. Las medidas tanto del patrón como de las muestras se realizaron por triplicado.

3.4.2. Flavonoides totales

La determinación de flavonoides se realizó mediante el método colorimétrico modificado del cloruro de aluminio, $\text{AlCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Luximon-Ramma *et al.*, 2005). Para ello, se prepararon disoluciones 1:5 de cada una de las muestras. Este método consiste en tomar una alícuota de 1,5 mL de la muestra, que se hace reaccionar con 1,5 mL de una disolución de $\text{AlCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ al 2% en metanol (p/v), se agita y se deja en oscuridad durante 10 minutos para que se produzca la reacción.

Transcurrido este tiempo se procede a la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 368 nm. Se realizó por triplicado utilizando un espectrofotómetro Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific.

Como patrón se utilizó quercetina con una pureza mayor o igual al 95% (Aldrich) y se prepararon disoluciones de concentración comprendida entre 0 y 0,5 g/L. Los resultados se expresa en equivalentes de quercetina por litro (g/L).

La evaluación de la capacidad antioxidante se realizó mediante los métodos DPPH y ABTS.

3.4.3. Capacidad antioxidante por el método DPPH

El método DPPH se basa en la capacidad que posee el radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) de secuestrar componentes antioxidantes. Ésta se mide a partir de la decoloración de la disolución DPPH en metanol al reaccionar con el compuesto antioxidante contenido en la muestra analizada (Molyneux, 2004; Brand- Williams *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2002).

Se partió de una disolución del reactivo DPPH de 100 μ M en metanol (que es equivalente a 39,4 μ g/mL). Esta disolución se preparó el mismo día del ensayo.

La capacidad antirradical se evaluó sobre diluciones 1:20 de la muestra. Los análisis se realizaron añadiendo 2 mL de la disolución met-DPPH, 30 μ L de la disolución problema y por último 970 μ L de metanol. Como referencia se utilizó un blanco, preparado con la misma cantidad de reactivos y conteniendo agua bidestilada en lugar de la disolución problema (Stratil *et al.*, 2006; Payet *et al.*, 2006).

Se midió la absorbancia del producto de reacción mediante un espectrofotómetro (Helios Zeta UV/Vis Thermo scientific) a una longitud de onda de 517 nm, a tiempo 0, 30 y 60 minutos de reacción.

Las determinaciones se realizaron por triplicado para cada una de las concentraciones ensayadas y los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición, calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$I (\%) = \frac{(AB - AA)}{AB} \times 100 \quad (2)$$

Donde:

I (%)= porcentaje de inhibición del DPPH.

AB= absorbancia del blanco.

AA= absorbancia de la disolución de la muestra.

3.4.4. Capacidad antioxidante por el método ABTS

La capacidad antioxidante también se determinó a partir del método de decoloración del ABTS (ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico), o también llamado método TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) (Re *et al.*, 1999).

Se siguió la metodología desarrollada por Re *et al.*, 1999 y Moura *et al.*, 2007, mediante la cual el radical ABTS⁺ se obtiene tras la reacción del ABTS con persulfato potásico. Se preparó una disolución con 7 mM de ABTS de una pureza igual o superior al 99,0% (Sigma-Aldrich) y 2,45 mM de persulfato potásico.

Seguidamente la mezcla obtenida se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 16 horas. Transcurrido este tiempo el radical ABTS⁺ se habrá liberado. Una vez liberado el radical, se procede a diluir el ABTS⁺ en tampón fosfato hasta obtener una dilución con una absorbancia de $0,70 \pm 0,01$ leída a 734 nm de longitud de onda (longitud de máxima absorción).

Una vez conseguida la dilución con la que se obtiene 0,70 de absorbancia, se hacen reaccionar en una cubeta de espectrofotómetro 100 μ L de disolución 1:20 de la muestra, con 2900 μ L de la disolución ABTS⁺ con tampón fosfato. De este modo la actividad antioxidante de las muestras del zumo homogeneizado determina a partir de la reacción entre la muestra y el radical ABTS⁺ con tampón fosfato, midiendo el valor de absorbancia a 734 nm durante los primeros minutos de la reacción (0, 3 y 6 minutos).

El tampón fosfato (Sørensen) se preparó a partir de 2 disoluciones stock. Una disolución (A) 0,2 M de fosfato sódico monobásico (NaH₂PO₄) y una disolución (B) 0,2 M de fosfato sódico dibásico (Na₂HPO₄), de las marcas comerciales Fluca y Riedel-de Haën, respectivamente y ambos con una pureza igual o superior al 99,0%.

Se utilizó trólox (C₁₄H₁₈O₄) como antioxidante estándar de referencia, con una pureza igual al 97%, de la marca comercial Sigma-Aldrich, que se ensayó a una concentración de entre 0 y 10 mg/L de concentración final en tampón fosfato. Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de trólox equivalente (Payet *et al.*, 2005).

Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos, se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) con el paquete informático Statgraphics Centurion XVI utilizando un nivel de confianza del 95% ($p\text{-value} \leq 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto de la incorporación de trehalosa y de la aplicación de altas presiones de homogeneización sobre las propiedades físico-químicas del zumo de mandarina natural.

4.1.1. Actividad de agua, Brix y pH

Se determinó la actividad de agua, Brix y pH de los zumos enriquecidos con trehalosa y homogeneizados a las diferentes presiones. Tal y como cabía esperar, el análisis estadístico de los resultados puso de manifiesto que la aplicación de una HPH no afecta ninguna de estas variables. Sin embargo, el contenido de trehalosa, por tratarse de un disacárido soluble, sí que tuvo efecto sobre el contenido en sólidos solubles (Brix) y la actividad del agua. En la **tabla 1** se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 1. Actividad de agua, grados Brix y pH de los zumos con trehalosa (media±desviación típica).

Trehalosa (%)	a_w	Brix	pH
0	0,987±0,009 ^c	14,3±0,5 ^a	3,36±0,05 ^a
10	0,9808±0,0019 ^b	21,45±0,08 ^b	3,42±0,02 ^b
20	0,9735±0,0019 ^a	28,37±0,19 ^c	3,427±0,014 ^b

a, b, c...: Letras diferentes en los superíndices de los resultados de una misma columna ponen de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Por ser la actividad de agua la variable termodinámica que va a determinar la estabilidad del zumo, interesa a nivel tecnológico, disponer de alguna ecuación que permita calcular rápidamente esta variable. Es este sentido, se comprobó si la a_w de los zumos con trehalosa se podía predecir a partir de la ecuación generalizada de Norrish (Martínez, 1998).

$$\ln a_w = \ln x_w - [(K_1)^{1/2} \cdot x_1 + (K_2)^{1/2} \cdot x_2 + \dots \dots \dots + (K_n)^{1/2} \cdot x_n]^2 \quad (3)$$

Siendo K_n y x_n los coeficientes binarios y las fracciones molares respectivamente para cada uno de los n componentes que forman la mezcla (Martínez, 1998).

En la aplicación de la ecuación se consideró una solución binaria de trehalosa y agua, con un valor de la constante k de la trehalosa igual a la de la sacarosa ($K_{\text{sacarosa}} = 6,47$). (Galmarini *et al.*, 2006), quedando la ecuación de Norrish simplificada:

$$\ln a_w = \ln x_w - [(K_{\text{trehalosa}})^{1/2} \cdot x_{\text{trehalosa}}]^2 \quad (4)$$

Los resultados obtenidos mostraron una diferencia entre la actividad agua predicha por la **ecuación 4** y la experimental similar a la sensibilidad del equipo (0,003), pudiéndose, por tanto, predecir la a_w mediante la ecuación de Norrish.

4.1.2. Tamaño de partícula

En la **figura 1** se muestra la distribución del tamaño de partícula de los zumos con los diferentes porcentajes de trehalosa y tratados a las diferentes presiones. Se puede observar cómo la aplicación de presión, independientemente de cuál sea el nivel, tiene una influencia significativa sobre el tamaño de partícula. Si bien la distribución de tamaños resulta similar, tanto para los zumos tratados como para los no tratados se observa una distribución bimodal, donde el tamaño de las partículas disminuye en todos los casos al aplicar presión de homogeneización.

