



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE  
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

# EFECTO DE LA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ZUMO DE MANDARINA (VAR. ORTANIQUE)

**MASTER EN CIENCIA E INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS**

Autor:  
Jordi Tárrega Ramón

Directora:  
Noelia Betoret Valls

Directora experimental:  
Ester Betoret Valls

Centro:  
IU-IIAD

1

# **EFECTO DE LA PRESIÓN DE HOMOGENEIZACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ZUMO DE MANDARINA (VAR. ORTANIQUE)**

J. Tárrega, N. Betoret\*, E. Betoret

## **RESUMEN**

Los efectos beneficiosos del consumo de frutos cítricos sobre la salud humana se conocen desde hace mucho tiempo. Hoy sabemos que estos efectos beneficiosos derivan de las propiedades antioxidante y antirradical de los componentes de los frutos cítricos y, en particular, de aquellos que se encuentran en sus zumos (Sánchez-Moreno et al., 2003).

Los zumos de cítricos contienen una gran variedad de componentes que exhiben actividades antioxidante y antirradical, tales como el ácido ascórbico (Johnston y Bowling, 2002), los flavonoides (Sendra et al., 1988), los carotenoides (Goodner et al., 2001), las antocianinas (sólo en zumos de variedades pigmentadas) (Rapisarda et al., 2000), y los derivados del ácido cinámico (Robards y Antolovich, 1995), entre otros.

Por otra parte, la homogeneización es una operación que puede ser utilizada en las industrias de zumos de cítricos para mejorar algunos de los factores de calidad de los zumos.

En este trabajo se estudió el efecto de la presión de homogeneización sobre la actividad antioxidante del zumo de mandarina de la variedad Ortanique. Los resultados obtenidos mostraron que la presión de homogeneización no afecta de forma significativa a la actividad antioxidante del zumo. Si bien con los resultados obtenidos por el método ABTS es posible observar una clara tendencia a aumentar la actividad antioxidante con un aumento de la presión de homogeneización del zumo, en los resultados obtenidos por el método DPPH no es posible observar este efecto.

## **RESUM**

Els efectes beneficiosos del consum de fruits cítrics sobre la salut humana es coneixen des de fa molt de temps. Hui sabem que aquests efectes beneficiosos deriven de les propietats antioxidant i antirradical dels components dels fruits cítrics i, en particular, d'aquells que es troben en els seus suc (Sánchez-Moreno et al., 2003).

Els suc cítrics contenen una gran varietat de components que exhibeixen activitats antioxidant i antirradical, com l'àcid ascòrbic (Johnston y Bowling, 2002), els flavonoides (Sendra et al., 1988), els carotenoides (Goodner et al., 2001), les antocianines (solament en suc de varietats pigmentades) (Rapisarda et al., 2000), i els derivats de l'àcid cinàmic (Robards y Antolovich, 1995), entre d'altres.

Per altra part, l'homogeneïtzació és una operació que pot ser utilitzada en les indústries de suc de cítrics per a millorar alguns dels factors de qualitat dels suc.

En aquest treball s'estudià l'efecte de la pressió d'homogeneïtzació sobre l'activitat antioxidant del suc de mandarina de la varietat Ortanique. Els resultats obtinguts posen de manifest que la pressió d'homogeneïtzació no afecta de forma significativa a l'activitat antioxidant del suc. Amb els resultats obtinguts per el mètode ABTS és possible observar una clara tendència a augmentar l'activitat antioxidant amb un augment de la pressió d'homogeneïtzació del suc mentre que amb el mètode DPPH no es pot observar aquest efecte.

## **ABSTRACT**

Beneficial effects of citrus fruits consumption on human health are known since a lot. Nowadays we know that these effects are resulted of antioxidant and antiradical properties of their compounds and particularly of compounds that are in their juices (Sánchez-Moreno et al., 2003).

Citrus juices have a lot of components with antioxidant and antiradical properties, such as ascorbic acid (Johnston y Bowling, 2002), flavonoids (Sendra et al., 1988), carotenoids (Goodner et al., 2001), antocianins (only in pigmented varieties) (Rapisarda et al., 2000) and cinamic acid derives (Robards y Antolovich, 1995).

Furthermore, homogenization can be used as an operation in citrus industries for improving some quality factors of citrus juices.

In this work, effect of homogenization pressure on antioxidant activity of the mandarin juice (Ortanique variety) was studied. The obtained results showed that homogenization pressure does not affect in a significant way the antioxidant activity of the juices. Results obtained with ABTS method show clearly a tendency to increase the antioxidant activity with the increasing of the homogenization pressure. This effect is not possible to observe in the results obtained by DPPH method.

