

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



## ***FORMULACIÓN DE POMELO PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS NUTRACÉUTICOS POR LIOFILIZACIÓN***

TRABAJO FIN DE GRADO EN INGENIERIA AGROALIMENTARIA Y DEL  
MEDIO RURAL

ALUMNO/A: Asensio Grau, Andrea

TUTOR/A: Martinez Navarrete, Nuria

COTUTOR/A: García Martínez, Eva

*Curso Académico: 2014-2015*

VALENCIA, FECHA



## TÍTULO: FORMULACIÓN DEL POMELO PARA LA OBTENCIÓN DE PRODUCTOS NUTRACÉUTICOS POR LIOFILIZACIÓN.

RESUMEN: Las frutas presentan elevados contenidos en compuestos bioactivos, como vitaminas, minerales, compuestos fenólicos, terpénicos, fibra, etc. Está comprobado que estas sustancias juegan un papel esencial en la prevención de ciertas enfermedades relacionadas con el daño oxidativo. No obstante, las frutas son un recurso marcado por la estacionalidad de su cultivo y con una escasa vida útil, asociado a su alto contenido en agua, lo cual limita su disponibilidad. En este sentido, podría ser de gran interés diseñar un producto nutracéutico a base de extractos de fruta. Para ello, partir de la fruta en polvo obtenida por liofilización podría ser una buena estrategia. Sin embargo, los productos en polvo presentan problemas de apelmazamiento que es necesario contrarrestar. Una técnica habitual para su estabilización es la incorporación de solutos de alto peso molecular. Por otra parte, la liofilización es un proceso caro que requiere, entre otras cosas, un largo tiempo de proceso. La eliminación parcial de agua antes de la liofilización podría ayudar a disminuir costes. En este estudio se compara el efecto de la liofilización en la calidad funcional de muestras de pomelo en polvo obtenido por liofilización sin aplicar ningún pretratamiento, con la de muestras a las que se ha incorporado goma arábiga y fibra de bambú y que se han predeshidratado parcialmente por microondas. A las cuatro muestras de pomelo planteadas se les ha extraído y cuantificado, por diferente procedimiento según el compuesto, la vitamina C, los fenoles totales y los carotenoides totales. Además se ha analizado la capacidad antioxidante de los tres extractos por tres métodos diferentes: ABTS, DPPH y FRAP. La mayor actividad antioxidante fue la que se analizó en el extracto de fenoles totales, obtenido con una disolución de metanol y agua, por lo que éste se podría considerar el mejor disolvente de extracción para la obtención de un extracto de alta capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una pérdida de la actividad antioxidante de las muestras asociada a la liofilización, sin que los pretratamientos aplicados en este estudio prevengan de la misma. No obstante, según la bibliografía revisada, la liofilización es el tratamiento de deshidratación que supone menores pérdidas de los compuestos volátiles o termosensibles, en comparación con otros procesos como la deshidratación osmótica o el secado convencional. En cuanto al método de análisis de la actividad antioxidante, el del DPPH da mejor resultado para la vitamina C y los fenoles y el del ABTS para fenoles y carotenoides.

Palabras clave: liofilización, vitamina C, fenoles totales, carotenoides

Localidad y fecha: Valencia, Agosto del 2015

Tutor: Martínez Navarrete, Nuria

Primer cotutor: García Martínez, Eva

TITLE: FORMULATION OF GRAPEFRUIT FOR THE ACHIVEMENT OF NEUTRACEUTICAL PRODUCTS BY FREEZE-DRYING.

SUMMARY: Fruits have high contents of bioactive compounds such as vitamins, minerals, phenolic and terpene compounds, fiber etc. It is proven that these substances play an essential role preventing certain oxidative damage related diseases. Nevertheless, fruits are a resource marked by the seasonal nature of its cultivation and for its limited useful life. All this is associated with its high water content which restricts their availability. In this sense, it might be of interest to design a nutraceutical product based on fruit extracts. To do this, fruit powder obtained by freeze-drying could be a good strategy. However, powders present problems of caking which is necessary to counteract. A common technique for stabilization is the addition of high molecular weight solute. Moreover, freeze-drying is an expensive process which requires, among other things, a long processing time. The partial removal of water prior to freeze-drying may help to reduce costs. In this study the effect of freeze-drying on the functional quality of the grapefruit powder samples obtained by freeze-drying, without any previous treatment, are compared to the samples which have been incorporated gum arabic and bamboo fiber pre-dehydrated by microwave. The four grapefruit samples were extracted and quantified by different procedures regarding its compound, vitamin C, total phenols and total carotenoids. In addition, the three extracts have been analyzed in their antioxidant capacity by three different methods: ABTS, DPPH and FRAP. The highest antioxidant activity was found in the total phenols extract, obtained by a methanol solution and water. This result could be considered the best extraction solvent for obtaining a high antioxidant capacity extract. The results obtained also reveal a loss of antioxidant activity associated with freeze-drying without pretreatment. In spite of that, according the reviewed bibliography, freeze-drying is the dehydration treatment which supposes smaller losses of volatile or thermosensitive compounds, in comparison to other processes such as osmotic dehydration or conventional drying. As for the method of analysis of the antioxidant activity, DPPH works best for vitamin C and phenols and ABTS has better results for phenols and carotenoids.

Key words: Freeze drying, vitamin C, total phenols, carotenoids

Author: Asensio Grau, Andrea

Place and date: Valencia, August 2015

Tutor: Martínez Navarrete, Nuria

First cotutor: García Martínez, Eva

## TITOL: FORMULACIÓ DE L' POMELO PER A L' OBTENCIÓ DE PRODUCTES NUTRACÈUTICS PER LIOFILITZACIÓ

RESUM: Les fruites presenten elevats continguts en compostos bioactius, com vitamines, minerals, compostos fenòlics, terpènics, fibra, etc. Està comprovat que aquestes substàncies juguen un paper essencial en la prevenció de certes malalties relacionades amb el dany oxidatiu. No obstant això, les fruites són un recurs marcat per l'estacionalitat del seu cultiu i amb una escassa vida útil, associat al seu alt contingut en aigua, la qual cosa limita la seva disponibilitat. En aquest sentit, podria ser de gran interès dissenyar un producte nutracèutic a base d'extractes de fruita. Per a això, partir de la fruita en pols obtinguda per liofilització podria ser una bona estratègia. No obstant això, els productes en pols presenten problemes de atapeïment que cal contrarestar. Una tècnica habitual per a la seva estabilització és la incorporació de soluts d'alt pes molecular. D'altra banda, la liofilització és un procés car que requereix, entre altres coses, un llarg temps de procés. L'eliminació parcial d'aigua abans de la liofilització podria ajudar a disminuir costos. En aquest estudi es compara l'efecte de la liofilització en la qualitat funcional de mostres d'aranja en pols obtingut per liofilització sense aplicar cap pretractament, amb la de mostres a les quals s'ha incorporat goma aràbiga i fibra de bambú i que s'han predeshidratado parcialment per microones. A les quatre mostres d'aranja plantejades se'ls ha extret i quantificat, per diferent procediment segons el compost, la vitamina C, els fenols totals i els carotenoides totals. A més s'ha analitzat la capacitat antioxidant dels tres extractes per tres mètodes diferents: ABTS, DPPH i FRAP. La major activitat antioxidant va ser la que es va analitzar en l'extracte de fenols totals, obtingut amb una dissolució de metanol i aigua, de manera que aquest es podria considerar el millor dissolvent d'extracció per a l'obtenció d'un extracte d'alta capacitat antioxidant. Els resultats obtinguts posen de manifest una pèrdua de l'activitat antioxidant de les mostres associada a la liofilització, sense que els pretractaments aplicats en aquest estudi previnguin de la mateixa. No obstant això, segons la bibliografia revisada, la liofilització és el tractament de deshidratació que suposa menors pèrdues dels compostos volàtils o termosensibles, en comparació amb altres processos com la deshidratació osmòtica o l'assecat convencional. Quant al mètode d'anàlisi de l'activitat antioxidant, el del DPPH dona millor resultat per a la vitamina C i els fenols i el del ABTS per fenols i carotenoides.

Paraules clau: liofilització, vitamina C, fenols, carotenoides.

Autor: Asensio Grau, Andrea

Lugar y data: Valencia, Agosto del 2015

Tutor: Martínez Navarrete, Nuria

Primer cotutor: García Martínez, Eva

"La vida de los otros, tal como nos llega en la llamada realidad, no es cine sino fotografía, es decir que no podemos aprehender la acción sino tan sólo sus fragmentos eleáticamente recortados. No hay más que los momentos en que estamos con ese otro cuya vida creemos entender, o cuando nos hablan de él, o cuando él nos cuenta lo que le ha pasado o proyecta ante nosotros lo que tiene intención de hacer. Al final queda un álbum de fotos, de instantes fijos; jamás el devenir realizándose ante nosotros, el paso del ayer al hoy, la primera aguja del olvido en el recuerdo."