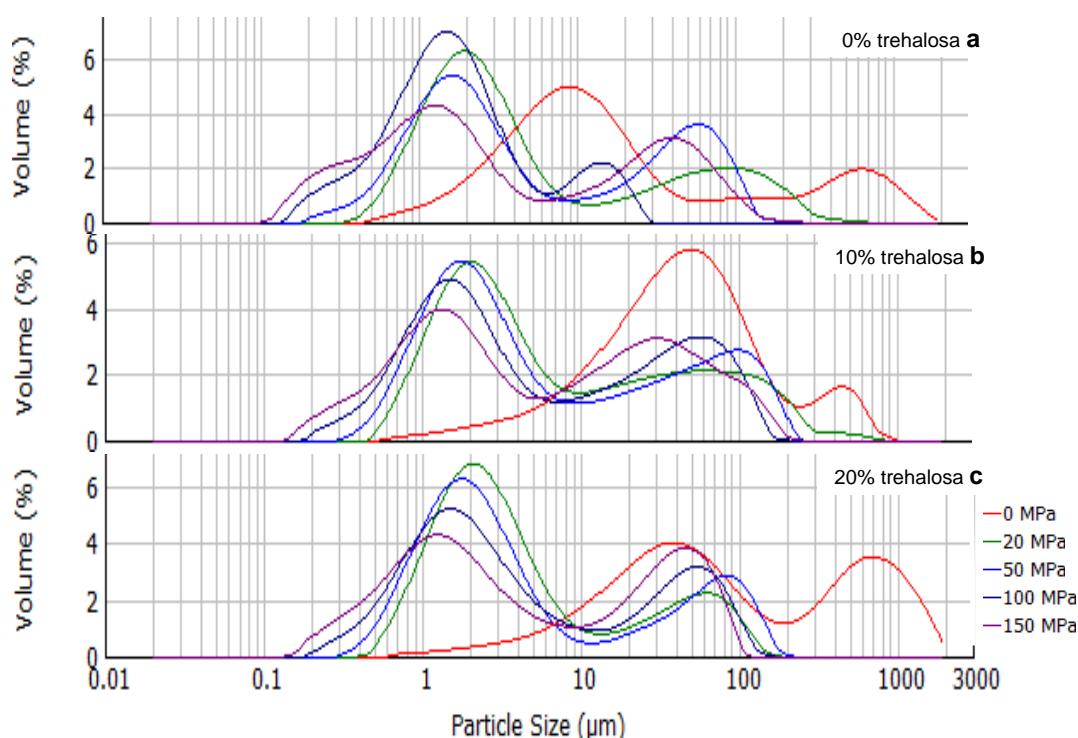


Figura 1. Distribución del tamaño de partícula de los zumos naturales Ortanique en función de las diferentes concentraciones de trehalosa y presiones de homogeneización. a) Al 0% de trehalosa. b) Al 10% de trehalosa. c) Al 20% de trehalosa.

Por lo que respecta a la incorporación de trehalosa, en los zumos no tratados sí que hay un ligero aumento del tamaño de las partículas. Sin embargo, una vez aplicado el tratamiento de presión, estas diferencias desaparecen.

A 0 MPa el tamaño de las partículas fluctúa entre 1 y 1000 μm , y en el caso de no añadir trehalosa se observan dos poblaciones de partículas claramente diferenciadas a 10 y

150 μm . Al añadir un 10% de trehalosa los máximos están en 50 y 150 μm , y al 20% de trehalosa en 40 y 160 μm . Al aplicar presión se homogeneizan y por tanto se reduce el tamaño de las partículas, encontrándose en los tres casos la mayoría de partículas en los máximos 1 y 100 μm aproximadamente. En la **tabla 2** se incluyen los valores promedio y desviación típica de los distintos valores de las variables características del tamaño de partícula respecto a los factores HPH (MPa) y porcentaje de trehalosa.

La diferencia considerable que se observa entre las variables $D_{(4,3)}$ y $D_{(3,2)}$ pone en evidencia la existencia de partículas de diferente forma y tamaño. La existencia en el zumo, tanto de restos de pulpa en suspensión como de componentes químicos de diferente naturaleza que no se han solubilizado explica estas características.

Se presenta en la **figura 2** el parámetro $D_{(4,3)}$ para observar de una forma más clara los efectos de las presiones sobre el tamaño de partícula. Se puede apreciar, en el caso de no aplicar presión y al ser la trehalosa un disacárido y una partícula grande, a medida que se añade un mayor porcentaje, el efecto que se observa es un aumento del tamaño de partícula. Sin embargo, en el momento en que se aplica presión, sea cual sea su magnitud, este efecto de la trehalosa desaparece ya que se elimina la diferencia de tamaño entre las partículas al estar éstas homogeneizadas.

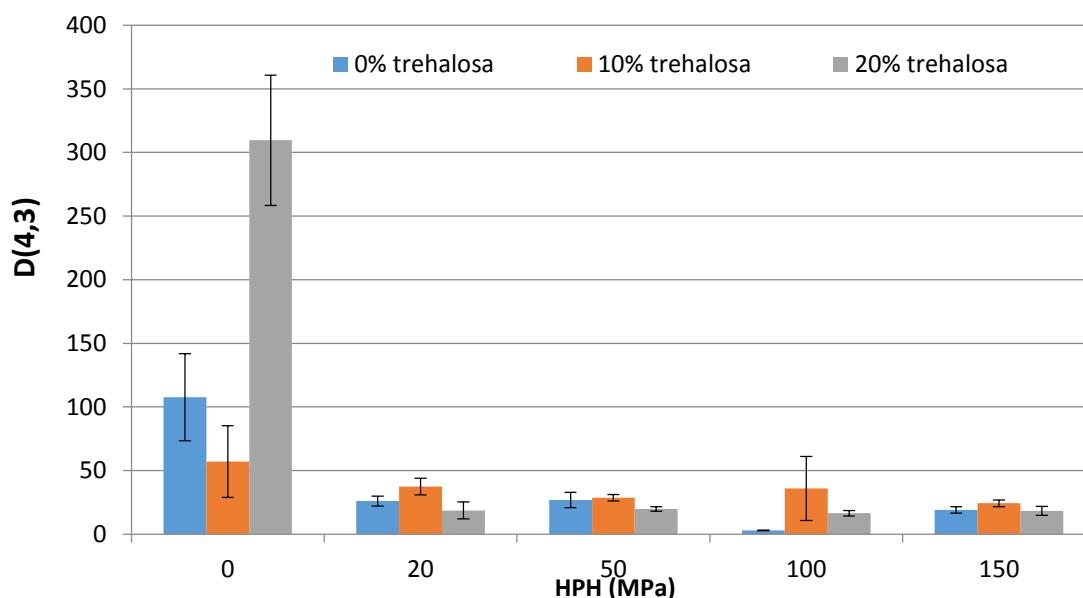


Figura 2. Efecto de la presión de homogeneización y del contenido en trehalosa sobre la variable $D_{(4,3)}$ característica del tamaño de partícula en los zumos.

Tabla 2. Tamaño de partícula de los zumos con diferentes porcentajes de trehalosa tratados a las diferentes presiones (media \pm desviación típica).