**PALABRAS CLAVE:** actividad antioxidante, zumos de cítricos, homogeneización, ABTS, DPPH.

## INTRODUCCIÓN

Los efectos beneficiosos del consumo de frutos de cítricos sobre la salud humana se conocen desde hace mucho tiempo. Hoy sabemos que estos efectos beneficiosos derivan de las propiedades antioxidante y antirradical de los componentes de los frutos cítricos y, en particular, de aquellos que se encuentran en sus zumos (Sánchez-Moreno et al., 2003).

Los zumos de cítricos contienen una gran variedad de componentes que exhiben actividades antioxidante y antirradical, tales como el ácido ascórbico (Johnston y Bowling, 2002), los flavonoides (Sendra et al., 1988), los carotenoides (Goodner et al., 2001), las antocianinas (sólo en zumos de variedades pigmentadas) (Rapisarda et al., 2000), y los derivados del ácido cinámico (Robards y Antolovich, 1995), entre otros. El consumo de zumos de cítricos afecta tanto a la concentración de vitamina C en la sangre como a los biomarcadores de su estatus antioxidante (Sánchez-Moreno et al., 2003), por lo que son bioactivos contra una serie de enfermedades, tales como la insuficiencia coronaria (Rouseff y Nagy, 1994) y algunos trastornos relacionados con la edad (Baghurst, 2003), así como preventivos contra el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer (Block et al., 1992; Steinmetz y Potter, 1996; So et al., 1996).

Codoñer-Franch et al., en un estudio realizado en 2008 sobre una población de 48 niños de entre 8 y 12 años, demostraron, tras medir los niveles en plasma de los biomarcadores derivados de la oxidación de lípidos y proteínas y el contenido de vitaminas C y E, que el zumo de mandarina (*Citrus clementina* Hort. ex Tan.) disminuye los niveles de estrés oxidativo en sangre y puede disminuir el riesgo cardiovascular.

Demostradas las propiedades beneficiosas del consumo de zumo de mandarina resulta interesante comprobar si este efecto beneficioso sigue cumpliéndose cuando el zumo se integra en la estructura celular de una fruta, por ejemplo la manzana (var. *Granny Smith*).

La inclusión de zumo dentro de la estructura celular de un alimento es posible mediante la utilización de la técnica de impregnación a vacío y contribuye a aumentar la oferta de alimentos sólidos funcionales existentes en el mercado (Fito et al., 2000). La técnica de impregnación a vacío permite, mediante la utilización de gradientes de presión, la incorporación de componentes en el interior de un alimento estructurado, sin modificar sustancialmente las propiedades organolépticas del mismo. Para facilitar la incorporación de zumo de mandarina en la estructura de la manzana es necesario que este zumo tenga una densidad y viscosidad adecuadas, así como tamaños de partícula pequeños. El procedimiento de obtención de zumos de cítricos pasteurizados térmicamente y refrigerados, desarrollado por el grupo de investigación que encabeza el doctor J.V. Carbonell (IATA-CSIC) y cuya patente es la número 042593, incluye la operación de homogeneización. En este sentido, se realizó anteriormente un estudio sobre la influencia de la presión de homogeneización en la distribución del tamaño de partícula, el color, la turbidez y el contenido en flavonoides del zumo de mandarina de la variedad Ortanique (Tárrega, 2008 y Betoret et al., 2009).

En este trabajo se comprobó que presiones de homogeneización de entre 15 y 30 MPa resultan favorables en una operación posterior de impregnación a vacío porque disminuyen el tamaño de las partículas, permitiendo incorporar mayor cantidad de zumo al producto impregnado y no afectan de forma negativa al color ni al contenido en flavonoides del zumo.

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de la presión de homogeneización sobre la actividad antioxidante del zumo de mandarina de la variedad Ortanique, para su aplicación posterior, mediante la técnica de impregnación a vacío, en el desarrollo de frutas frescas funcionales que puedan ser consumidas como snack, o como ingredientes en productos de desayuno.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Revisión bibliográfica**

Se realizó una revisión bibliográfica sobre la actividad antioxidante de diferentes alimentos para la cual se utilizó la base de datos ScienceDirect introduciendo como palabras clave: antioxidant activity orange juice, antioxidant activity citrus y antioxidant activity citrus juices.