Rayuela, Capítulo 109

Julio Cortázar

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2. OBJETIVOS .....	4
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	5
3.1 Materia prima .....	5
3.2 Preparación de la muestra .....	5
3.3 Análisis .....	5
3.3.1 Humedad .....	5
3.3.2 Compuestos bioactivos .....	6
3.3.2.1 Vitamina C .....	6
3.3.2.2 Fenoles totales .....	6
3.3.2.3 Carotenoides totales .....	7
3.3.3 Actividad antioxidante .....	7
a) Método FRAP .....	7
b) Método DPPH .....	7
c) Método ABTS .....	8
3.4 Análisis estadístico .....	8
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	9
4.1 Efecto de los tratamientos en los compuestos bioactivos .....	9
4.2 Efecto de los tratamientos en la actividad antioxidante de los extractos .....	13
4.3 Correlaciones de Pearson de los compuestos bioactivos y los métodos de análisis de actividad antioxidante .....	17
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	19
6. BIBLIOGRAFÍA .....	20

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico/ 100 g sp) de las diferentes muestras .....	10
Figura 2. Contenido en carotenoides totales (mg $\beta$ caroteno/ 100 g sp) de las diferentes muestras .....	11
Figura 3. Contenido en vitamina C (mg vitamina C/ 100 g sp) de las diferentes muestras .....	12
Figura 4. Resultado de la interacción entre los factores muestra y método de análisis mostrada por MANOVA ( $p < 0,05$ ) para la actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) .....	16
Figura 5. Resultado de la interacción entre los factores muestra y extracto mostrada por MANOVA ( $p < 0,05$ ) para la actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) .....	16
Figura 6. Resultado de la interacción entre los factores extracto y método de análisis mostrada por MANOVA ( $p < 0,05$ ) para la actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) .....	17

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la muestra y tratamientos empleados .....	5
Tabla 2. Valores medios y desviación estándar de la humedad de las diferentes muestras .....	9
Tabla 3. Valores medios de actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) y desviación estándar (entre paréntesis) en los extractos de vitamina C .....	14
Tabla 4. Valores medios de actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) y desviación estándar (entre paréntesis) en los extractos de fenoles totales .....	14
Tabla 5. Valores medios de actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) y desviación estándar (entre paréntesis) en los extractos de carotenoides totales .....	15
Tabla 6. Prueba de rangos múltiples (MANOVA) para la actividad antioxidante con los factores muestra, extracto y método de análisis .....	15
Tabla 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre las actividades antioxidante (AAO) medidas por cada método y los compuestos analizados en cada extracto .....	17

## 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente el consumo de alimentos de alto valor nutricional está siendo un hábito muy destacado. Los consumidores buscan productos que sean sanos y no tengan ningún perjuicio para la salud, ya que hay estudios que achacan multitud de enfermedades a la mala alimentación (Cervera et al., 2004; Elias, 2014). Como decía Hipócrates: “Que el alimento sea tu medicina y que tu medicina sea tu alimento”.

El ritmo de vida actual ha provocado que haya una disminución en el consumo de frutas y verduras. Los alimentos de origen vegetal son componentes esenciales de una dieta saludable. Un consumo suficiente de éstos podría contribuir a la prevención de enfermedades importantes como las cardiovasculares e incluso algunos tipos de cáncer (Block et al., 1992; Delgadillo y Calani, 2014). Estudios relativamente recientes recomiendan la ingesta de 400 g diarios de frutas y verduras para prevenir enfermedades como cardiopatías, cáncer, diabetes o la obesidad (OMS, 2005). Además de los micronutrientes que aportan estos alimentos, vitaminas entre ellos, hay estudios que afirman que el beneficio que causa el consumo de frutas para la salud se debe a la presencia de un amplio número de otros compuestos bioactivos, sin valor nutritivo propio, que pertenecen al grupo de los fitoquímicos o fitonutrientes (Willet, 1994; Ness y Powles, 1997; Law y Morris, 1998; Temple, 2000; Prior, 2003; Kuskoski et al, 2005; Almajano, 2009). Los dos grupos mayoritarios de fitoquímicos presentes en las frutas son las sustancias terpénicas y las fenólicas, entre las cuales encontramos a los carotenoides y a los flavonoides, que son, respectivamente, los grupos más representativos de ambas sustancias (Robards et al., 1999; Manach et al., 2004). Por su parte, las vitaminas más abundantes son la C, la A y la E. Todos estos compuestos parecen deber su bioactividad fundamentalmente a su capacidad antioxidante, que ayuda a la prevención de algunas patologías como enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares, diabetes tipo 2, cierto tipos de cánceres e incluso la enfermedad del Alzheimer (Martínez-Navarrete et al., 2008). Los cítricos en general y el pomelo, en particular, son una fuente importante de flavonoides, vitamina C y  $\beta$ -caroteno (Pérez-Jiménez et al., 2008; Xu et al., 2008; Igual et al., 2012; Martínez-Lahuerta et al., 2013).

Cuando se produce una oxidación, una especie cede electrones a la otra reduciéndola. En estas reacciones se producen radicales libres, que son especies químicas muy oxidativas capaces de provocar daños en el organismo. Los antioxidantes evitan la interacción entre los radicales libres y las principales biomoléculas del organismo. La demanda de compuestos antioxidantes por parte del consumidor y la magnífica fuente de estos compuestos que, de forma natural, son las frutas, apunta la posibilidad de ofrecer al mercado un nutracéutico o suplemento dietético obtenido de frutas. El término nutracéutico se define como cualquier sustancia que, sea considerada un alimento o parte del mismo, tenga efectos beneficiosos en la salud, incluyendo, por tanto, la prevención o tratamiento de enfermedades (Andlauer et al., 2002; Cortés et al., 2005; Pandey, 2010; Jackson y Pailyath, 2011). Estos suplementos dietéticos, pueden ser ingeridos de forma concentrada como píldoras, pastillas o cápsulas (Cruzado y Cedrón, 2012).

Un nutracéutico de fruta puede consistir en un extracto de sus compuestos bioactivos. Para llevar a cabo la extracción de los diferentes compuestos es necesario utilizar distintos tipos de

disolventes, generalmente disolventes orgánicos en medio acuoso, con diferente polaridad dependiendo de los compuestos antioxidantes a extraer (Pérez-Jiménez et al., 2008). Los más utilizados para la extracción de los antioxidantes de vegetales y frutas son el agua, etanol, metanol y acetona (Povilaitis et al., 2015). Tanto el tipo de disolvente como las propiedades químicas del alimento son dos factores importantes que se han de considerar para la extracción (Xu et al., 2007). Se ha comprobado que las mezclas de disolventes orgánicos con agua son más efectivas que utilizando disolventes puros (Zhou y Yu., 2004). Los extractos obtenidos a partir de metanol puro tienen más sustancias que interfieren en la actividad antioxidante en comparación con fracciones de metanol y agua (Ganesan et al., 2007; Boeing et al., 2014). Sin embargo, las condiciones en que la extracción se lleve a cabo (temperatura, tiempo, pH, etc.) también repercuten notablemente en el resultado final.

La atomización es uno de los métodos de secado que se utiliza para convertir materiales fluidos en partículas sólidas. Este proceso se está utilizando para la elaboración de alimentos funcionales y productos nutraceuticos (Murugesan y Orsat, 2012). En el caso de las frutas, se obtiene un polvo deshidratado que conserva la mayoría de las propiedades nutricionales, funcionales y organolépticas de la fruta fresca (Sicha y Lock de Ugaz, 1995; Alzate, 2008). Sin embargo, el alto contenido en azúcares de bajo peso molecular y en ácidos de las frutas, hace que el rendimiento de la atomización sea extremadamente bajo (Casanova, 2014). Actualmente, también se están realizando estudios para la elaboración de nutraceuticos de alta capacidad antioxidante por liofilización (Shui y Leong, 2006), técnica ampliamente utilizada para la producción de fármacos (Niwa et al., 1987; Tang y Pikal, 2004). La liofilización se utiliza para reducir la humedad de los alimentos sin someterlos a altas temperaturas, mientras que la atomización sí que aplica alta temperatura pero durante tiempos extremadamente cortos. En ambos casos, se evita en gran medida el daño a los compuestos termolábiles. Sin embargo, en el caso de las frutas, su alto contenido en azúcares y ácidos confieren al producto deshidratado una estructura pegajosa y con una elevada higroscopicidad. Para paliar este problema y mejorar el rendimiento del proceso y la calidad del producto obtenido, es frecuente adicionar solutos de alto peso molecular con un efecto encapsulante, antihumectante y antiapelmazante, como por ejemplo la goma arábiga y la fibra de bambú (Krishnan et al., 2005; López et al., 2006; Singthong et al., 2009). Ambos solutos son de origen natural y la ingesta de los mismos no tiene ninguna repercusión negativa en la salud. La goma arábiga procede del árbol de la acacia (*Acacia senegal*) y es un polisacárido que el árbol produce por exudación natural para cerrar sus heridas. Resulta muy eficaz para la encapsulación ya que es muy soluble en agua y presenta una baja viscosidad en disolución, en comparación con otros hidrocoloides (McNamee et al., 1998; Egas et al., 2014). Además tiene gran capacidad de retención de sustancias volátiles y protege de la oxidación (Gabas et al., 2007). La fibra de bambú procede de la subfamilia *Bambusoideae* y se extrae de la planta conocida como bambú. Sus constituyentes principales son la celulosa, hemicelulosa y lignina. Las fibras también están dotadas de otros compuestos no estructurales como son la pectina, sales inorgánicas, ceras y sales nitrogenadas (Quintero y González, 2006; Majeed et al., 2013). La fibra de bambú se está utilizando para mejorar la estabilidad en los alimentos, además de conferirles algunas de las características beneficiosas propias de las fibras (Colin-Henrion et al., 2009), contribuyendo a la prevención de enfermedades crónicas (Ramírez y Pacheco, 2009).

Pero a pesar del uso de estos solutos como coadyuvantes tecnológicos, el rendimiento de la atomización de frutas es extremadamente bajo, lo que hace más indicada la liofilización. En este caso, su principal desventaja es el largo tiempo de proceso y el alto consumo de energía que supone el hecho de ser un proceso a vacío, lo que conlleva un elevado coste. Una posibilidad para tratar de reducir costes sería realizar una deshidratación previa del alimento a liofilizar. La deshidratación por microondas es una técnica que está siendo muy utilizada por la industria agroalimentaria debido a las ventajas que tiene en la transferencia de calor frente a procesos convencionales. Las microondas son ondas electromagnéticas que se generan a una frecuencia concreta y se basan en el calentamiento dieléctrico que supone la rotación dipolar que se da en las moléculas de agua que contienen los alimentos. El agua tiene una carga neutra pero presenta una distribución asimétrica de sus electrones que la convierte en una molécula polar, por ello se comporta como un dipolo. El giro y choque de las moléculas de agua causado por la rotación dipolar provoca una energía que se disipa en forma de calor. De esta forma, es el agua, sobre todo, lo que se calienta, llegando el calor al resto del sustrato por conducción (Khraisheh et al., 1997; Fito et al., 2001). Así, se produce un calentamiento volumétrico del alimento y no sólo de su superficie, siendo por tanto más rápido (Drouzas y Schubert, 1996; Feng y Tang, 1998; Maskan, 2000; Fito et al., 2001). Además se ha visto que la deshidratación por microondas contribuye a mejorar la actividad antioxidante de ciertas sustancias fenólicas (Hayat et al., 2010).