		0 MPa	20 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa
D(4,3)	0% trehalosa	107,7 \pm 34,2 ^d	26,1 \pm 3,8 ^{a,b,c}	26,85 \pm 6,09 ^{a,b,c}	2,9 \pm 0,2 ^a	19,2 \pm 2,5 ^{a,b}
	10% trehalosa	57,14 \pm 28,17 ^c	37,5 \pm 6,6 ^{b,c}	28,7 \pm 2,5 ^{a,b,c}	36,03 \pm 25,13 ^{b,c}	24,3 \pm 2,6 ^{a,b}
	20% trehalosa	309,57 \pm 51,18 ^e	18,7 \pm 6,6 ^{a,b}	19,9 \pm 1,8 ^{a,b}	16,53 \pm 2,1115 ^{a,b}	18,3 \pm 3,4 ^{a,b}
D(3,2)	0% trehalosa	6,3 \pm 0,4 ^a	2,27 \pm 0,08 ^a	1,9 \pm 0,3 ^a	0,89 \pm 0,12 ^a	1,04 \pm 0,05 ^a
	10% trehalosa	11,8 \pm 4,8 ^a	3,13 \pm 0,3 ^c	2,42 \pm 0,04 ^a	1,92 \pm 0,07 ^a	1,63 \pm 0,06 ^a
	20% trehalosa	23,5 \pm 4,3 ^b	2,48 \pm 0,19 ^a	2,08 \pm 0,08 ^a	1,66 \pm 0,05 ^a	1,42 \pm 0,03 ^a
d₁₀	0% Trehalosa	2,62 \pm 0,13 ^b	0,990 \pm 0,017 ^a	0,79 \pm 0,07 ^a	0,35 \pm 0,08 ^a	0,353 \pm 0,015 ^a
	10% trehalosa	5,5 \pm 2,8 ^c	1,20 \pm 0,05 ^{a,b}	0,956 \pm 0,009 ^a	0,753 \pm 0,019 ^a	0,596 \pm 0,018 ^a
	20% trehalosa	11,1 \pm 2,4 ^d	1,08 \pm 0,03 ^{a,b}	0,883 \pm 0,015 ^a	0,68 \pm 0,010 ^a	0,523 \pm 0,006 ^a
d₅₀	0% trehalosa	11,12 \pm 1,16 ^a	2,84 \pm 0,13 ^a	3,1 \pm 0,8 ^a	1,45 \pm 0,08 ^a	2,2 \pm 0,2 ^a
	10% trehalosa	27,7 \pm 14,4 ^b	5,4 \pm 1,7 ^a	3,59 \pm 0,14 ^a	3,5 \pm 0,3 ^a	5,5 \pm 0,9 ^a
	20% trehalosa	73,7 \pm 17,5 ^c	3,1 \pm 0,3 ^a	2,69 \pm 0,17 ^a	2,51 \pm 0,14 ^a	2,97 \pm 0,19 ^a
d₉₀	0% trehalosa	416,6 \pm 147,5 ^c	93,13 \pm 12,09 ^{a,b}	79,1 \pm 8,7 ^{a,b}	8,79 \pm 1,06 ^a	60,24 \pm 6,13 ^{a,b}
	10% trehalosa	142,767 \pm 71,001 ^b	117,7 \pm 14,5 ^b	99,3 \pm 7,4 ^{a,b}	77,0 \pm 11,4 ^{a,b}	76,7 \pm 10,4 ^{a,b}
	20% trehalosa	958,9 \pm 132,9 ^d	68,1 \pm 22,2 ^{a,b}	74,5 \pm 6,8 ^{a,b}	58,5 \pm 6,4 ^{a,b}	58,8 \pm 10,4 ^{a,b}

^{a, b, c, ...} : Letras diferentes en los superíndices de los resultados de una misma columna ponen de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

D_(4,3) Diámetro medio en volumen (De Brouckere Mean Diameter): es el diámetro de volumen medio ponderado suponiendo partículas esféricas del mismo volumen que las partículas reales. **D_(3,2)** Diámetro medio en área de superficie (Sauter Mean Diameter): es el diámetro de la superficie media ponderada, asumiendo partículas esféricas de la misma área de superficie que las partículas reales. **D₁₀**, **d₅₀** y **d₉₀**: un valor de tamaño de partícula indicando que, respectivamente, el 10%, 50% y 90% de la distribución se encuentra por debajo de este valor (Malvern Instruments Ltd., 2007).

4.1.3. Pulpa suspendida y turbidez

La pulpa suspendida y turbidez se determinaron a dos fuerzas de centrifugación con la finalidad de determinar la existencia de pulpa de diferente tamaño y estabilidad suspendida en la nube del zumo. Se observaron importantes diferencias en función de la fuerza de centrifugación. Al centrifugar a 366 g, sedimenta la pulpa menos estable y a 3000 g la pulpa de mayor estabilidad (Castagnini *et al.*, *In Press*).

En la **figura 3** se ha representado el porcentaje de pulpa suspendida para los zumos con diferente porcentaje de trehalosa en función de la presión de homogeneización.

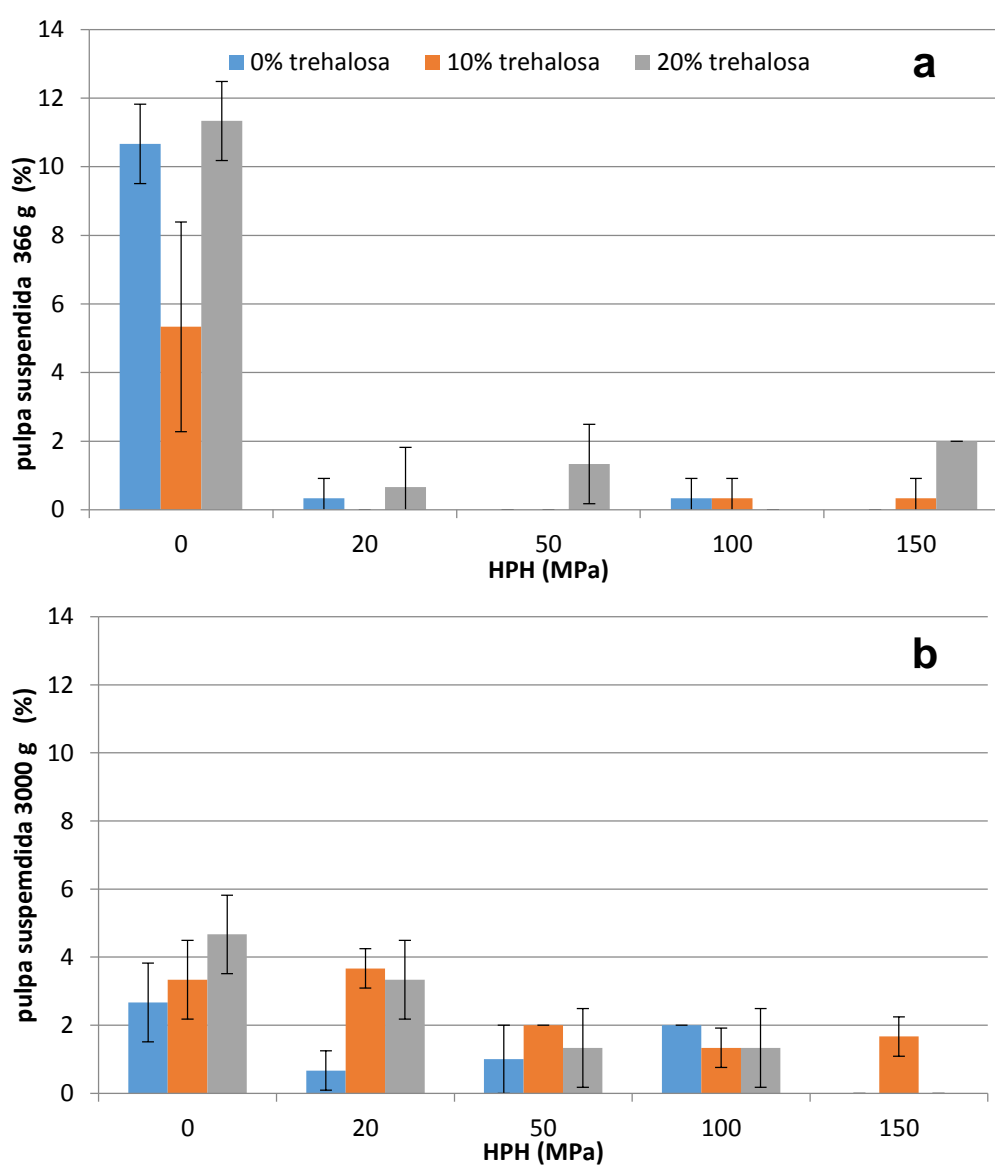


Figura 3. Porcentaje de pulpa suspendida de los zumos de mandarina natural con diferente porcentaje de trehalosa en función de la presión de homogeneización. a) Pulpa suspendida 366g (% v/v). b) Pulpa suspendida 3000g (% v/v).