### **Preparación de las muestras**

Para la obtención de los zumos, se recolectaron mandarinas de la variedad Ortanique - un híbrido de tangerina y naranja dulce (*C.sinensis* x *C.reticulata*) - en un campo situado en Turís (Valencia) y se utilizaron inmediatamente en la preparación del zumo. La extracción del zumo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento recogido en la patente 042593 titulada "Procedimiento para la obtención de zumos cítricos pasteurizados y refrigerados" para la obtención de zumos de elevada calidad organoléptica. Siguiendo este procedimiento, los frutos se lavaron por inmersión, se escurrieron y se exprimieron en un extractor industrial de copas ranuradas (Exzel, Luzzysa, El Puig, Valencia, Spain). El zumo resultante se tamizó utilizando un tamiz de 0,7 mm de diámetro. Se homogeneizó utilizando un homogeneizador piloto Manton-Gaulin modelo (15M8TBA) a diferentes presiones (0, 10, 15, 20, 25 y 30 MPa). Se centrifugó en una centrífuga piloto Westfalia que permite recoger una fracción suero del 75 % del volumen inicial con un 1 % de pulpa y el zumo resultante se pasteurizó a 63 °C durante un período de tiempo de 15 s. Se recogió en tarros de vidrio esterilizados y se congeló inmediatamente a -18 °C hasta la realización de los análisis, 14 meses después.

### **Caracterización físico-química del zumo**

Con el fin de caracterizar los zumos se determinó el contenido en sólidos solubles (°Brix), la acidez, el índice de madurez, los aceites esenciales, la

pulpa suspendida, el pH y la densidad. El contenido en sólidos solubles (°Brix) se obtuvo a partir del índice de refracción de las muestras. La determinación del índice de refracción se realizó con un refractómetro (ABBE ATAGO, 3-T) termostataado a 20 °C. La acidez total se determinó por valoración con hidróxido sódico 0,1N y se expresó como porcentaje de ácido cítrico. Los aceites esenciales recuperables se determinaron por valoración con bromato de acuerdo con el método Scout (Scout and Veldhuis, 1966). La determinación del pH se llevó a cabo con un potenciómetro (micropH CRISON, 2001). La densidad se determinó con un picnómetro de líquidos. Todas las medidas se realizaron por triplicado. La densidad se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\rho = \frac{P_{\text{zumo}} - P_o}{P_w - P_o} \quad (1)$$

donde:

$P_{\text{zumo}}$ : peso del picnómetro lleno de zumo (g)

$P_o$ : peso del picnómetro vacío (g)

$P_w$ : peso del picnómetro lleno de agua (g)

$\rho$ : densidad del zumo (g/cm<sup>3</sup>)

### **Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS**

Este ensayo se basó en el método propuesto por Polydera et al. (2005). El ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) sal de diamonio) fue disuelto en agua hasta una concentración de 7 mM. El ABTS<sup>•+</sup> se obtuvo mediante la reacción de la disolución de ABTS preparada anteriormente y una disolución en agua de persulfato potásico hasta una concentración final de 2,45 mM. La mezcla se almacenó en oscuridad durante 12-16 h hasta su utilización. La solución de ABTS<sup>•+</sup> fue diluida con etanol hasta alcanzar una absorbancia de 0,7 (±0,02) a 752 nm.

Para medir la actividad antioxidante de los zumos de mandarina homogeneizados a las diferentes presiones (0, 10, 15, 20, 25 y 30 MPa) se añadieron 15,3 µL de zumo a la solución diluida de ABTS<sup>•+</sup> en una cubeta. Ésta se cerró con parafilm, se agitó y se midió la absorbancia con un espectrofotómetro de la marca Beckman Coulter modelo DU 730 Life Science cada 30 s durante un tiempo total de 30 min. Cada muestra de zumo se analizó por triplicado.

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición, que representa la disminución de ABTS<sup>•+</sup> respecto al valor inicial o control, tras 30 min de reacción, y se calcularon a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{absorbancia control} - \text{absorbancia muestra}}{\text{absorbancia control}} \cdot 100 \quad (2)$$

donde la absorbancia control representa la absorbancia correspondiente a la disolución de ABTS sin zumo; la absorbancia muestra representa la

absorbancia correspondiente a la disolución de ABTS con zumo a los 30 min de reacción.

También se expresó la actividad antioxidante como TEAC (Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) Equivalent Antioxidant Capacity).

### Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

En este ensayo basado en el método descrito por Sendra et al. (2006) se centrifugaron 10 mL de zumo a 13000 rpm durante 5 min a 20 °C en una centrífuga Medifriger BL-S. Se decantó el sobrenadante y se filtró con papel de filtro Whatman nº 1. A continuación, se añadió un volumen de zumo filtrado (entre 6 y 30 µL) a una cubeta que contenía un volumen predeterminado de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en metanol hasta un volumen final de 3 mL. Los diferentes volúmenes de zumo fueron 6, 10, 15, 20, 25 y 30 µL. La cubeta se cerró inmediatamente con parafilm, se agitó y se introdujo en el espectrofotómetro (Beckman Coulter modelo DU 730 Life Science). Se midió la absorbancia a 515 nm cada 2 min durante un tiempo total de 70 min. Todas las medidas se realizaron por duplicado.

Como patrón se utilizó el ácido ascórbico (vitamina C).

Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición, que representa la disminución de DPPH• respecto al valor inicial o control, tras 70 min de reacción, y se calcularon a través de la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{\text{absorbancia control} - \text{absorbancia muestra}}{\text{absorbancia control}} \cdot 100 \quad (3)$$

donde la absorbancia control es la absorbancia correspondiente a la disolución de DPPH sin zumo; la absorbancia muestra representa la absorbancia correspondiente a la disolución de DPPH con zumo a los 70 min de reacción.

También se obtuvieron los parámetros EC<sub>50</sub> (actividad antirradical) y AE (eficiencia antirradical). La actividad antirradical (EC<sub>50</sub>) se define como la cantidad de antirradical (zumo de mandarina de la variedad Ortanique en este caso) necesaria para disminuir la concentración inicial del DPPH• en un 50 %. La eficiencia antirradical (AE) se define con la ecuación:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot T_{EC50}} \quad (4)$$

donde: T<sub>EC50</sub> = tiempo (min) necesario para completar la reacción cuando la concentración inicial del antirradical es la correspondiente a EC<sub>50</sub> (µg DPPH/mL muestra).

Finalmente se expresaron los resultados como milimoles de ácido ascórbico (vitamina C) por litro de zumo.

## Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el paquete estadístico Statgraphics 5.1. Con el fin de determinar el nivel de significación de las diferencias observadas se realizaron análisis simples de la varianza (ANOVA).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Revisión bibliográfica: actividad antioxidante de zumos de frutas y de cítricos

Como resultado de la revisión bibliográfica indicada en el apartado de materiales y métodos, se encontraron más de 3000 artículos científicos entre los años 1997 y 2009, obteniéndose la mayor cantidad de artículos entre los años 2007 y 2009. Estos resultados reflejan la importancia que está adquiriendo actualmente el análisis de la actividad antioxidante en frutas y zumos.

Los alimentos tratados en los artículos comprenden desde extractos y zumos vegetales, gajos y extractos de cítricos, extractos y zumos de frutas hasta subproductos de cítricos o plantas medicinales.

De entre todos los artículos se eligieron únicamente aquellos que hacían referencia a la actividad antioxidante de los zumos de frutas y de cítricos por ser los que tienen mayor relación con este trabajo.

Las tabla 1 y 2 muestran los resultados obtenidos en la revisión bibliográfica para la actividad antioxidante de los zumos de diversas frutas y de cítricos.

**TABLA 1.** Actividad antioxidante de zumos de frutas.

| Producto       | Actividad antioxidante  | Método               | Referencia                |
|----------------|---|----------------------|---------------------------|
| Manzana        | 840 $\mu$ M TEAC <sup>1</sup>   | ABTS                 | Miller y Rice-Evans, 1997 |
| Grosella negra | 5070 $\mu$ M TEAC <sup>1</sup>  | ABTS                 | Miller y Rice-Evans, 1997 |
| Manzana        | 2,79<br>2,848<br>1,196<br>(mmol ácido ascórbico/mL)                                   | DMPD<br>ABTS<br>DPPH | Pernice et al., 2009      |
| Albaricoque    | 5,65<br>1,878<br>0,974<br>(mmol ácido ascórbico/mL)                                   | DMPD<br>ABTS<br>DPPH | Pernice et al., 2009      |
| Acerola        | 2,03 $\pm$ 0,28<br>2,74 $\pm$ 0,36<br>1,26 $\pm$ 0,20<br>mM TEAC (mmol trolox/L zumo) | ABTS<br>DPPH<br>ORAC | Mezadri et al., 2008      |

<sup>1</sup> Actividad antioxidante equivalente a una solución de 1,0 mM de la sustancia bajo investigación