## 2. OBJETIVOS

Con la intención de conocer la viabilidad de la liofilización para la obtención de un producto nutracéutico con alta capacidad antioxidante, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto que la incorporación de solutos combinada con una pre-deshidratación parcial por microondas y la propia liofilización pueden tener en los compuestos bioactivos de pomelo y en su actividad antioxidante. Para ello se han ensayado diferentes métodos de análisis de la actividad antioxidante de diferentes extractos obtenidos a partir de las muestras.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Materia Prima

Para este estudio, se utilizó pomelo (*Citrus paradise*) de la variedad Star Ruby, adquirido en un supermercado de la ciudad de Valencia procedente de Murcia. Se seleccionaron frutas sin daños físicos, con un tamaño y el color lo más uniforme posible. Algunas muestras se formularon incorporando goma arábica (GA), de Scharlab S.L. (Sentmenat, España), y fibra de bambú (FB), de J.Rettenamaier & Söhne (JRS) (Rosenberg, Alemania).

#### 3.2 Preparación de la muestra

Se prepararon cuatro muestras de pomelo distintas (Tabla 1). Para obtener las diferentes muestras se partió de pomelo que previamente fue lavado, pelado y cortado. A continuación la fruta se trituró con un robot de cocina (Thermomix TM21, Vorwerk, Spain). Parte del puré de pomelo obtenido se separó constituyendo la primera muestra PF (pomelo fresco) y otra parte se liofilizó para así obtener la muestra PFL. Para ello el puré se dispuso en bandejas de aluminio con 0,5 cm de espesor que se congelaron a -45°C (Liebherr Mediline 7083 207-00) durante 48 horas. Posteriormente las bandejas se colocaron en el liofilizador (Telstar Lioalfa-6) a 0,021 mPa y a una temperatura de -45 °C en el condensador durante 48 horas. Una vez obtenidas las muestras liofilizadas, se trituraron hasta conseguir un polvo homogéneo. Además se preparó muestra en condiciones óptimas para la obtención de pomelo liofilizado en polvo (Machirant, 2014). Ello supuso la incorporación de GA y FB en las proporciones descritas en la TABLA 1 (Thermomix TM21, Vorwerk, Spain) y la aplicación de un tratamiento de microondas (Moulinex, Ultimys Duo Comby) a 2W/g hasta dejar a la muestra con 72 g agua/100 g mezcla. A esta muestra se le denominó Ps+Mw, parte de la cual se liofilizó para obtener la muestra Ps+MwL, en las mismas condiciones descritas para la obtención de la muestra PFL.

**Tabla 1. Composición de las muestras y tratamientos empleados.**

Código de la muestra	FB <sup>(1)</sup>	GA <sup>(2)</sup>	Deshidratación parcial por microondas	Liofilización
PF	0	0	NO	NO
Ps+Mw	0,476	3,78	SI	NO
PFL	0	0	NO	SI
Ps+MwL	0,476	3,78	SI	SI

<sup>(1)</sup> FB: fibra de bambú (g / 100g puré de pomelo), <sup>(2)</sup> GA: goma arábica (g / 100g puré de pomelo).

#### 3.3 Análisis

##### 3.3.1 Humedad

Se siguió el método oficial 20.013 AOAC (1990) para alimentos ricos en azúcares. Éste se basa en determinar la pérdida de peso (balanza analítica AE 100, Mettler Toledo XS204) de una muestra que se coloca en una estufa a vacío (Vaciotem, JP Selecta) a 60°C ± 5°C, a una presión inferior a 100 mmHg hasta alcanzar peso constante. Los resultados se expresaron como g de agua/ g de muestra.

### 3.3.2 Compuestos bioactivos

A las muestras PF, Ps+Mw, PFL y Ps+MwL se les cuantificó, por triplicado, la vitamina C, fenoles totales y carotenoides totales. Se calculó la media y la desviación estándar. Con fines comparativos, todos los resultados se expresaron referidos a 100 g de solutos de pomelo (sp), según la ec. (1).

$$m_i = \frac{m \cdot \left[ \frac{m_m + v \cdot \rho}{m_m} \right]}{m_m \cdot (1 - X_w) \cdot X_{sp/st}} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde:

$m_i$ : cantidad de compuesto analizado (mg/100 g sp)

$m$ : cantidad de compuesto analizado en el extracto (mg/g disolución)

$m_m$ : masa de muestra analizada (g)

$v$ : volumen de disolvente de extracción (mL)

$\rho$ : densidad del disolvente de extracción (g/mL)

$X_w$ : humedad de la muestra analizada (g agua/g muestra)

$X_{sp/st}$ : (g solutos de pomelo/g solutos totales) en la muestra analizada

#### 3.3.2.1 Vitamina C

Para la extracción de la vitamina C se empleó como disolvente una disolución de ácido oxálico en agua (Xu et al., 2008). Se mezcló 1 g de la muestra correspondiente con 9 mL de disolución de ácido oxálico al 0,1% en agua (p/v), en agitación magnética durante 20 minutos y se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm a una temperatura de 20°C. Finalmente se recuperó el sobrenadante, al que se analizó el contenido en vitamina C. Para ellos se procedió a la reducción del ácido dehidroascórbico a ácido ascórbico usando el reactivo de DL-ditiotreitol (Sánchez-Mata et al., 2000; Sánchez Moreno et al., 2003). La determinación de vitamina C se llevó a cabo por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según Xu et al. (2008), midiendo la absorbancia a 243 nm. El HPLC empleado (Jasco, Italia) consta de una bomba ternaria (Jasco PU-1580 HPLC pumb), un generador de gradiente (LG-1580-02 Ternary Gradient Unit) y un detector UV-visible (MD-1510) con un intervalo de medida de longitud de onda 190 hasta 650 nm. El equipo cuenta también con un desgasificador incorporado y un inyector automático. Se empleó una columna Zorbax SB-C18 de 5 $\mu$ m (4,6 x 25 mm), junto con una precolumna (C18 Teknokroma). Los resultados se expresaron como mg de vitamina C/ 100 g sp.

#### 3.3.2.2 Fenoles totales

La extracción se realizó mezclando 1 g de la muestra con 9 mL de una disolución de metanol: agua (70:30) (Farinha, 2014; Spaggiari, 2014), en agitación magnética y se centrifugó en las

mismas condiciones que en el punto 3.3.2.1. En el sobrenadante se analizaron los fenoles totales, por espectrofotometría (espectrofotómetro UV-visible, Thermo Electron Corporation, USA), realizando el ensayo Folin-Ciocalteu, según Benzie y Strain, (1999) y Selvendran y Ryden (1990). Para ello se tomaron 250  $\mu\text{L}$  del extracto (o de agua en el caso del blanco), al que se le añadieron 15 mL de agua bidestilada y 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, dejándolo reposar durante 8 minutos. A continuación se le añadió 3,75 mL de una disolución de carbonato de sodio al 7,5 % (p/v) y se enrasó a 25 mL con agua bidestilada. Se mantuvo en oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 horas y se procedió a medir la absorbancia a 765 nm. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico / 100 g sp.

### 3.3.2.3 Carotenoides totales

Para llevar a cabo esta extracción se partió del precipitado obtenido en la extracción de los fenoles totales, el cual se pesó y se mezcló con una disolución de hexano:acetona:etanol (50:25:25) (Barba et al., 2006) en la misma proporción y condiciones que en los apartados 3.3.2.1. y 3.3.2.2. La determinación de los carotenoides totales se llevó a cabo por espectrofotometría según AOAC (1996). Para ello el sobrenadante obtenido se mezcló con agua en una proporción de 100 mL de extracto con 15 mL de agua. A continuación se agitó con el vortex durante 2 minutos y se separaron dos fases. Se extrajeron 600  $\mu\text{L}$  de la parte liposoluble. Posteriormente se llevó a sequedad con nitrógeno y al producto resultante se le añadió 1 mL del disolvente tetrahidrofurano:acetonitrilo:metanol (15:30:55), utilizado también como blanco. Se midió la absorbancia a 446 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Thermo Electron Corporation, USA). Los resultados se expresaron como mg de  $\beta$ -caroteno / 100 g sp.

### 3.3.3 Actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante de cada uno de los extractos obtenidos para el análisis de los compuestos bioactivos (3.3.2.) por tres métodos diferentes. Todas las medidas se realizaron por triplicado. En todos los casos se utilizó un espectrofotómetro UV-visible Thermo Electron Corporation, USA.

#### a) Método FRAP (Benzie y Strain, 1996; Pulido et al., 2000; Thaipong et al., 2006).

Este método consiste en reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  presente en el TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) a  $\text{Fe}^{2+}$ . La actividad antioxidante presente en la muestra determina la cantidad de  $\text{Fe}^{3+}$  que ha sido reducido. El complejo reducido posee una coloración azul intensa que presenta su máxima absorción a 593 nm. Para la medida se añadió, en una cubeta espectrofotométrica, 900  $\mu\text{L}$  de reactivo FRAP a 37°C, 30  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada y 30  $\mu\text{L}$  de extracto o de disolvente de extracción en el caso del blanco. A continuación se midió la absorbancia a 593 nm. Los resultados se expresaron como mmoles equivalentes de trolox equivalente (TE)/ 100 g sp.

#### b) Método DPPH (Puupponen-Pimiä et al., 2003)

Este método consiste en la reducción del radical DPPH a DPPH-H. Se midió la absorbancia a 515 nm de 3 mL del reactivo DPPH (absorbancia a tiempo cero,  $A_0$ ). A continuación se añadieron 30  $\mu\text{L}$  del extracto y se midió la absorbancia de nuevo a los 2,5 minutos, cuando la reacción se había estabilizado ( $A_{2,5}$ ). Se calculó el porcentaje de DPPH en función de la ecuación (2).

$$\%DPPH = \frac{A_0 - A_{2,5}}{A_0} \cdot 100 \quad (2)$$

Los resultados se expresaron como mmoles equivalentes de trolox equivalente (TE)/ 100 g sp.

c) Método ABTS (Re et al., 1999; Arnao et al., 2001; Thaipong et al., 2006)

Este método consiste en formar el radical ABTS<sup>•+</sup> el cual va a ser reducido por las sustancias antioxidantes presentes en la muestra. Se preparó una disolución de ABTS 7mM y persulfato de potasio 2,45 mM (1:0,5) y se mantuvo en refrigeración y en oscuridad entre 12 y 16 horas para que se formase el radical ABTS<sup>•+</sup>. Una vez transcurrido el tiempo se diluyó en etanol hasta obtener un valor de absorbancia a 734 nm de 0,7 nm. En una cubeta espectrofotométrica se añadió 1 mL del reactivo anterior y 10 µL del extracto y se midió la absorbancia a 734 nm inicialmente y pasado un minuto, cuando la reacción ya se había estabilizado. Los resultados se expresaron como mmoles equivalentes de trolox equivalente (TE)/ 100 g sp.