Se comprobó que la pulpa suspendida del zumo fresco (0% de trehalosa y 0 MPa) después de centrifugar a 366 g, se encontraba próxima a los valores medios de pulpa suspendida encontrados en la bibliografía para zumo fresco (Carbonell *et al.*, 2011; Cerdán-Calero *et al.*, 2013).

Independientemente del porcentaje de trehalosa, puede observarse que la presión de homogeneización tiene un efecto significativo sobre esta variable, especialmente sobre la pulpa de mayor tamaño y de menor estabilidad (a 366 g). Sobre la pulpa de mayor estabilidad y menor tamaño el efecto es mucho menor.

El hecho de que no exista un efecto claro de la adición de trehalosa sobre los valores obtenidos para la pulpa suspendida puede interpretarse como que, cualquier posible interacción que pueda establecerse entre la trehalosa añadida y las partículas suspendidas en la nube del zumo, ocurre de forma similar con las partículas de mayor tamaño y menor estabilidad que con aquellas de menor tamaño y mayor estabilidad.

4.1.4. Capacidad de impregnación

Una de las posibles aplicaciones que puede tener la obtención de zumos o bebidas líquidas homogeneizadas con altas presiones es la incorporación de las mismas a una estructura porosa como la de una fruta para la formulación de nuevos productos con propiedades funcionales (Fito *et al.*, 2001). En este sentido, la reducción del tamaño de partícula que provoca la aplicación de una elevada presión de homogeneización permitiría una mayor incorporación del medio líquido en el interior de la estructura porosa, y al mismo tiempo esta impregnación resultaría más homogénea (Castagnini *et al.*, *In Press*; Betoret *et al.*, 2008).

Por esta razón se determinó el efecto de la incorporación de trehalosa y la aplicación de una presión de homogeneización sobre los parámetros característicos de impregnación de manzana fresca con los diferentes zumos de mandarina.

Se determinó la fracción volumétrica de zumo incorporado: X (m^3 de líquido incorporado/ m^3 de muestra), la deformación volumétrica de las muestras como consecuencia del proceso de impregnación: γ (m^3 de variación de volumen/ m^3 de muestra) y la porosidad efectiva: ϵ_e (m^3 de gas/ m^3 de muestra). Los resultados se presentan en la **tabla 3**.

Tabla 3. Parámetros característicos de la impregnación de los zumos con trehalosa tratados a las diferentes presiones sobre manzana fresca (var. Granny Smith) (media \pm desviación típica).

		0 MPa	20 MPa	50 MPa	100 MPa	150 MPa
Y ₁	0% Trehalosa	0,1055 \pm 0,0007 ^{d,e,f}	0,029 \pm 0,002 ^{c,d,e}	0,069 \pm 0,016 ^{c,d,e}	0,013 \pm 0,008 ^{b,c}	0,022 \pm 0,002 ^{c,d}
	10% trehalosa	0,12 \pm 0,08 ^{e,f}	0,050 \pm 0,017 ^{c,d,e}	-0,079 \pm 0,006 ^{a,b}	-0,13 \pm 0,06 ^a	0,024 \pm 0,004 ^{c,d}
	20% trehalosa	0,112 \pm 0,015 ^{d,e,f}	0,19 \pm 0,13 ^f	0,065 \pm 0,013 ^{c,d,e}	-0,017 \pm 0,005 ^{b,c}	0,026 \pm 0,017 ^{c,d}
Y	0% Trehalosa	-0,0060 \pm 0,0014 ^{f,g}	-0,042 \pm 0,004 ^{b,c,d,e,f}	-0,028 \pm 0,007 ^{d,e,f}	-0,050 \pm 0,007 ^{b,c,d,e,f}	-0,0130 \pm 0,0014 ^{e,f,g}
	10% trehalosa	0,0320 \pm 0,0113 ^g	-0,036 \pm 0,006 ^{c,d,e,f}	-0,065 \pm 0,004 ^{b,c,d,e}	-0,0605 \pm 0,0007 ^{b,c,d,e}	-0,077 \pm 0,003 ^{b,c,d}
	20% trehalosa	-0,13 \pm 0,07 ^a	-0,09 \pm 0,04 ^{a,b,c}	-0,09 \pm 0,04 ^{a,b,c}	-0,08 \pm 0,03 ^{a,b,c,d}	-0,074 \pm 0,008 ^{b,c,d}
X ₁	0% Trehalosa	0,1360 \pm 0,0014 ^{e,f,g}	0,0780 \pm 0,0014 ^{a,b,c}	0,091 \pm 0,009 ^{a,b,c,d}	0,059 \pm 0,006 ^a	0,066 \pm 0,007 ^{a,b}
	10% trehalosa	0,17 \pm 0,03 ^f	0,114 \pm 0,005 ^{c,d,e}	0,0745 \pm 0,0007 ^{b,c}	0,093 \pm 0,004 ^{a,b,c,d}	0,122 \pm 0,004 ^{d,e,f}
	20% trehalosa	0,0880 \pm 0,0113 ^{a,b,c,d}	0,16 \pm 0,06 ^{f,g}	0,078 \pm 0,005 ^{a,b,c}	0,096 \pm 0,006 ^{b,c,d}	0,099 \pm 0,004 ^{b,c,d}
X	0% Trehalosa	0,217 \pm 0,016 ^{f,g}	0,205 \pm 0,006 ^{e,f}	0,2190 \pm 0,0014 ^{f,g}	0,232 \pm 0,004 ^g	0,236 \pm 0,012 ^g
	10% trehalosa	0,200 \pm 0,007 ^{d,e,f}	0,158 \pm 0,006 ^{b,c}	0,166 \pm 0,008 ^c	0,16 \pm 0,02 ^{b,c}	0,12 \pm 0,02 ^a
	20% trehalosa	0,137 \pm 0,004 ^{a,b}	0,161 \pm 0,003 ^{b,c}	0,2120 \pm 0,0113 ^{f,g}	0,1800 \pm 0,0113 ^{c,d,e}	0,178 \pm 0,006 ^{c,d}
ε _e	0% Trehalosa	0,270 \pm 0,003 ^{c,d,e}	0,252 \pm 0,005 ^{b,c,d}	0,29 \pm 0,03 ^{d,e,f}	0,289 \pm 0,013 ^{d,e,f}	0,257 \pm 0,004 ^{b,c,d}
	10% trehalosa	0,192 \pm 0,005 ^a	0,216 \pm 0,005 ^{a,b}	0,221 \pm 0,017 ^{a,b}	0,23 \pm 0,03 ^{a,b,c}	0,21 \pm 0,02 ^a
	20% trehalosa	0,20 \pm 0,05 ^a	0,302 \pm 0,006 ^{e,f}	0,32 \pm 0,03 ^f	0,275 \pm 0,015 ^{d,e,f}	0,291 \pm 0,004 ^{d,e,f}

a, b, c, ...: Letras diferentes en los superíndices de los resultados de una misma columna ponen de manifiesto diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