**TABLA 2.** Actividad antioxidante de zumos de cítricos.

| Producto              | Resultados                  | Método | Referencia                           |
|-----------------------|-----------------------------|--------|--------------------------------------|
| Naranja var. Navelina | 39,3 $\pm$ 1,5 % inhibición | DPPH   | Elez-Martínez y Martín-Belloso, 2007 |

|                                      |  |              |                       |
|--------------------------------------|--|--------------|-----------------------|
| Naranja var. Kozan                   | $EC_{50} = 3,3 \pm 0,2$<br>mg/mL<br>$T_{EC_{50}} = 105,0 \pm 2,0$ min<br>$AE = (30,7 \pm 2,0) \cdot 10^{-3}$ | DPPH         | Kelebek et al., 2009  |
| Mandarina<br>var. Wase-Satsuma       | $454,72 \pm 11,06$<br>$26,31 \pm 0,87$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )  | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Mandarina<br>var. Satsuma            | $598,48 \pm 14,79$<br>$33,65 \pm 0,48$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )  | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Mandarina<br>var. Ponkan             | $476,19 \pm 19,31$<br>$29,67 \pm 0,33$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )  | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Mandarina<br>var. Bendizao           | $482,98 \pm 5,70$<br>$25,39 \pm 1,77$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )   | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Mandarina<br>var. Manju              | $361,24 \pm 9,06$<br>$23,69 \pm 0,54$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )   | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Mandarina<br>Híbrido 439             | $875,93 \pm 11,74$<br>$61,62 \pm 0,71$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )  | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Mandarina<br>var. Zhuhong            | $541,14 \pm 6,59$<br>$36,75 \pm 0,88$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )   | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Naranja dulce<br>var. Skaggs bonanza | $765,33 \pm 7,47$<br>$50,92 \pm 2,12$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )   | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Naranja dulce<br>var. Hamlin         | $899,31 \pm 12,61$<br>$60,24 \pm 0,19$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )  | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Naranja dulce<br>var. Liubencheng    | $886,26 \pm 1,72$<br>$60,13 \pm 0,51$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )   | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Naranja dulce<br>var. Yinzaocheng    | $712,61 \pm 10,63$<br>$47,82 \pm 0,79$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )  | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Limón                                | $307,43 \pm 14,37$<br>$24,50 \pm 0,66$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )  | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Toronja<br>var. Huyou                | $617,50 \pm 11,82$<br>$39,83 \pm 2,20$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )  | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Pomelo<br>var. Miyou                 | $510,16 \pm 3,99$<br>$37,71 \pm 1,07$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )   | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Pomelo<br>var. Sijiyou               | $442,22 \pm 3,31$<br>$35,79 \pm 0,95$<br>(mg/L AEAC <sup>1</sup> )   | FRAP<br>DPPH | Guihua et al., 2008   |
| Naranja<br>var. Shamouti             | 4,69 mM TEAC   | DPPH         | Del Caro et al., 2004 |
| Naranja<br>var. Salustiana           | 4,12 mM TEAC   | DPPH         | Del Caro et al., 2004 |
| Toronja<br>Var. Red blush            | 3,47 mM TEAC   | DPPH         | Del Caro et al., 2004 |
| Naranja sanguina var.<br>Moro        | $EC_{50} = 0,18$ mg/mL<br>$AE = 50,5 \cdot 10^{-3}$  | DPPH         | Kelebek et al., 2008  |
| Naranja sanguina var.<br>Sanguinello | $EC_{50} = 0,29$ mg/mL<br>$AE = 28,1 \cdot 10^{-3}$  | DPPH         | Kelebek et al., 2008  |

|   |  |               |                                |
|---|--|---------------|--------------------------------|
| Naranja<br>marca comercial 1                              | 49,2 % inhibición<br>7,5 mM FeSO <sub>4</sub>            | DPPH<br>FRAP  | Klimczak et al., 2007          |
| Naranja<br>marca comercial 2                              | 47,5 % inhibición<br>7,1 mM FeSO <sub>4</sub>            | DPPH<br>FRAP  | Klimczak et al., 2007          |
| Naranja sanguina<br>var. T. Messina                       | EC <sub>50</sub> = 38,14 µL<br>57,00 % <sup>2</sup>      | DPPH<br>InLAP | Rapisarda et al., 2008         |
| Naranja sanguina<br>var. T. Meli                          | EC <sub>50</sub> = 38,34 µL<br>56,70 % <sup>2</sup>      | DPPH<br>InLAP | Rapisarda et al., 2008         |
| Naranja sanguina<br>var. Moro                             | EC <sub>50</sub> = 26,66 µL<br>59,45 % <sup>2</sup>      | DPPH<br>InLAP | Rapisarda et al., 2008         |
| Naranja<br>var. Ovale                                     | EC <sub>50</sub> = 33,72 µL<br>55,27 % <sup>2</sup>      | DPPH<br>InLAP | Rapisarda et al., 2008         |
| Naranja<br>var. Valencia late                             | EC <sub>50</sub> = 36,30 µL<br>58,08 % <sup>2</sup>      | DPPH<br>InLAP | Rapisarda et al., 2008         |
| Mandarina<br>( <i>Citrus clementina</i><br>Hort. ex Tan.) | 2,26 ± 0,50 mM<br>TEAC/100mL<br>119 ± 37 µM<br>Fe/100 mL | ABTS<br>FRAP  | Codoñer-Franch<br>et al., 2008 |
| Naranja   | 2610 µM TEAC <sup>3</sup>                                | ABTS          | Miller y Rice-Evans, 1997      |
| Mandarina Satsuma<br>(var. Clausellina)                   | 1,901<br>mmol ácido ascórbico/L                          | DPPH          | Sentandreu, 2006               |
| Mandarina Clementina<br>(var. Hernandina)                 | 4,03<br>mmol ácido ascórbico/L                           | DPPH          | Sentandreu, 2006               |
| Naranja dulce<br>(var. Valencia Late)                     | 3,29<br>mmol ácido ascórbico/L                           | DPPH          | Sentandreu, 2006               |