### 3.4 Análisis estadístico

Para estudiar las posibles diferencias significativas entre las muestras se realizaron análisis de la varianza unifactoriales (ANOVA) y multifactorial (MANOVA), a un nivel de confianza del 95% (p<0,05). También se realizaron correlaciones de Pearson entre la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos en cada extracto. Para llevar a cabo los análisis se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV.

#### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 2 muestra los valores medios, con su desviación estándar entre paréntesis, de humedad de cada una de las muestras procesadas.

**Tabla 2. Valores medios y desviación estándar de la humedad de las diferentes muestras.**

Muestras	$X_w^{(1)}$
PF	0,867(0,001)
Ps+Mw	0,699(0,003)
PFL	0,033(0,001) <sup>b</sup>
Ps+MwL	0,028(0,001) <sup>a</sup>

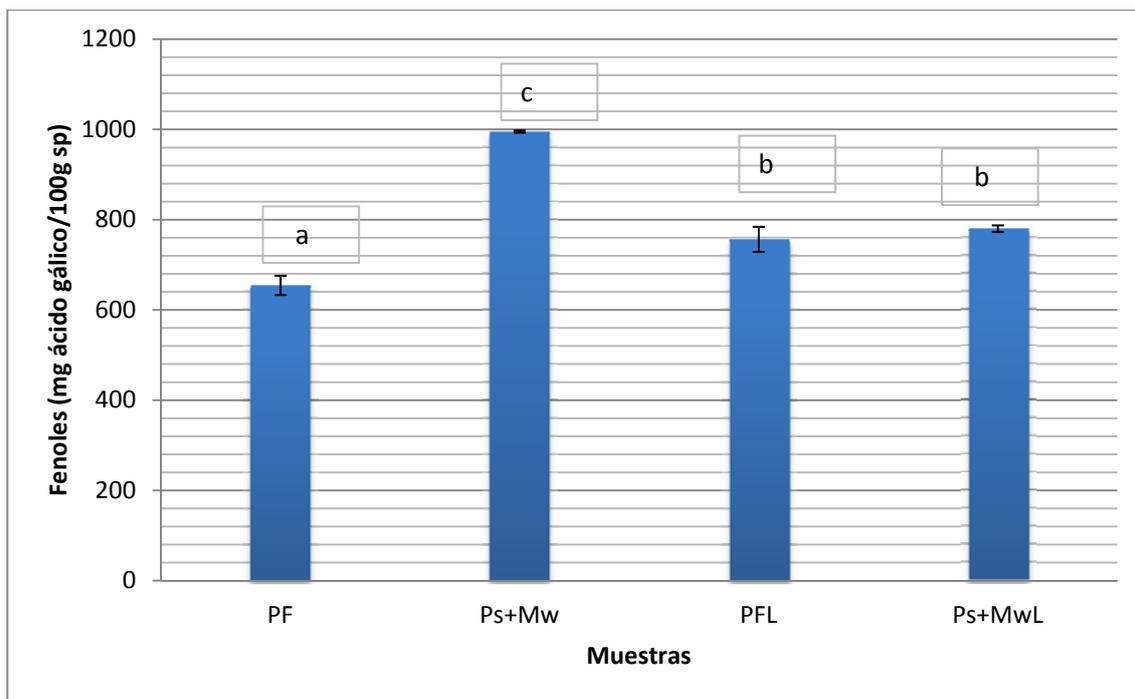
$X_w^{(1)}$  : humedad (g agua/g muestra). a-b: Superíndices diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ) para el ANOVA realizado entre las muestras liofilizadas.

Se partió de pomelo con una humedad de 0,867(0,001) g agua/g muestra, valor similar al obtenido en otros estudios con esta fruta (Igual et al., 2015). Al aplicar el tratamiento por microondas a la muestra de puré de pomelo con solutos, se alcanzó la humedad objetivo de 70 g agua/100 g muestra.

Según los resultados obtenidos para la humedad de las muestras liofilizadas, se puede observar que el pretratamiento de deshidratación por microondas permitió obtener un producto final liofilizado con menor humedad ( $p < 0,05$ ) que la del producto sin pretratamientos, empleando las mismas condiciones de liofilización en ambos casos. Así, parece que la combinación solutos añadidos-deshidratación parcial por microondas previos a la liofilización favorece la eliminación del agua en el posterior proceso de liofilización, lo que podría estar relacionado con un aumento del agua congelable de la muestra. Esto permitiría disminuir el tiempo de liofilización del producto, ahorrando energía y mejorando la eficacia del proceso.

##### 4.1 Efecto de los tratamientos en los compuestos bioactivos

En la Figura 1 se observan los valores medios de fenoles totales, con sus correspondientes desviaciones estándar.



a-c: Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

**Figura 1. Contenido en fenoles totales (mg ácido gálico/ 100 g sp) de las diferentes muestras.**

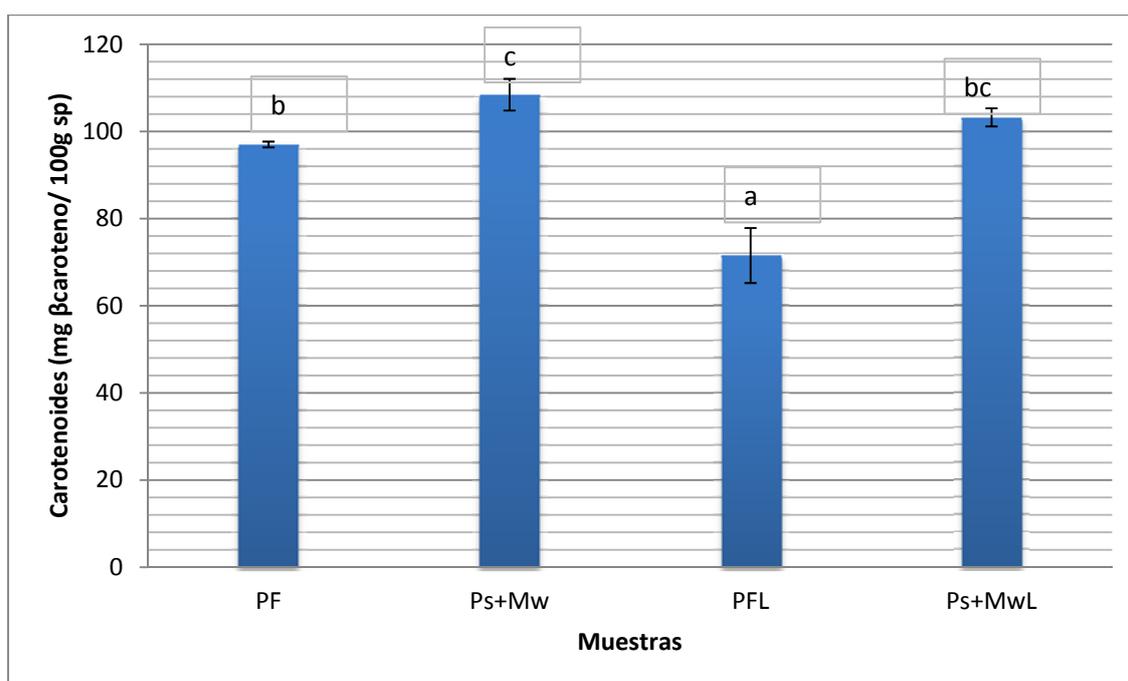
El contenido en fenoles totales del pomelo fresco fue de 87 mg ácido gálico/100 g pomelo, del orden de lo obtenido en otros estudios para pomelo (Toh et al., 2013; Igual et al., 2015) y para otras frutas cítricas, en concreto naranja (Klimczak et al., 2007). Como se puede ver en la Figura 1, donde, a efectos comparativos, los valores de fenoles totales se expresan por 100 g de solutos de pomelo, existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los analizados en las muestras PF y Ps+Mw. Con los pre-tratamientos se aumenta significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido de estos compuestos: 654 mg ácido gálico/ 100 g sp en la muestra PF frente a 995 mg ácido gálico/ 100 g sp en Ps+Mw. Este aumento del 52 % podría deberse a que el pretratamiento con microondas pudo inducir la ruptura de las cadenas polifenólicas y la consecuente liberación de grupos fenólicos libres. Los compuestos fenólicos están compuestos por dos anillos bencénicos y uno heterocíclico con oxígeno formando un núcleo fenil-2-benzopirona, que se unen entre sí formando largas cadenas polifenólicas (Dergal, 2005). El aumento de temperatura puede desencadenar la ruptura entre los enlaces de los grupos y la consecuente formación de otras sustancias fenólicas (Hayat et al., 2010). Además, también el calentamiento puede provocar rupturas celulares y favorecer la extracción de compuestos (Benlloch, 2015).

También se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de fenoles del pomelo fresco con la liofilización, como ya observó Pinela et al. (2012) trabajando con *Tuberaria lignosa*. Se produjo un aumento del 16% del contenido en compuestos fenólicos en la muestra PFL respecto a PF. Esto podría justificarse por los efectos de la congelación previa al secado por liofilización, sobre la matriz de la fruta. Durante la congelación se forman cristales de hielo que pueden romper la estructura celular facilitando la liberación de los grupos fenólicos de la matriz y también la posterior entrada del disolvente, mejorando así su extracción (Dorta et al., 2012). Sin embargo, comparando Ps+Mw y Ps+MwL se observó una disminución del contenido

en fenoles ( $p < 0,05$ ) debido a la liofilización. Esto podría deberse a que los nuevos compuestos fenólicos formados y liberados durante la deshidratación por microondas sean más sensibles a la liofilización y se pierdan durante el proceso, no observándose ningún efecto protector por los solutos adicionados. Las pérdidas en el contenido fenólico de la muestra Ps+Mw como consecuencia de la liofilización fueron del 22%.