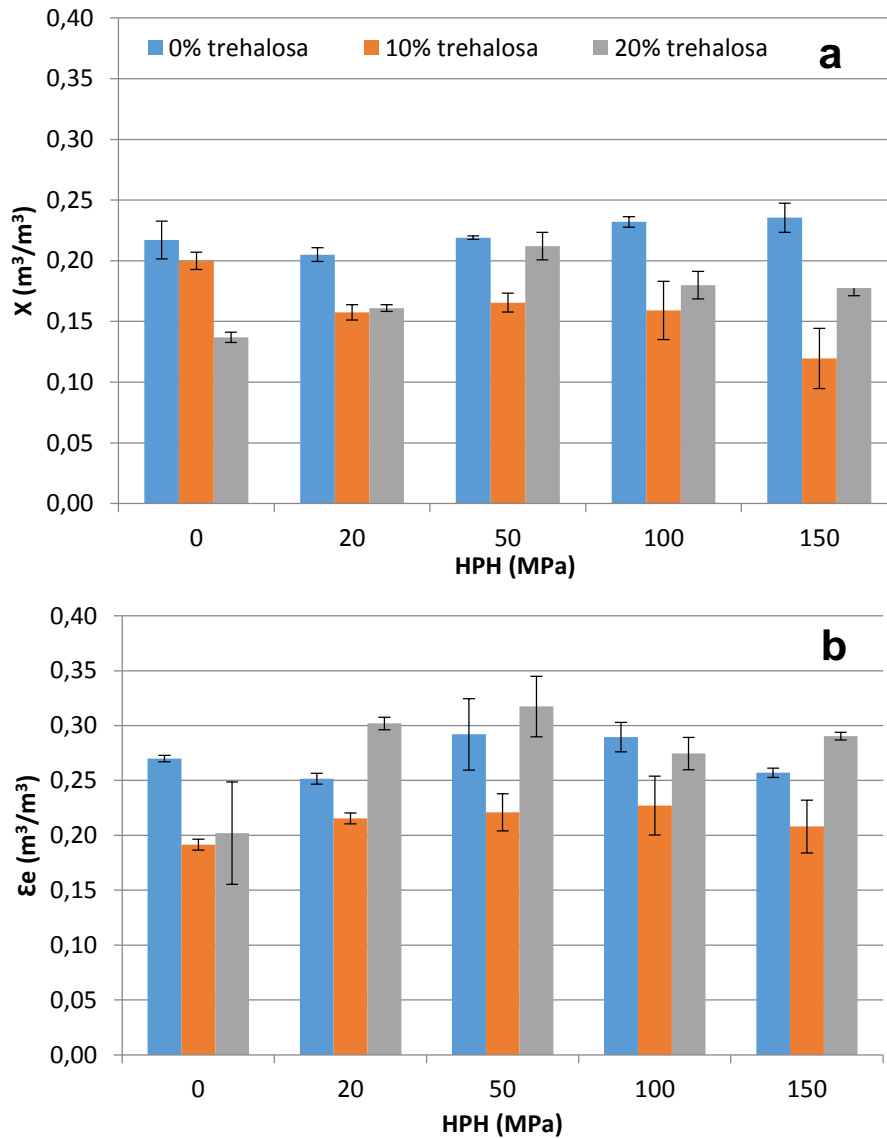


Figura 3. Efecto de la presión de homogeneización sobre parámetros característicos de la impregnación a vacío. a) Penetración volumétrica antes de la etapa de impregnación (x), b) Porosidad efectiva (ϵ_e).

Al aplicar presión, la fracción volumétrica de zumo sin trehalosa incorporado a la estructura porosa de la manzana fresca aumenta ligeramente. Esto es debido a que al aumentar la presión se disminuye el tamaño de partícula y por tanto resulta más fácil incorporar el zumo en el interior de los poros de pequeño tamaño. En general, la incorporación de un 10% y un 20% de trehalosa disminuye la fracción volumétrica de zumo incorporado modificando ligeramente el efecto de la presión de homogeneización. El aumento de la hipertonicidad del zumo como consecuencia de su mayor contenido en azúcar, aumentaría la pérdida de agua por fenómenos osmóticos durante el proceso de impregnación. Esta pérdida de agua enmascararía en parte la incorporación de zumo, resultando en una falsa menor impregnación de las manzana fresca.

4.2. Efecto de la incorporación de trehalosa y de la aplicación de altas presiones de homogeneización sobre las propiedades antioxidantes del zumo de mandarina natural.

4.2.1. Contenido en fenoles totales

Para la determinación del contenido en fenoles totales de las muestras se utilizó el método Folin-Ciocalteu. Se utilizó ácido gálico como fenol de referencia para la realización de la recta patrón. Los resultados se expresan en gramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de producto (**figura 5**).

A partir del análisis estadístico de los resultados, se vio que el efecto de la presión de homogeneización y de la concentración de trehalosa es significativo sobre el contenido en fenoles totales, así como su interacción ($p\text{-value}\leq 0,05$).

Se observa que al añadir trehalosa el contenido en fenoles totales disminuye, aumentando ligeramente al aumentar la presión de homogeneización. El aumento provocado por la aplicación de presión puede ser debido a que, una gran parte de los compuestos fenólicos del zumo están asociados a las pequeñas partículas de pulpa que forman parte de la nube del mismo. Gran parte de estas partículas son de tamaño considerable, tienen poca estabilidad en el zumo fresco y precipitan en muy poco tiempo. Tal y como se ha visto previamente la aplicación de presiones de homogeneización, disminuye el tamaño de partícula y estabiliza la nube. Este hecho puede además contribuir a la liberación de parte de los compuestos fenólicos asociados a las partículas de mayor tamaño (Arnao *et al.*, 1997) asegurando una mayor estabilidad de los mismos en la nube y en consecuencia una mayor disponibilidad.

Con respecto al descenso provocado por la incorporación de trehalosa, experimentalmente se ha comprobado que la trehalosa no ejerce interacción con los reactivos de la reacción del Folin-Ciocalteu.

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas cuya estructura química es propicia para ejercer una acción antioxidante al actuar como captadores de radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático que contienen puede ser donado a la especie radical (Fernandez- Pachón, 2006). Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero (Gracia, 2007).

Por otro lado, Oku *et al.*, (2003 y 2005) explica que la trehalosa actúa como antioxidante protegiendo a los ácidos grasos insaturados (UFA) de la oxidación. Este efecto se debe a que una molécula de trehalosa interactúa estequiométricamente con un doble enlace de UFA formando un complejo estable a través de enlaces de hidrógeno tipo $\text{OH}\cdots\pi$ y $\text{CH}\cdots\text{O}$.

Por estos motivos, se puede deducir que este descenso del contenido en fenoles totales que se aprecia en la **figura 5** al añadir trehalosa al zumo, puede deberse a que la trehalosa interaccione con los compuestos fenólicos del zumo, se una a ellos a través de sus grupos -OH (como ocurre con los ácidos grasos) y se impida, de este modo que los fenoles reaccionen con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

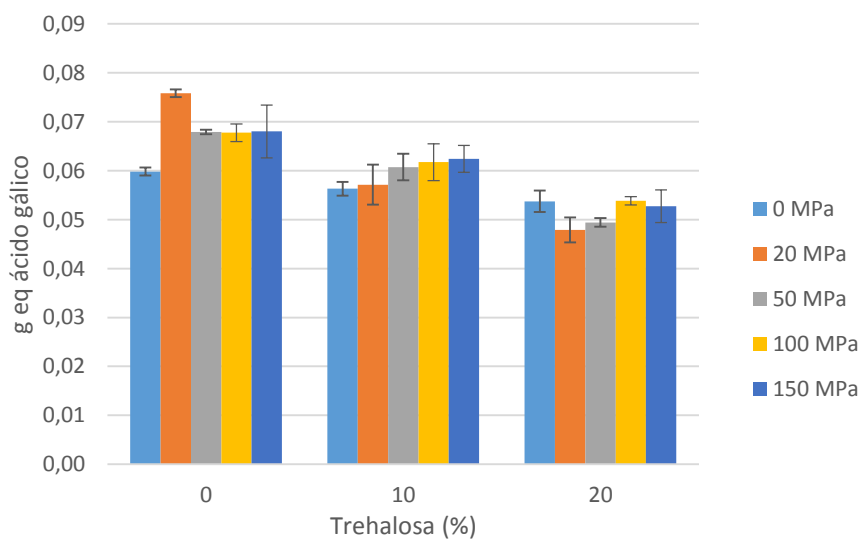


Figura 4. Contenido en fenoles del zumo de mandarina natural con diferente presión de homogeneización en función de la concentración en trehalosa.