<sup>1</sup> alquil polioxietileno cuaternario de cloruro de amonio

<sup>2</sup> % inhibición formación hidropéroxido de ácido linoleico

<sup>3</sup> Actividad antioxidante equivalente a una solución de 1,0 mM de la sustancia bajo investigación

Los trabajos analizados ponen de manifiesto que el método más utilizado en cítricos es el DPPH. En algunos casos también se emplean los métodos FRAP y ABTS.

La forma de expresar los resultados encontrados en la bibliografía es muy variada. Para el método DPPH existen artículos que expresan la actividad antioxidante en mmol ácido ascórbico/mL, mmol ácido ascórbico/L, mM TEAC (mmol trolox/L zumo), % de inhibición, EC<sub>50</sub> y AE o mg/L AEAC (alquil polioxietileno cuaternario de cloruro de amonio). Para el método ABTS los resultados se expresaron como µM TEAC (actividad antioxidante equivalente a una solución de 1,0 mM de la sustancia bajo investigación), mM TEAC/100mL de producto o mmol ácido ascórbico/mL.

Teniendo en cuenta la revisión bibliográfica se decidió medir la actividad antioxidante del zumo de mandarina de la variedad Ortanique con los métodos ABTS y DPPH.

A partir de los resultados obtenidos por Guihua et al. en 2008, se puede observar que los valores de actividad antioxidante son mayores en el caso de las naranjas que en el caso de las mandarinas (excepto el Híbrido 439 de mandarina). Las variedades con mayor actividad antioxidante son: para las naranjas, la variedad Hamlin (60,24 ± 0,19 mg/L AEAC) y para las mandarinas, la variedad Satsuma (33,65 ± 0,48 mg/L AEAC), exceptuando el Híbrido 439 (61,62 ± 0,71 mg/L AEAC).

## Caracterización físico-química del zumo

Para la caracterización de los zumos se determinó el contenido en sólidos solubles ( $^{\circ}$ Brix), la acidez, el índice de madurez, los aceites esenciales, la pulpa suspendida, el pH y la densidad. Los resultados se muestran en la tabla 3.

**TABLA 3.** Características del zumo fresco de mandarina analizado.

|   |                     |
|---|---------------------|
| <b><math>^{\circ}</math>Brix</b>                            | 12,67 $\pm$ 0,06    |
| <b>Acidez (%)</b>   | 1,410 $\pm$ 0,017   |
| <b>Índice de madurez (<math>^{\circ}</math>Brix/Acidez)</b> | 8,98 $\pm$ 0,15     |
| <b>Aceites esenciales (%)</b>                               | 0,0503 $\pm$ 0,0006 |
| <b>Pulpa suspendida (%)</b>                                 | 19,7 $\pm$ 0,6      |
| <b>pH</b>   | 3,23 $\pm$ 0,03     |
| <b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>                          | 1,0519 $\pm$ 0,0016 |

## Determinación de la actividad antioxidante por el método ABTS

El método ABTS para la determinación de la actividad antioxidante se basa en la reducción del radical libre estable ABTS<sup>•+</sup>, generado mediante la oxidación del ABTS por el persulfato potásico, por el antirradical procedente de la muestra problema, el cual le transfiere un átomo de hidrógeno. Este radical absorbe intensamente a 752 nm. La variable que se mide durante el transcurso de la reacción es la evolución en el tiempo de la absorbancia, a partir de la cual se calcula el porcentaje de inhibición.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del zumo homogeneizado a las distintas presiones. Estos valores de actividad antioxidante hacen referencia a la absorbancia medida tras 30 min de reacción. Los resultados de la tabla incluyen la absorbancia, la inhibición (%) y el TEAC.