En cualquier caso, existen estudios que afirman que hay ciertas sustancias que pueden interferir en la cuantificación de los polifenoles por el ensayo de Folin-Ciocalteu. Aunque el objetivo de este ensayo es medir la capacidad que tienen los polifenoles de reducir al Mo(VI) en el complejo molibdotungstato, este reactivo es susceptible de ser reducido por otros compuestos reductores como la vitamina C presentes en la muestra (Asami et al., 2003; Huang et al., 2005). En este sentido, con la disolución metanol:agua utilizada para la extracción de los fenoles en este estudio, se podrían haber extraído otros compuestos hidrosolubles, además de los polifenoles, como es el caso del ácido ascórbico, por lo que el resultado de este análisis podría representar una sobre-estimación del contenido de polifenoles totales en las muestras.

En la Figura 2 se observan los carotenoides analizados en las diferentes muestras formuladas y sus correspondientes desviaciones estándar.



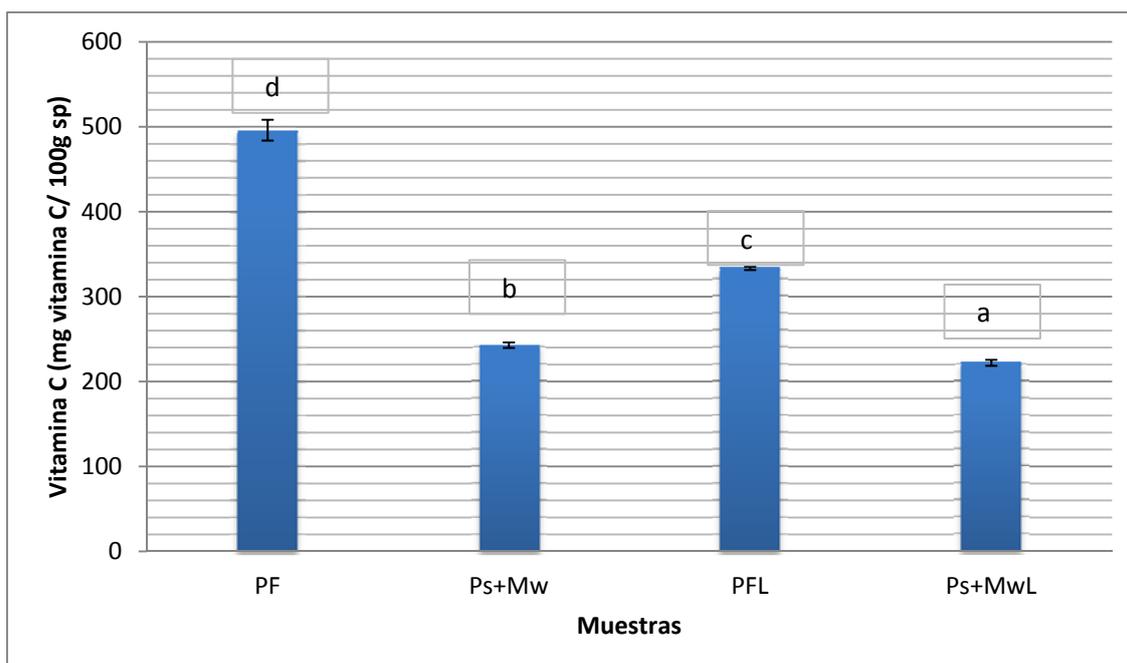
a-c: Letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

**Figura 2. Contenido en carotenoides totales (mg  $\beta$ caroteno/ 100 g sp) de las diferentes muestras.**

El contenido en carotenoides de PF (13 mg  $\beta$ -caroteno/ 100 g pomelo) coincide con el obtenido en otros estudios para pomelo (Igual et al., 2015) y para otras frutas cítricas (Xu et al., 2008). Tal y como muestra la Figura 2, existe un aumento significativo ( $p < 0,05$ ), del 11%, en el contenido en carotenoides de Ps+Mw respecto a PF. Esto podría deberse al efecto ya comentado de la ruptura celular causada por las altas temperaturas alcanzadas durante el tratamiento por microondas, que facilitaría la extracción de los carotenoides de la muestra.

Con el tratamiento de liofilización, PFL presentó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) de carotenoides respecto a PF, igual que se ha observado en tomate (Georgé et al., 2011) y en el contenido en  $\beta$ -caroteno y licopeno del pomelo (Vanamala et al., 2005), que observan pérdidas del 26%. Tales disminuciones podrían deberse a la degradación de los carotenoides durante la liofilización. La liofilización aumenta la porosidad de la muestra por lo que los carotenoides podrían estar expuestos a más oxígeno, que podría afectar negativamente a su estabilidad (Georgé et al., 2011). Sin embargo, el proceso de liofilización no afectó significativamente ( $p > 0,05$ ) a la muestra Ps+MwL. Esto podría ser debido a que los solutos presentes en esta formulación podrían estar ejerciendo un efecto encapsulante y protector sobre las sustancias liposolubles (López, 2010; Montenegro et al., 2012).

El contenido en vitamina C de PF fue 66 mg / 100 g pomelo, similar al observado para esta fruta (Igual et al., 2015) y para otros cítricos como la naranja (Sánchez- Moreno et al 2003; Klimczak et al., 2007; Xu et al., 2008). La vitamina C se caracteriza por ser muy lábil, fácilmente oxidable y especialmente termosensible, por lo que se degrada fácilmente al alcanzar una temperatura más o menos elevada (Klimczak et al., 2007). Este compuesto es muy utilizado en tecnología de alimentos como índice de calidad nutricional de productos alimenticios. En este caso, el pre-tratamiento por microondas disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido en Vitamina C (Figura 3), siendo estas pérdidas de un 51%.



a-d: Superíndices diferentes indican diferencias significativas entre las muestras ( $p < 0,05$ ).

**Figura 3. Contenido en vitamina C (mg vitamina C/ 100 g sp) de las diferentes muestras.**

En la Figura 3 se puede observar como también la liofilización disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) el contenido en vitamina C de la muestra PF. En otros estudios (Castañeda et al., 2010) también observaron pérdidas importantes de vitamina C cuando se aplicó la liofilización en chalarina (*Casimiroa edulis*), a lo que puede contribuir, como se ha comentado anteriormente, el efecto degradativo del oxígeno, más accesible en la estructura porosa que se forma como consecuencia de la liofilización. Según estos autores, las pérdidas fueron

inferiores a las causadas por otros métodos de deshidratación, como la deshidratación osmótica a vacío, el secado convectivo, o métodos combinados. En cuanto a Ps+Mw, el proceso de liofilización también produjo una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido en vitamina C. No obstante, las pérdidas en este caso fueron sólo del 9%, por lo que los solutos podrían estar ejerciendo un cierto papel protector también sobre la vitamina C.

#### 4.2 Efecto de los tratamientos en la actividad antioxidante de los extractos.

Existe cierta controversia en cuanto a que compuestos fitoquímicos aportan mayor actividad antioxidante. Algunos autores afirman que, en las frutas, los compuestos bioactivos con más actividad antioxidante generalmente son fenoles, Vitamina C y carotenoides (Pérez-Jiménez et al., 2008). Hay autores que apuntan que la mayor actividad antioxidante de los cítricos es proporcionada por la vitamina C (Xu et al., 2008), mientras que otros estudios afirman que es consecuencia de los fenoles (Bahorun et al., 2004). La actividad antioxidante viene determinada por interacciones antagonistas o sinergistas entre las diferentes sustancias que muestran esta actividad (Gil y Rojano, 2009), así como por el modo de acción concreto de cada una de ellas, por lo que no hay un acuerdo en el mejor método a utilizar para su análisis, aconsejándose combinar más de un método para evaluar de manera correcta la capacidad antioxidante de una muestra (Pérez-Jiménez et al., 2008). En este sentido, en los últimos años se han desarrollado gran cantidad de métodos para evaluar la actividad antioxidante de alimentos basados en distintos aspectos. Los más comúnmente usados son la reducción de metales (FRAP) y la captación de radicales generados a partir de ciertas moléculas orgánicas (ABTS, DPPH) (Aruoma, 2003; Ozgen et al., 2006). Por otro lado, debido al diferente potencial antioxidante que presenta cada compuesto, así como a su distinta polaridad en la compleja matriz que forman los alimentos, todos los métodos de determinación de la actividad antioxidante se ven afectados por los disolventes empleados para la extracción (Pellegrini et al., 2007). Respecto a la extracción de compuestos antioxidantes, es necesario combinar al menos dos mezclas de disolventes con distinta polaridad para facilitar dicho proceso. Así, mezclas binarias de metanol, hexano o acetona con agua, frente al uso de un solo disolvente, ha proporcionado los mejores resultados en la extracción de antioxidantes en diversos productos vegetales (Wang et al., 1996; Ou et al., 2002; Pellegrini et al., 2003). También se debe analizar la capacidad antioxidante presente en el residuo de estas extracciones, muchas veces ignorado, pero que puede ser superior a la presente en el sobrenadante debido a la presencia de antioxidantes asociados a paredes celulares y macromoléculas (Pérez-Jiménez et al., 2008). Por todo esto, en este trabajo se han utilizado diferentes disolventes optimizados para la extracción de compuestos concretos y, a cada uno de ellos, se le ha analizado la capacidad antioxidante por tres métodos.

En las Tablas 3 a 5 se presentan los valores medios, con sus desviaciones estándar, de la actividad antioxidante (AAO) analizada, por los tres métodos empleados, en los extractos de vitamina C, fenoles totales y carotenoides totales, respectivamente. Se puede observar que la actividad antioxidante, del extracto de la muestra PF fue la mayor. La evolución de la AAO con los tratamientos sigue, en general, la misma tendencia que la observada para la vitamina C (Figura 3). En este caso, la aplicación de microondas a la muestra con solutos supuso unas pérdidas de actividad antioxidante por cualquiera de los tres métodos, siendo del 20, 30 y 46 % según DPPH ABTS y FRAP, respectivamente, como consecuencia de las pérdidas de vitamina C

observada por el tratamiento con microondas: 496 mg vitamina C/100 g sp presentes en la muestra PF frente a 243 mg vitamina C/ 100 g sp en Ps+Mw.