4.2.2. Contenido en flavonoides totales

La determinación de los flavonoides presentes en los productos estudiados se realizó mediante el método colorimétrico referido en el apartado de material y métodos, utilizando quercetina como patrón de referencia. Los resultados se expresan en gramos equivalentes de quercetina por cada 100 gramos de producto (**figuras 6 y 7**).

El análisis estadístico de los resultados, puso de manifiesto un efecto significativo ($p\text{-value}\leq 0,05$) tanto de la presión de homogeneización como de la concentración de trehalosa así como su interacción.

Generalmente el contenido en flavonoides es mayor en las muestras sin trehalosa, este hecho, del mismo modo que ocurre con los fenoles totales, indica que pueda haber algún

tipo de interacción con la trehalosa (Oku *et al.*, 2003; Oku *et al.*, 2005). Es necesario poner de manifiesto que se ha evaluado el contenido en flavonoides de una disolución de trehalosa y se ha obtenido que no reacciona con el cloruro de aluminio.

En cuanto al efecto de la aplicación de presiones de homogeneización sobre el contenido en flavonoides, para el caso de los zumos sin trehalosa se observa un claro aumento por el hecho de aplicar el tratamiento de presión, no habiendo grandes diferencias entre los niveles de presión aplicados. La liberación de flavonoides asociados a la pulpa suspendida y la estabilización de la nube permiten explicar este efecto. Sin embargo, para los casos en los que se ha incorporado trehalosa al zumo no se observa este efecto positivo derivado de la aplicación de presión.

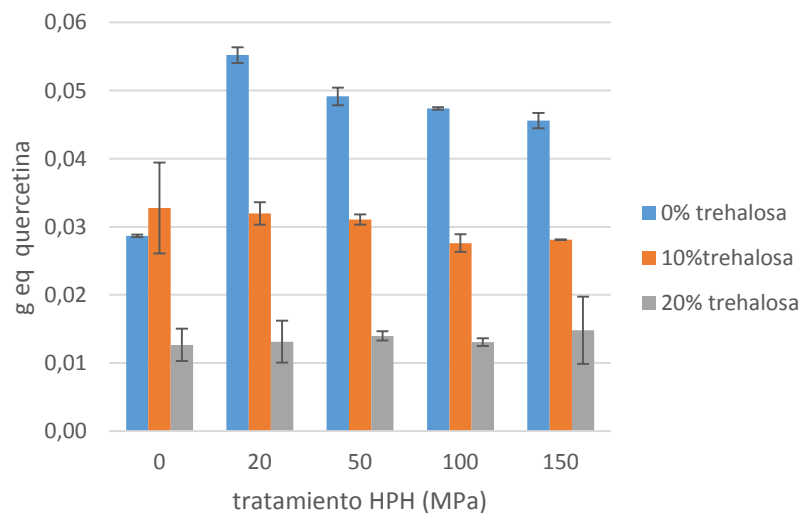


Figura 5. Contenido en flavonoides del zumo natural con diferente porcentaje de trehalosa en función de la presión de homogeneización.

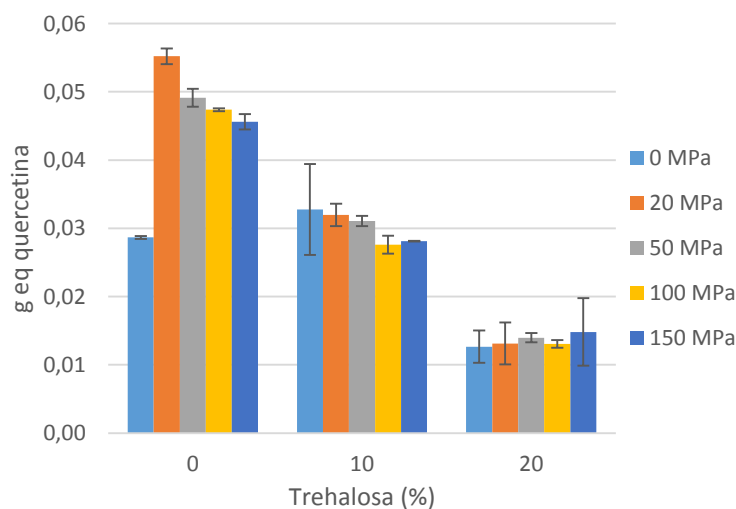


Figura 6. Contenido en flavonoides del zumo natural con diferentes presiones de homogeneización en función del porcentaje en trehalosa.

4.2.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó por los métodos 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) y 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS).

La determinación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS se realizó utilizando trólox como reactivo de referencia. Se obtuvo la recta de calibrado realizando las medidas a los seis minutos de reacción. Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición de trólox equivalente. Los resultados, para las diferentes presiones de homogeneización, se han representado en función del contenido en trehalosa en la **figura 8**.

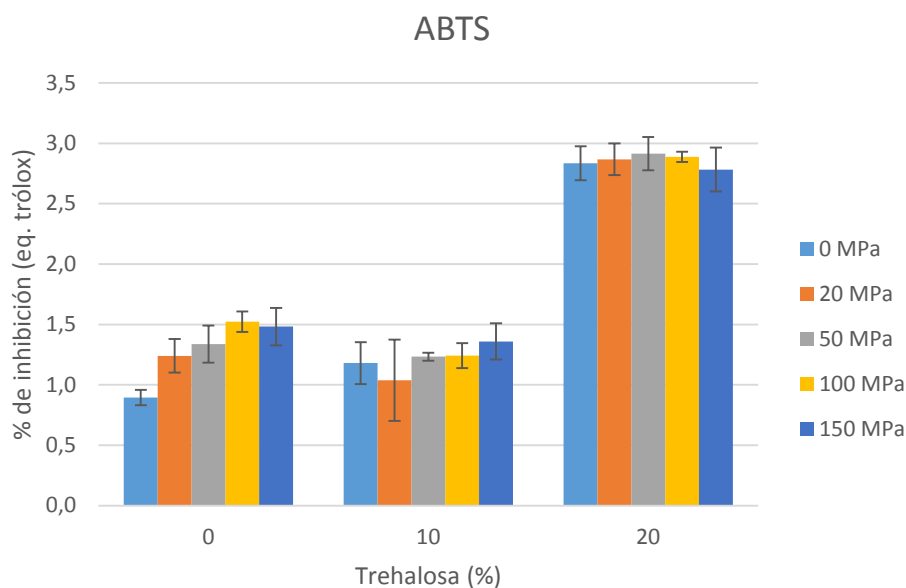


Figura 7. Capacidad antioxidante mediante ABTS según las diferentes presiones de homogeneización en función del contenido en trehalosa.

El análisis estadístico de los resultados, puso de manifiesto un efecto significativo ($p\text{-value} \leq 0,05$) tanto de la presión de homogeneización como de la concentración de trehalosa así como su interacción.

Se observa que al aumentar el contenido de trehalosa en el zumo hay un mayor porcentaje de inhibición, y por tanto, una mayor capacidad antioxidante. Como indica Polydera *et al.*, (2005) con la adición de antioxidantes se disminuye la absorbancia del ABTS y por tanto se aumenta su porcentaje de inhibición. Este reactivo puede ser soluble tanto en medio acuoso como orgánico siendo más afín a compuestos hidrofílicos, como el ácido ascórbico, que reaccionan instantáneamente con radicales libres.