A partir de la absorbancia (medida a los 30 min) se calculó el porcentaje de inhibición (disminución de ABTS<sup>•+</sup> respecto al valor inicial o control).

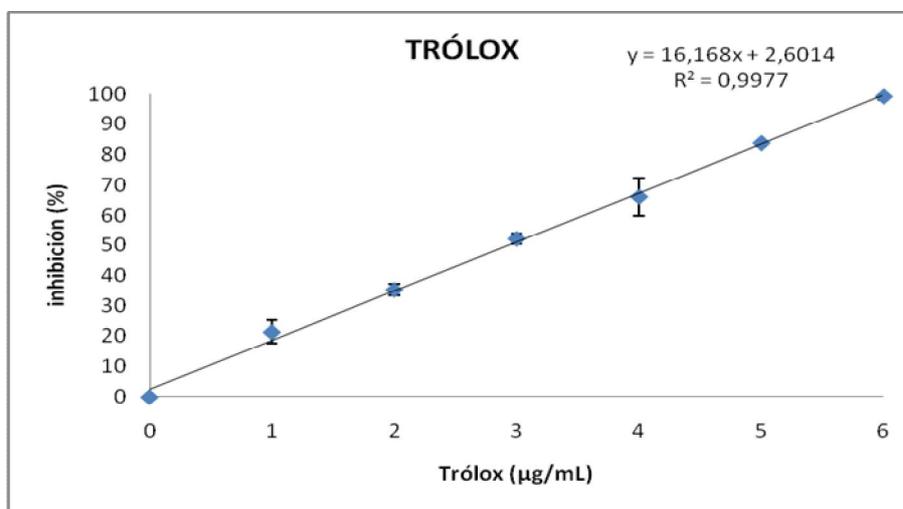
También se expresó la actividad antioxidante como TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), tanto como mM trólox/mL muestra como  $\mu$ mol trólox/L (equivalente a una solución de 5ppm de la sustancia bajo investigación).

**TABLA 4.** Valores de actividad antioxidante a los 30 min en función de la presión de homogeneización.

|  | <b>0 MPa</b>    | <b>10 MPa</b>   | <b>15 MPa</b>   | <b>20 MPa</b>   | <b>25 MPa</b>   | <b>30 MPa</b>   |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Absorbancia</b>                       | 0,22 $\pm$ 0,02 | 0,17 $\pm$ 0,05 | 0,13 $\pm$ 0,07 | 0,12 $\pm$ 0,03 | 0,13 $\pm$ 0,06 | 0,12 $\pm$ 0,04 |
| <b>Inhibición (%)</b>                    | 65,6 $\pm$ 2,5  | 74,0 $\pm$ 9,3  | 79,4 $\pm$ 10,3 | 81,7 $\pm$ 5,2  | 80,3 $\pm$ 7,8  | 80,6 $\pm$ 5,8  |
| <b>mmol trólox/L /mL muestra</b>         | 1,02 $\pm$ 0,04 | 1,2 $\pm$ 0,2   | 1,2 $\pm$ 0,2   | 1,28 $\pm$ 0,08 | 1,28 $\pm$ 0,08 | 1,26 $\pm$ 0,09 |
| <b><math>\mu</math>mol trólox/ L (*)</b> | 15,6 $\pm$ 0,6  | 17,7 $\pm$ 2,3  | 19,0 $\pm$ 2,6  | 19,6 $\pm$ 1,3  | 19,2 $\pm$ 1,9  | 19,3 $\pm$ 1,4  |

(\*) Actividad antioxidante equivalente a una solución de 5ppm de la sustancia bajo investigación

Para expresar los resultados como TEAC fue necesaria la obtención de una curva patrón de Trólox que cubriera todo el rango de inhibición (de 0 a 100 %) (figura 1).