**Tabla 3. Valores medios de actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) y desviación estándar (entre paréntesis) en los extractos de vitamina C.**

Muestras	AAO ABTS	AAO DPPH	AAO FRAP
PF	1,4(0,1)	2,82(0,01)	2,4(0,1)
Ps+Mw	0,88(0,03)	1,53(0,01)	1,92(0,01)
PFL	0,92(0,06)	2,08(0,02)	2,28(0,07)
Ps+MwL	1,21(0,04)	1,27(0,02)	1,3(0,2)

En el caso del extracto de fenoles totales (Tabla 4), también la evolución de la AAO con los tratamientos sigue, en general, la misma tendencia que la observada para estos compuestos (Figura 1). La muestra que mayor actividad antioxidante presentó fue Ps+Mw. Hay autores que afirman que las altas temperaturas alcanzadas, en este caso con la aplicación de las microondas, podrían generar nuevas sustancias con carácter antioxidante, como las melanoidinas generadas en las reacciones de Maillard (Que et al., 2008; Ahmad-Qasem et al., 2013). Además, como ya se ha comentado, el aumento de temperatura debido al calentamiento por microondas podría justificar la formación y liberación de ciertos compuestos fenólicos, favoreciendo la extracción de estos compuestos de la matriz del alimento (Igual et al., 2011), lo que también contribuiría al aumento de la actividad antioxidante. Por otra parte, algunos estudios afirman que los compuestos fenólicos libres que, como se ha comentado, se forman como consecuencia del calentamiento, presentan más actividad antioxidante que los que se encuentran unidos (Hayat et al., 2010). Además, otros estudios han descrito que las altas temperaturas promueven la inactivación de enzimas oxidativas (San Juan et al., 2000), en este caso la polifenoloxidasas, evitando la degradación enzimática posterior de los polifenoles. Al aumento de actividad antioxidante de Ps+Mw respecto a las demás muestras también podría contribuir la incorporación de goma arábiga y fibra de bambú en la formulación de las muestras, puesto que estas sustancias son capaces de aportar actividad antioxidante (Borderías et al., 2005; Montenegro et al., 2012).

**Tabla 4. Valores medios de actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) y desviación estándar (entre paréntesis) en los extractos de fenoles totales.**

Muestras	AAO ABTS	AAO DPPH	AAO FRAP
PF	2,2(0,1)	2,25(0,02)	1,7(0,1)
Ps+Mw	3,23(0,01)	3,2(0,2)	2,21(0,17)
PFL	2,4(0,1)	2,4(0,1)	1,81(0,02)
Ps+MwL	2,64(0,02)	2,83(0,06)	1,95(0,06)

En general los valores de actividad antioxidante de los extractos lipofílicos de carotenoides fueron inferiores a los obtenidos en los extractos hidrofílicos, tal y como han observado otros autores (Pérez-Jiménez et al., 2008). El aumento observado en los carotenoides totales debido a la aplicación de microondas (Figura 2) sólo se refleja en la actividad antioxidante de las

muestras medida por el método FRAP. En cambio, el efecto negativo de la liofilización en el contenido en carotenoides repercute en unas pérdidas de actividad antioxidante del PF de un 59% medida por el método ABTS. Pérdidas similares han sido observados por otros autores (Kwok et al., 2004). Estas pérdidas también afectan a la muestra Ps+MwL, que presentó una disminución de su actividad antioxidante respecto a Ps+Mw del 20%.

**Tabla 5. Valores medios de actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp) y desviación estándar (entre paréntesis) en los extractos de carotenoides totales.**

Muestras	AAO ABTS	AAO DPPH	AAO FRAP
PF	0,65(0,05)	0,31(0,04)	0,50(0,03)
Ps+Mw	0,66(0,02)	0,27(0,03)	0,63 (0,01)
PFL	0,3(0,1)	0,35(0,08)	0,477(0,006)
Ps+MwL	0,5(0,1)	0,29(0,02)	0,56(0,03)

Para estudiar la significación de las diferencias observadas respecto al efecto de los tratamientos en la actividad antioxidante de los diferentes extractos analizados por los diferentes métodos, se realizó un análisis de la varianza multifactorial. Todos los factores estudiados y sus interacciones de segundo orden, e incluso de tercero, tuvieron un efecto significativo ( $\alpha < 0,05$ ) en la actividad antioxidante. La tabla 6 muestra, por factores, el resultado obtenido del MANOVA en cuanto a la comparación múltiple, para determinar qué medias fueron significativamente diferentes, según el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, al 95 % de confianza.

**Tabla 6. Prueba de rangos múltiples (MANOVA) para la actividad antioxidante con los factores muestra, extracto y método de análisis.**

		Casos	Media (mmol TE/100 g sp)	Desviación estándar
Muestra	PF	27	1,59 <sup>c</sup>	0,02
	Ps+Mw	27	1,62 <sup>c</sup>	
	PFL	27	1,44 <sup>b</sup>	
	Ps+MwL	27	1,39 <sup>a</sup>	
Extracto	Vitamina C	36	1,66 <sup>e</sup>	0,01
	Fenoles totales	36	2,41 <sup>f</sup>	
	Carotenoides totales	36	0,46 <sup>d</sup>	
Método	ABTS	36	1,42 <sup>g</sup>	0,01
	FRAP	36	1,48 <sup>h</sup>	
	DPPH	36	1,64 <sup>i</sup>	

Superíndices diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las muestras (a-c); entre los extractos (d-f) y entre los métodos (g-i).

La AAO de las muestras disminuyó con la liofilización, más en el caso de las muestras pretratadas. En cuanto a los extractos hubo diferencias significativas en los 3 casos ( $\alpha < 0,05$ ), siendo el de fenoles totales el que mostró mayor AAO, seguido del de vitamina C y, aún con menor AAO, del de carotenoides totales. En lo que se refiere a los métodos de análisis, también hubo diferencias significativas ( $\alpha < 0,05$ ) entre los 3. En este caso se obtuvieron valores mayores de AAO por el método del DPPH, seguido del FRAP y el ABTS.

El estudio de las interacciones dobles puso de manifiesto una interacción entre el método y la muestra, asociada al método del ABTS que dio un valor excepcionalmente alto en las muestras Ps+Mw y Ps+MwL (Figura 4). En cuanto a la interacción de la muestra con el extracto (Figura 5), en este caso la tendencia más anómala, cuando se compara con el contenido en los diferentes compuestos analizados en las muestras, es el que presenta el extracto de vitamina C. En la interacción entre extracto y método (Figura 6), el comportamiento menos esperado es el de FRAP del extracto de vitamina C, que da un valor excepcionalmente alto.

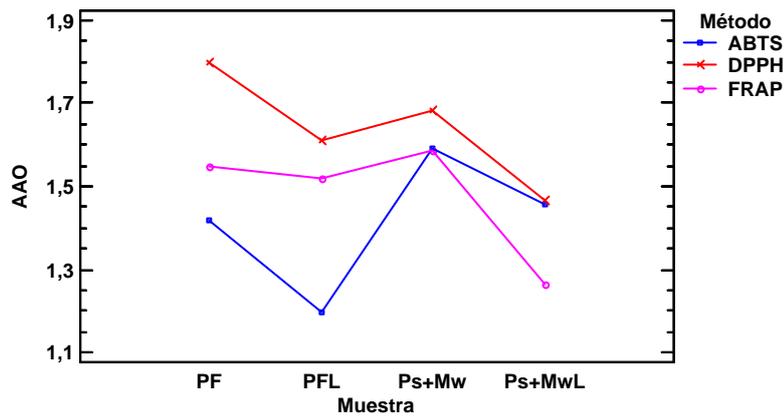


Figura 4. Resultado de la interacción entre los factores muestra y método de análisis mostrada por el MANOVA ( $p < 0,05$ ) para la actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp).

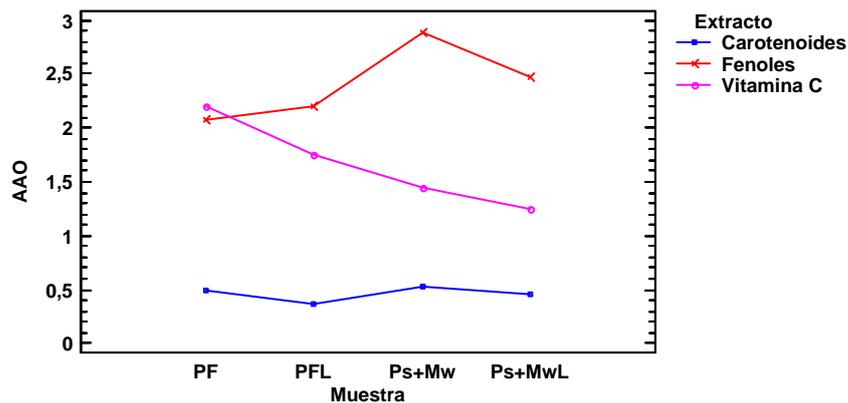
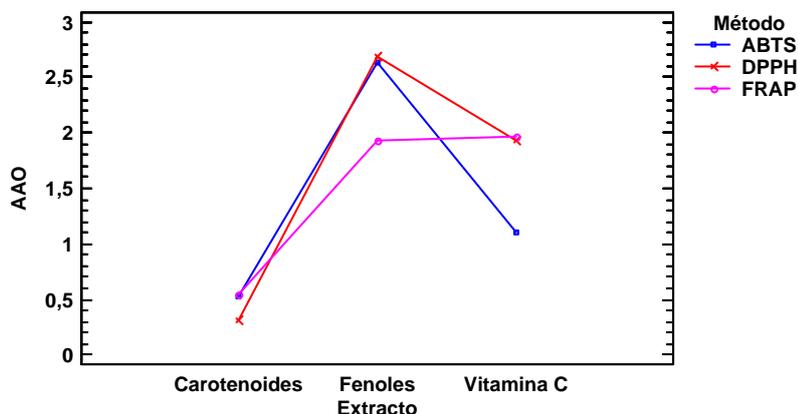


Figura 5. Resultado de la interacción entre los factores muestra y extracto mostrada por el MANOVA ( $p < 0,05$ ) para la actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp).