En las muestras con un 20% de trehalosa se aprecia un incremento del porcentaje de inhibición, en cambio en las que contienen un 10% no hay aumento significativo con respecto a las que no tienen trehalosa. Esto puede deberse a que una concentración del 10% es suficiente para que, como se ha explicado anteriormente, toda la trehalosa reaccione con los grupos -OH de fenoles y flavonoides. En cambio al 20% puede quedar trehalosa en exceso, aumentando el porcentaje de inhibición. Los grupos -OH de la trehalosa reaccionarían con el radical libre ABTS[•], ya que se comprobó experimentalmente que este azúcar proporciona cierto porcentaje de inhibición.

En cuanto a los efectos por la aplicación de las presiones de homogeneización se obtiene un ligero incremento de la capacidad antioxidante al aumentar la presión del tratamiento, aunque estas diferencias solo son estadísticamente significativas en los zumos sin trehalosa. Este hecho, pone de manifiesto de nuevo que la aplicación de presiones de homogeneización en el zumo, aumenta la disponibilidad de los compuestos antioxidantes.

La capacidad antioxidante determinada mediante el método DPPH se expresó como porcentaje de inhibición del radical DPPH* de una dilución 1:20 de las muestras. Las medidas se realizaron a 0, 30 y 60 minutos de reacción. Se tomó el valor de porcentaje de inhibición del DPPH de la reacción terminada a los 60 minutos de reacción como medida de la capacidad antioxidante.

El análisis estadístico de los resultados, puso de manifiesto un efecto significativo ($p\text{-value} \leq 0,05$) tanto de la presión de homogeneización como de la concentración de trehalosa.

En la **figura 9** puede observarse que los efectos sobre la capacidad antioxidante provocados tanto por la incorporación de trehalosa como por la aplicación de altas presiones de homogeneización, siguen la misma tendencia que los provocados por ambas variables sobre el contenido en fenoles y flavonoides. Si bien la incorporación de trehalosa reduce ligeramente el porcentaje de inhibición en los zumos no tratados con alta presión, la aplicación de una presión de homogeneización mitiga la reducción anterior.

Gil *et al.*, 2000 y Arnao, 2000 en sus artículos describieron que por la naturaleza del radical empleado, el método DPPH cuantifica, principalmente, la capacidad antioxidante asociada a componentes como los fenoles y los flavonoides. Ya que el radical DPPH, que sólo se puede disolver en medio orgánico y no en medio acuoso, es menos sensible a los antioxidantes hidrofílicos y por tanto más sensible a los hidrofóbicos.

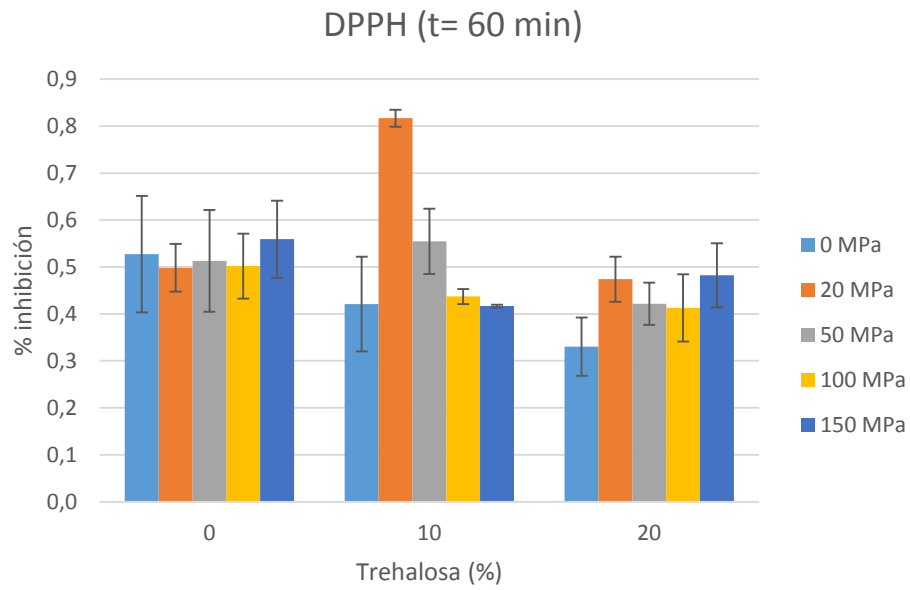


Figura 8. Capacidad antioxidante mediante DPPH de los zumos naturales Ortanique en función de las diferentes concentraciones de trehalosa y presiones de homogeneización.

5. CONCLUSIONES

El análisis del tamaño de partícula en el zumo de mandarina fresco reveló la existencia de partículas de diferente forma y tamaño y por tanto con diferente estabilidad. El efecto significativo que tanto la trehalosa incorporada como el tratamiento de HPH ejercen sobre las propiedades físico-químicas del zumo y sobre la capacidad antioxidante del mismo, parecen estar relacionadas con la interacción del disacárido con las partículas de mayor tamaño y con la reducción de tamaño y aumento de la estabilidad de la nube que provoca la aplicación de HPH.

De forma general, puede concluirse que los efectos más relevantes fueron un aumento en la estabilidad de la nube del zumo junto con la liberación de componentes con actividad antioxidante provocados por la aplicación de HPH, independiente del nivel de presión aplicada; y una interacción de la trehalosa con compuestos con actividad antirradical de naturaleza hidrofóbica. Si bien, este último efecto se tradujo en una disminución de la actividad antioxidante por diferentes métodos, el efecto en sí podría suponer una protección de los componentes antioxidantes frente a condiciones de oxidación.

6. BIBLIOGRAFÍA

ALVÍDREZ, A.; GONZÁLEZ, B.E.; JIMÉNEZ, Z. (2002). Tendencias en la producción de alimentos: Alimentos funcionales. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 3 (3).

ARNAO, M.B. (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11: 419-421.

ARNAO, M.B.; CANO, A.; ACOSTA, M. (1997). La actividad antioxidante total en zumos de cítricos como factor de calidad del producto. *Agrícola Vergel*, 192: 654-658.

BAKER, R.A.; CAMERON, R.G. (1999). Clouds of citrus juices and Juice Drinks. *Food Technology*, 53: 64-69.

BETORET, E.; BETORET, N.; CARBONELL, J.V.; FITO, P. (2008). Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *Journal of Food Engineering*, 92: 18-23.

BETORET, E.; SENTANDREU, E.; BETORET, N.; CODOÑER-FRANCH, P.; VALLS-BELLÉS, V.; FITO, P. (2012). Technological development and functional properties of an apple snack rich in flavonoid from mandarin juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16: 298-304.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebens.-Wiss.u.-Technol.*, 28: 25-30.

CAMINITI, I.M.; NOCI, F.; MUÑOZ, A.; WHYTE, P.; MORGAN, D.J.; CRONIN, D.A.; LYNG, J.G. (2011). Impact of selected combinations of non-thermal processing technologies on the quality of an apple and cranberry juice blend. *Food Chemistry*, 124: 1387–1392.

CARBONELL, J.; TÁRREGA, A.; GURREA, M.; SENTANDREU, E. (2011). Chilled orange juices stabilized by centrifugation and differential heat treatments applied to low pulp and pulpy fractions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(3): 315-319.

CARPENTER, J.F.; CROWE, J.F. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 28: 3916-3922.

CASTAGNINI, J.M.; BETORET, E.; BETORET, N.; FITO, P. (2004). Pressure Treatments in Juices Processing: Homogenization Pressures Applied to Mandarin and Blueberry Juices, en: *Juice Processing: Quality, Safety and Value-Added Opportunities*. CRC Press Taylor & Francis Group. Abingdon, 237-264.

CASTAGNINI, J.M.; BETORET, N.; BETORET, E.; FITO, P. (2015). Vacuum impregnation and air drying temperature effect on individual anthocyanins and antiradical capacity of blueberry juice included into an apple matrix. *LWT - Food Science and Technology (In Press)*.