**Figura 6. Resultado de la interacción entre los factores extracto y método de análisis mostrada por el MANOVA ( $p < 0,05$ ) para la actividad antioxidante (AAO, mmol TE/ 100 g sp).**

4.3 Correlaciones de Pearson de los compuestos bioactivos y los métodos de análisis de actividad antioxidante.

Para tratar de explicar la relación entre la actividad antioxidante y los compuestos bioactivos analizados a cada extracto, se realizaron análisis estadísticos de correlación de Pearson. El coeficiente de correlación de Pearson es un índice que mide la correlación lineal entre distintas variables. El intervalo de variación de este coeficiente es de -1 a +1. La Tabla 7 muestra las correlaciones de Pearson entre la AAO medida por cada método y la cantidad de cada uno de los compuestos analizada en cada extracto, para las 4 muestras consideradas.

**Tabla 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre las actividades antioxidante (AAO) medidas por cada método y los compuestos analizados en cada extracto.**

	AAO ABTS	AAO FRAP	AAO DPPH
Vitamina C	0,56	0,78*	0,99*
Fenoles	0,97*	0,87*	0,91*
Carotenoides	0,84*	0,78*	-0,74*

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

En todos los casos se observa, como era de esperar, una correlación significativa ( $p < 0,05$ ), excepto para la vitamina C y el método ABTS, y positiva, excepto en el caso del extracto de carotenoides cuando se analiza por el método del DPPH. Los extractos de fenoles totales fueron los que mejor se correlacionaron con cualquiera de los tres métodos de análisis de actividad antioxidante ensayados, tal y como se ha observado por otros autores (Thaipong et al., 2006; Xu et al., 2008; Gil y Rojano, 2009). Por lo tanto, podría ser adecuado estimar indirectamente la actividad antioxidante empleando el contenido en fenoles totales, puesto que presentó una alta correlación con todos los ensayos (Thaipong et al., 2006). Por su parte, la mejor correlación con la vitamina C fue la obtenida por el método DPPH y con los

carotenoides totales la obtenida por el método ABTS. Otros autores explican que las altas correlaciones entre la AAO medida por el método DPPH se producen sobre todo en frutas con un alto contenido en ácido ascórbico, como es el caso del pomelo y otros cítricos (Gardner et al., 2000). Por este motivo, Gil et al. (2002) argumentan la escasa correlación encontrada entre la vitamina C y la actividad antioxidante determinada por los métodos DPPH y FRAP en nectarinas, melocotones y ciruelas. La correlación negativa entre carotenoides totales y la actividad antioxidante medida por el método DPPH, ha sido observada también por otros autores (Thaipong et al., 2006).

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Aunque la adición de solutos junto con el pretratamiento de deshidratación por microondas repercutieron positivamente, favoreciendo la extracción de fenoles y carotenoides totales, se disminuyó el contenido en vitamina C, compuesto termolábil por excelencia. Como consecuencia, la actividad antioxidante no se vio significativamente afectada. Se observó una pérdida de los compuestos bioactivos analizados con la liofilización, que también repercutió en una menor actividad antioxidante de las muestras, incluso en las muestras pretratadas. En cuanto al método de análisis de la actividad antioxidante, si el alimento a analizar es rico en compuestos bioactivos hidrosolubles, como vitamina C y los fenoles, se podría recomendar la extracción de estos compuestos con una mezcla de agua y disolventes orgánicos, como se ha hecho en este trabajo, y la cuantificación de su actividad antioxidante por el método del DPPH. Si el alimento es rico en compuestos liposolubles, como los carotenoides, se recomendaría la extracción con disolventes orgánicos y la cuantificación por el método del ABTS. Por su parte, la mayor actividad antioxidante fue la que se analizó en el extracto de los fenoles totales, obtenido con la disolución de metanol y agua, por lo que éste se podría considerar el mejor disolvente de extracción para la obtención de un extracto de alta capacidad antioxidante.

## 6. BIBLIOGRAFIA

AHMAD-QASEM, M. H.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V.; MULET, A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V., 2013. Influence of freezing and dehydration of olive leaves (var. Serrana) on extract composition and antioxidant potential. *Food Research International*, 50: 189-196.

ARUOMA, O.I., 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 523-24: 9-20.

ALMAJANO, M. P., 2009. Determinación de la actividad antioxidante de las bayas de Goji. *Consorti Escola Industrial de Barcelona. Septiembre–Octubre. Barcelona. España.*

ALZATE, C. E. O., 2008. *Congelación y liofilización de alimentos*. Manizales. 177 pp.

ANDLAUER, W.; FURST, P., 2002. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35: 171-176.

AOAC, 1990. Official methods of analysis. *Association of Official Analytical Chemists*. 15th Edition.

AOAC, 1996. Official methods of analysis. Arlington, Supplement March.

ARNAO, M.B.; CANO, A; ACOSTA, M., 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food chemistry*, 73: 239-244.

ASAMI, D. K.; HONG, Y. J.; BARRETT, D. M.; MITCHELL, A. E., 2003. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5): 1237-1241.

BAHORUN, T.; LUXIMON-RAMMA, A.; CROZIER, A.; ARUOMA, O., 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 84: 1553-1561.

BARBA, A. O.; HURTADO, M. C.; MATA, M. S.; RUIZ, V. F.; DE TEJADA, M. L. S., 2006. Application of a UV–vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chemistry*, 95(2): 328-336.

BENLLOCH. M., 2015. Estudio comparativo de la calidad y seguridad de un puré de kiwi pasteurizado por calentamiento convencional o por microondas. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

BENZIE, F.F.I.; STRAIN, J.J., 1996. The ferric reduction ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239: 70-76.

BENZIE, L.F.F., STRAIN, J.J., 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous

measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299: 15-27.

BLOCK, G.; PATTERSON, B.; SUBAR, A., 1992. Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18: 1-29.

BOEING, J. S.; BARIZÃO, É. O.; COSTA E SILVA, B.; MONTANHER, P. F.; ALMEIDA, V. D. C.; VISENTAINER, J. V., 2014. Evaluation of solvent effect on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacities from the berries: application of principal component analysis. *Chem Centr J*, 8: 48.

BORDERÍAS, A.J.; SÁNCHEZ-ALONSO, I.; PÉREZ-MATEOS., 2005. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Food Science & Technology*, 16: 458-465.

CASANOVA, M.A., 2014. Estudio de viabilidad para la comercialización de fruta en polvo. Trabajo final de grado. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Valencia.

CASTAÑEDA, J.; MIÑANO, H.A.; JARA, R.S.; RODRIGUEZ G., 2010. Estudio comparativo de la pérdida de vitamina C en chalarina (*Casimiroa edulis*) por cuatro métodos de deshidratación. *Scientia Agropecuaria*, 1: 75-80.

CERVERA, P.; CLAPÉS, J.; RIGOLFAS, R., 2004. *Alimentación y dietoterapia*. Editorial Mc Graw Hill-Interamericana. 4a Ed. España. 119 pp.

DELGADILLO VILLARROEL, J.E.; CALANI VIADEZ, L.A., 2014. Nutraceuticos. *Revista de Actualización clínica*, 42: 2190-2194.

COLIN-HENRION, M.; MEHINAGIC, E.; RENARD, C.; RICHOMME, P., 2009. From Apple to applesauce: Processing effects on dietary fibres and cell Wall polysaccharides. *Food Chemistry*, 117: 254-260.

CORTÉS, M.; CHIRALT, A.; PUENTE, L., 2005. Alimentos funcionales: una historia con mucho presente y futuro. *Vitae*, 12(1): 5-14.

CRUZADO, M.; CEDRÓN, C., 2012. Nutraceuticos, alimentos funcionales y su producción. *Revista de Química*. Vol. XXVI. N°1-2.

DERGAL, S. B., 2005. *Química de los Alimentos*. Editorial Pearson. 4ª Ed. México. 736 pp.

DORTA, E.; LOBO, M. G.; GONZÁLEZ, M, 2012. Using drying treatments to stabilize mango peel and seed: Effect on antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 45, 261-268.

DROUZAS, A.E.; SCHUBERT, H., 1996. Microwave application in vacuum drying of fruits. *Journal of Food Engineering*, 28: 203-209.

EGAS, L.A.; GONZÁLEZ, F.; CAMACHO, M.M., 2014. Optimización del proceso de atomización de pomelo. Influencia de la temperatura y de la adición de diferentes solutos de alto peso molecular. *Repositorio digital*.

ELIAS, M.F. , 2014. Industria y fortificación de alimentos: Una historia de suceso. *Revista Food Ingredients Brasil*, 30: 28-30.

FARINHA, P., 2014. Efeito da liofilização e da adição de goma arábica no potencial bioativo de extratos de morango e kiwi. Tesina Final de Master. Instituto Politécnico de Castelo Branco (Portugal).

FENG, H.; TANG, J., 1998. Microwave finish drying of diced apples in spouted bed. *Journal of Food of Science*, 63 (4): 679-683.

FITO, P.; ANDRÉS, A.M.; BARAT, J.M.; ALBORS, A.M., 2001. *Introducción al secado por aire caliente*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia.

GABAS, A.L.; TELIS, V.R.N.; SOBRAL, P.J.A.; TELIS-ROMERO, J., 2007. Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp poder. *Journal of Food Engineering*, 82: 246-252.

GANESAN, P.; CHANDINI, S.; KUMAR, N.B., 2007. Antioxidant properties of methanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. *Bioresource Technology*, 99: 2717-2723.

GARDNER, P.T.; WHITE, T.A.C.; MCPHAIL, D.B.; DUTHIE, G.G., 2000. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, 68: 471-474.

GEORGÉ, S.; TOURNAIRE, F.; GAUTIER, H.; GOUPY, P.; ROCK, E.; CARIS-VEYRAT, C., 2011. Changes in the contents of carotenoids, phenolic compounds and vitamin C during technical processing and lyophilisation of red and yellow tomatoes. *Food Chemistry*, 124: 1603- 1611.

GIL, J. H.; ROJANO, B. A., 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3): 388-395.

GIL, M.I.; TOMAS-BARBERAN, F.A.; HESS-PIERCE, B.; KADER, A.A., 2002. Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 4976-4982.

HAYAT, K.; ZHANG, X.; CHEN, H.; XIA, S.; JIA, C.; ZHONG, F., 2010. Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, 73: 371-376.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L., 2005. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 1841-1856.

IGUAL, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, E.; CAMACHO, M. M.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N., 2011. Changes in flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12: 153-162.

IGUAL, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, E.; CAMACHO, M.M.; NAVARRETE-MARTINEZ, N., 2012. Impact of conventional and non-conventional technologies applied to obtain fruit products in the flavonoid content and antioxidant capacity of grapefruit, en : *Handbook on flavonoids : dietary*

*sources, properties, and health benefits*. Ed. Nova Science Publishers, Inc. 361-387.

IGUAL, M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, E.; CAMACHO, M. M.; MARTÍNEZ-NAVARRETE, N., 2015. Stability of micronutrients and phytochemicals of grapefruit jam as affected by the obtention process. *Food Science and Technology International*, 1082013215585417.

JACKSON, C. J.C.; PAILYATH, G., 2011. Functional Foods and Nutraceuticals. *Functional Foods, Nutraceutical, and Degenerative Disease Prevention*. Ed. Oxford, UK. 403 pp.

KHRAISHEH, M.A.M.; COOPER, T.J.R.; MAGEE, T.R.A., 1997. Microwave and air drying I. Fundamental considerations and assumptions for the simplified thermal calculations of volumetric power absorption. *Journal of Food Engineering*, 33: 207-219.

KLIMCZAK, I.; MALECKA, M.; SZLACHTA, M.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A., 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of oranges juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 313-322.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A.C.; SINGHAL, S.R., 2005. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. *Carbohydrate Polymers*, 62: 309-315.

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

KWOK, B. H. L.; HU, C.; DURANCE, T.; KITTS, D. D., 2004. Dehydration techniques affect phytochemical contents and free radical scavenging activities of Saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). *Journal of Food Science*, 69: S122-S126.

LAW, M.R.; MORRIS, J.K., 1998. By how much does fruit and vegetable consumption reduce the risk of ischaemic heart disease? . *European Journal of Clinical Nutrition*, 52: 549-456.

LÓPEZ, D.O.; MUÑOZ, A.; CARMONA, R.; TORRES, L.; GONZÁLEZ, M.L., 2006. Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión de extracto acuoso de *Calendula officinalis* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 11.

LÓPEZ, O.D., 2010. Microencapsulation of oily substances by aspersión drying. *Revista cubana de farmacia* Vol. 44, 3: 381-389.

MAJEED, K.; JAWAID, M.; HASSAN, A.; ABU BAKAR, A.; ABDUL KHALIL, H.P.S; SALEMA, A.A.; INUWA, I., 2013. Potential materials for food packaging from nanoclay/natural fibres filled hybrid composites. *Materials and Design*, 46: 391-410.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American society for clinical nutrition*, 79: 727 -747.

MACHIRANT, E., 2014. Optimización de la formulación de la pulpa de pomelo para su liofilización. Tesina de Master en Ciencia e Ingeniería de alimentos. Universitat Politècnica de Valencia. UPV, 20 pp.

MARTÍNEZ-LA HUERTA, J.J.; CAMACHO, M.M.; MARTINEZ-NAVARRETE, N., 2013. Polyphenols from fruits and vegetables and their health benefits I. POLYPHENOLS: CHEMISTRY DIETARY SOURCES AND HEALTH BENEFITS. *Nova Biomedical*.

MARTÍNEZ-NAVARRETE, N.; VIDAL, M. D. M. C.; LAHUERTA, J. J. M., 2008. Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad Dietética*, 12(2): 64-68.

MASKAN, M., 2000. Microwave/air and microwave finish drying of banana. *Journal of Food Engineering*, 44: 71-78.

MCNAMEE, B.; O'RIORDAN, D.; O'SULLIVAN, M., 1998. Emulsification and Microencapsulation Properties of Gum Arabic. *J. Agric. Food Chem*, 46: 4551-4555.

Mejía, L. J.; Narváez, C. E.; Restrepo, L. P., 2006. Cambios físicos, químicos y sensoriales durante el almacenamiento congelado de la pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh). *Agron. Colomb*, 24: 87-95.

MONTENEGRO, M. A.; BORSARELLI, C. D.; VALLE, L.; BOIERO, M. L., 2012. *Gum Arabic: more than an edible emulsifier*. INTECH Open Access Publisher.

MURUGESAN, R.; ORSAT, V., 2012. Spray Drying for the production of nutraceutical ingredients. *Food Bioprocess Technol*, 1: 3-14.

NESS, A.R.; POWLES, J.W., 1997. Fruit and Vegetables, and Cardiovascular Disease: A Review. *International Journal of Epidemiology*, 26: 1-13.

NIWA, Y.; KANO, T.; KASAMA, T.; NEGISHI, M., 1987. Activation of antioxidant activity in natural medicinal products by heating, brewing and lipophilization. A new drug delivery system. *Drugs under experimental and clinical research*, 14(5): 361-372.

OMS, F., 2005. Un marco para la promoción de frutas y verduras a nivel nacional. *Ginebra: OMS*.

OZGEN, M.; SERCE, S.; GUNDUZ, K.; YEN, F.; KAFKAS, E.; PAYDAS, S., 2007. Determining total phenolics and antioxidant capacities of selected *Fragaria* genotype. *Asian Journal of Chemistry*, 19: 5573-5581.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11): 3122-3128.

PANDEY, M.; VERMA, R.K.; SHUBHINI, S., 2010. Nutraceuticals: new era of medicine and health. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, Vol.3, 1: 12-14.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F., 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *The Journal of nutrition*, 133(9): 2812-2819.

PELLEGRINI, N.; COLOMBI, B.; SALVATORE, S.; BRENNAN, O. V.; GALAVERNA, G.; DEL RIO, D.; BRIGHENTI, F., 2007. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods:

efficiency of extraction of a sequence of solvents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(1): 103-111.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; DÍAZ-RUBIO, M. E.; SERRANO, J.; GOÑI, I.; SAURA-CALIXTO, F., 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41(3): 274-285.

PINELA, J.; BARROS, L.; DUEÑAS, M.; CARVALHO, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; FERREIRA, I. C., 2012. Antioxidant activity, ascorbic acid, phenolic compounds and sugars of wild and commercial *Tuberaria lignosa* samples: Effects of drying and oral preparation methods. *Food Chemistry*, 135(3), 1028-1035.

PRIOR, R.L., 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 570S-578S.

POVILAITIS, D.; SULNIUTE, V.; VENSKUTONIS, P.R.; KRAUJALIENE, V., 2015. Antioxidant properties of wheat and rye bran extracts obtained by pressurized liquid extraction with different solvents. *Journal of Cereal Science*, 62: 117-123.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Afrig. Food Chem*, 48: 3396-3402.

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: 1389-1402.

QUE, F.; MAO, L.; FANG, X.; WU, T., 2008. Comparison of hot air-drying and freeze-drying on the physicochemical properties and antioxidant activities of pumpkin (*Cucurbita moschata* Duch.) flours. *International journal of food science & technology*, 43(7): 1195-1201.

QUINTERO, S.L.; GONZÁLEZ, L.O., 2006. Uso de fibra de estopa de coco para mejorar las propiedades mecánicas en concreto. *Revista Ingeniería & Desarrollo*, 20.

RAMÍREZ, A.; PACHECO, E., 2009. Propiedades funcionales de harinas altas en fibra dietética obtenidas de piña, guayaba y guanábana. *Interciencia*, 34(4): 293-298.

RE, N.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology*, 26: 1231-1237.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W., 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66: 401-436.

SAN JUAN, N.; BENEDITO, J.; CLEMENTE, G.; MULET, A., 2000. The influence of blanching pretreatments on the quality of dehydrated broccoli stems/Influencia del tipo de escaldado en la calidad de tallos de brócoli deshidratados. *Food science and technology international*, 6(3): 227-234.

- SÁNCHEZ-MATA, M; CÁMARA-HURTADO, M; DÍEZ- MARQUÉS, C; ESPERANZA, M., 2000. Comparison of high performance liquid chromatograph and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Eur Food Res Technol*, 210: 220-225.
- 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: 430-439.
- SELVENDRAN, R.R.; RYDEN, P., 1990. Methods in plant biochemistry. *Academy Express – London*, 2: 549.
- SICHA M. A.; LOCK DE UGAZ, O., 1995. Liofilización. *Revista de Química*. Vol. IX. N°2.
- SINGTHONG J.; NINGSANOND, S.; STEVE, W.C., 2009. Extraction and physicochemical characterization of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chemistry*, 114: 1301-1307.
- SPAGGIARI, M., 2014. Ottimizzazione del proceso di estrazione di composti bioattivi di *Actinidia* spp., *Fragaria ananassa*, *Morus nigra* e *Humulus lupulus*, per la formulazione di prodotti nutraceutici ad alta capacità antiossidante. Trabajo Final de Carrera. Università degli Studi di Parma (Italia).
- SHUI, G.; LEONG, L.P., 2006. Residue from star fruit as valuable source for functional food ingredients and antioxidant nutraceuticals. *Food Chemistry*, 97: 277-284.
- TANG, X.; PIKAL, M.J., 2004. Design of Freeze-Drying processes for pharmaceuticals: practical advice. *Pharmaceutical Research*, 21: 191-200.
- TEMPLE, N.J., 2000. Antioxidants and disease: More questions than answers. *Science Research*, 20 (3): 449-459.
- THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H., 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19: 669-675.
- TOH, J. J.; KHOO, H. E.; AZLAN, A., 2013. Comparison of antioxidant properties of pomelo [*Citrus Grandis* (L) Osbeck] varieties. *International Food Research Journal*, 20(4): 1661-1668.
- VANAMALA, J.; COBB, G.; TURNER, N. D.; LUPTON, J. R.; YOO, K. S.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S., 2005. Bioactive compounds of grapefruit (*Citrus paradisi* Cv. Rio Red) respond differently to postharvest irradiation, storage, and freeze drying. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10): 3980-3985.
- WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R. L., 1996. Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(3): 701-705.
- WILLET, W.C., 1994. Diet and health: What should be eat?. *Science*, 264: 532-537.
- XU, B.J.; CHANG, S.K.C., 2007. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *Journal of Food Science*, 72: 159-166.

XU, G.; LIU, D.; CHEN, J.; YE, X.; MA, Y.; SHI, J., 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106: 545-551.

ZHOU, K.; YU, L., 2004. Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 37: 717-721.