CERDÁN-CALERO, M.; IZQUIERDO, L.; SENTANDREU, E. (2013). Valencia Late orange juice preserved by pulp reduction and high pressure homogenization: Sensory quality and gas chromatography–mass spectrometry analysis of volatiles. *LWT - Food Science and Technology*, 51(2): 476-483.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (2011). Procedimiento para la obtención de zumos pasteurizados por homogenización a alta presión. España, 2 364 515. (Cl. A23L 3/015; A23L 3/00), Fecha solicitud: 12 de Febrero de 2010, Num. Solicitud: 2010302016. Fecha aprobación: 6 de Septiembre de 2011.

CORREDIG, M.; KERR, W.; WICKER, L. (2001). Particle Size Distribution of Orange Juice Cloud after Addition of Sensitized Pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5): 2523-2526.

COSTA MORATO, D.; GOMES, C.; MARIANI, D.; NEVES, P.; DIAS, M.; DOLLY, A.; ARAÚJO, E.C. (2008). The role of trehalose and its transporter in protection against reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1780: 1408-1411.

CROWE, J.; CROWE, L.; CHAPMAN, D. (1984). Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose. *Science*, 223: 209-217.

DAOUDI, L. (2004). Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y zumo de uva. Memoria presentada para optar al grado de Doctora en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. *C.E.R. Planta de Tecnología dels Aliments*.

ELBEIN, A.D. (1974). The metabolism of α,α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 30: 227-256.

ELBEIN, A.D.; PAN, Y.T.; PASTUSZAK, I.; CARROLL, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13 (4):17-27.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; VILLANO, D; TRONCOSA, A; GRACIA-PARRILLA, M.C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56 (2).

FITO, P.; CHIRALT, A.; BARAT, J.M.; ANDRÉS, A.; MARTÍNEZ-MONZÓ, J.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N. (2001). Vacuum impregnation for development of new dehydrated products. *Journal of Food Engineering*, 49: 297-302.

GALMARINI, M.V.; CHIRIFE, J.; ZAMORA, M.C.; PEREZ, A. (2006). Determinación de la actividad de agua de soluciones no saturadas y supersaturadas del disacárido trehalosa. *Congreso Internacional de Ciencia y tecnología de alimentos*. Agencia Córdoba Ciencia. Córdoba, Argentina.

GEA MECHANICAL EQUIPMENT ITALIA S.p.A., GEA (2013). Niro Soavi - Instrucciones para el uso y el mantenimiento, PandaPLUS 2000, 10851.

GIL, M.I.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; HOLCROFT, D.M., KADER, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 4581–4589.

GRACIA, M.A. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. *Memorias del Programa de verano de la Ciencia 2007*. Universidad Autónoma de Querétano. 58. Visto el 30 de Junio de 2015.

<http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/>

GUAMIS, B.; ESCRIBU, R. (2009). Aplicaciones de la ultra alta presión homogenización para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. *Jornada Técnica sobre Tecnologías transversales de interés para la Industria Alimentaria, Farmacéutica y Cosmética*, pp. 45-52.

HIGASHIYAMA, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.*, 74 (7): 1263-1269.

KANEDA, A. (1980). Recent Topics on Lipid Peroxides. *Yukagaku*, 29: 295-300.

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

LACROIX, N.; FLISS, I.; MAKHLOUF, J. (2005). Inactivation of pectin methylesterase and stabilization of opalescence in orange juice by dynamic high pressure. *Food Research International*, 38(5): 569–576.

LI, H.; WANG, H.-L.; DU, J.; DU, G.; ZHAN, J.-C.; HUANG, W.-D. (2010). Trehalose protects wine yeast against oxidation under thermal stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26: 969-976.

LIPPACHER, A.; MÜLLER, R.H.; MÄDE, K. (2002). Semisolid SLNTM dispersions for topical application: Influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 53: 155–160.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A.; ZBARSKY, V.; DATLA, K.; DEXTER, D.; ARUOMA, O. (2005). Characterization of the antioxidant functions of flavonoids and proanthocyanicins in Mauritian black teas. *Food Research International*, 38: 357-367.

MALVERN INSTRUMENTS LTD. (2007). Sample dispersion and refractive index guide. Mastersizer 2000. MANO396 Issue 1.0.

MARTÍNEZ, N.; ANDRÉS, A.M.; CHIRALT, A.; FITO, P. (1998). El mecanismo hidrodinámico en alimentos porosos, en: *Termodinámica y cinética de sistemas alimento entorno*. EDITORIAL U.P.V. Valencia, 319-341.

MELÉNDEZ- MARTÍNEZ, A.J; VICARIO I.M.; HEREDIA, F.J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2): 149-154.

MOLYNEUX, P. (2004). The use of the setable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26(2): 211-219.

MONTERRAT, M.M. (2010). Alimentos tratados por alta presión. Aspectos nutricionales. *Actividad Dietética*, 14(2): 53-58.

MOURA, M.S.; ELESBAO, R; SOUSA DE BRITO, E; Maia de Morais, S; GOES, C; PÉREZ-JIMÉNEZ, J; SAURA-CALIXTO, F.D. (2007) Metodologia científica: Determinação da actividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS⁺. Comunicado técnico, 128. *Ministério da agricultura, Pecuária e abastecimento*. Brasil.

OKU, K.; KUROSE, M.; KUBOTA, M.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M.; TUJISAKA, Y.; OKABE, A.; SAKURAI, M. (2005). Combined NMR and Quantum Chemical Studies on the Interaction between Trehalose and Dienes Relevant to the Antioxidant Function of Trehalose. *J. Phys. Chem. B.*, 109: 3032-3040.

OKU, K.; WATANABE, H.; KUBOTA, M.; FUKUDA, S.; KURIMOTO, M.; TSUJISAKA, Y., KOMORI, M.; INOUE, Y.; SAKURAI, M. (2003). NMR and Quantum Chemical Study on the OH... π and CH...O Interactions between Trehalose and Unsaturated Fatty Acids: implication for the Mechanism of Antioxidant Function of Trehalose. *J. Am. Chem. Soc.*, 125: 12739-12748.

PAQUIN, P. (1999) Technological properties of high pressure homogenizers: the effect of fat globules, milk proteins, and polysaccharides. *Int. Dairy J.*, 9: 329–335.

PAYET, B.; SHUM CHEONG SING, A.; SMADJA, J. (2005). Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: Determination of their polyphenolic and volatile constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 10074-10079.

PAYET, B.; SHUM CHEONG SING, A.; SMADJA, J. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic constituents in cane sugar manufacturing products with their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 7270-7226.

POLYDERA, A.C.; STOFOROS, N.G.; TAOUKIS, P.S. (2005). Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chemistry*, 91: 495–503.

RAPISARDA, P.; LO BIANCO M.; PANNUZZO, P.; TIMPANARO, N. (2008). Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. *Postharvest Biology and Technology*, 49: 348-354.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical action decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10): 1231-1237.

RUDOLPH, A.S.; CHANDRASEKHAR, E.; GABER, B.P.; NAGUMO, M. (1990). Molecular modeling of saccharide-lipid interactions. *Chem. Phys. Lipids*, 53: 243-261.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; CANO, M.P.; DE ANCOS, B.; PLAZA, L.; OLMEDILLA, B.; GRANADO, F.; MARTÍN, A. (2003). Effect of orange juice intake on Vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78: 454-460.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁN, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables- evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 607-616.

THAKUR, B.R.; SINGH, R.K; HANDA, A.K. (1995). Effect of homogenization pressure on consistency of tomato Juice. *J. Food. Qual.*, 18: 389-396.

THIEBAUD, M.; DUMAY, E.; PICART, L.; GUIRAUD, J.P.; CHEFTEL, J.C. (2003). High-pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal*, 13(6): 427-439.

VEGA, G. (2014). Trehalosa, una alternativa natural para conservar alimentos. *Revista Énfasis Alimentación Latinoamericana*, Argentina. Visto el 26 de Junio de 2015

<http://www.alimentarnos.com/blog/2014/01/14/trehalosa-una-alternativa-natural-para-conservar-a/>

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R.H. (2003). Antioxidant activity of Apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:609-614.

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. (2002). Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1619-1624.