**FIGURA 1.** Curva patrón de Trólox (inhibición (%) vs. Trólox (µg/mL)).

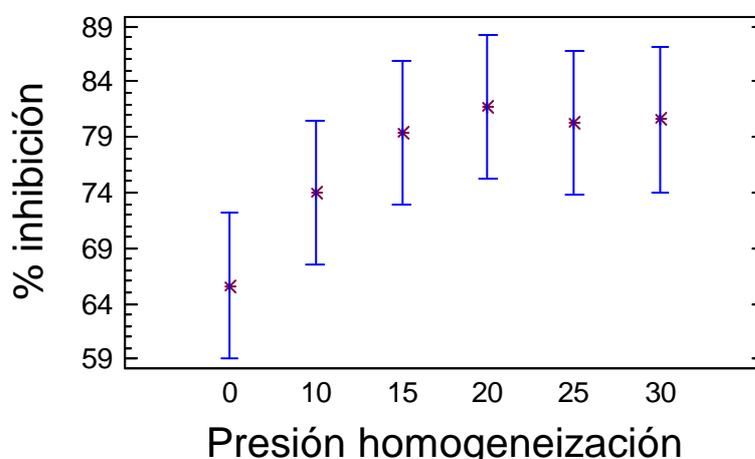
Con el fin de determinar el nivel de significación de las diferencias observadas en el porcentaje de inhibición en función de la presión de homogeneización, se realizó un análisis simple de la varianza. El análisis estadístico puso de manifiesto con un nivel de confianza del 95 %, que la presión de homogeneización no afecta de forma significativa al porcentaje de inhibición (tabla 4).

Aunque el análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas, sí que puede observarse una clara tendencia a aumentar el % de inhibición (y en consecuencia la capacidad antioxidante) al aumentar la presión de homogeneización, sobretudo hasta 15 MPa (figura 2). Estudios anteriores demostraron que al aumentar la presión de homogeneización disminuye el tamaño de las partículas del zumo y aumenta la pulpa suspendida y turbidez, y que estas diferencias son mayores hasta la presión de 15 MPa. Este hecho se traduce en una mayor estabilidad de la nube del zumo evitando que los componentes que contribuyen a la actividad antioxidante del zumo sedimenten en menor medida (Tárrega 2008).

**TABLA 5.** Tabla ANOVA para % inhibición según Presión homogeneización

| Fuente               | Sumas de cuadrados | Gl        | Cuadrado Medio | Cociente-F | P-Valor |
|----------------------|--------------------|-----------|----------------|------------|---------|
| Entre grupos         | 570,771            | 5         | 114,154        | 2,13       | 0,1319  |
| Intra grupos         | 644,105            | 12        | 53,6754        |            |         |
| <b>Total (Corr.)</b> | <b>1214,88</b>     | <b>17</b> |                |            |         |

## Medias y 95,0 Porcentajes Intervalos LSD



**FIGURA 2.** Medias e intervalos LSD para el efecto de la presión de homogeneización sobre el porcentaje de inhibición.

Los resultados obtenidos en este análisis son del orden de 50 veces mayores que los obtenidos por Codoñer-Franch et al. en 2008 (alrededor de 1 mM trolox/mL frente a  $0,0226 \pm 0,005$  mM trolox/mL)

### Determinación de la actividad antioxidante por el método DPPH

El método DPPH para la determinación de la actividad antioxidante se basa en la reducción del radical libre estable DPPH• (el cual absorbe intensamente a 515 nm) a la correspondiente hidrazina, que es prácticamente transparente a esta longitud de onda, por el antirradical presente en la muestra problema, el cual le transfiere un átomo de hidrógeno. La variable que se mide durante el transcurso de la reacción es la evolución en el tiempo de la absorbancia (a partir de la cual se calcula la concentración del radical DPPH• que queda sin reaccionar y el porcentaje de inhibición).

Referencias publicadas (Kelebek et al., 2009; Kelebek et al., 2008) sobre la aplicación del método DPPH en zumos cítricos, utilizan los parámetros  $EC_{50}$ ,  $T_{EC50}$  y AE como indicadores de la capacidad antioxidante. Tal y como se ha indicado en el apartado de materiales y métodos,  $EC_{50}$  es la cantidad de antirradical necesaria para disminuir la concentración inicial del DPPH• en un 50%,  $T_{EC50}$  es el tiempo necesario para completar esta reacción y AE es el parámetro que mide la eficiencia antirradical y se obtiene con la ecuación siguiente:

$$AE = \frac{1}{EC_{50} \cdot T_{EC50}} \quad (5)$$

La consideración del  $T_{EC50}$  confiere al método una valoración adicional relacionada con la cinética del proceso de oxido-reducción, directamente relacionada con la naturaleza de las sustancias con capacidad antioxidante presentes en el zumo.

Para el cálculo de estos tres parámetros es necesario combinar el DPPH y el zumo en cantidades suficientes para alcanzar al menos un 50 % de inhibición.

En este sentido se trabajó con las combinaciones siguientes de zumo-DPPH (tabla 5):

**TABLA 6.** Combinaciones zumo-DPPH ( $\mu\text{L}$ ).

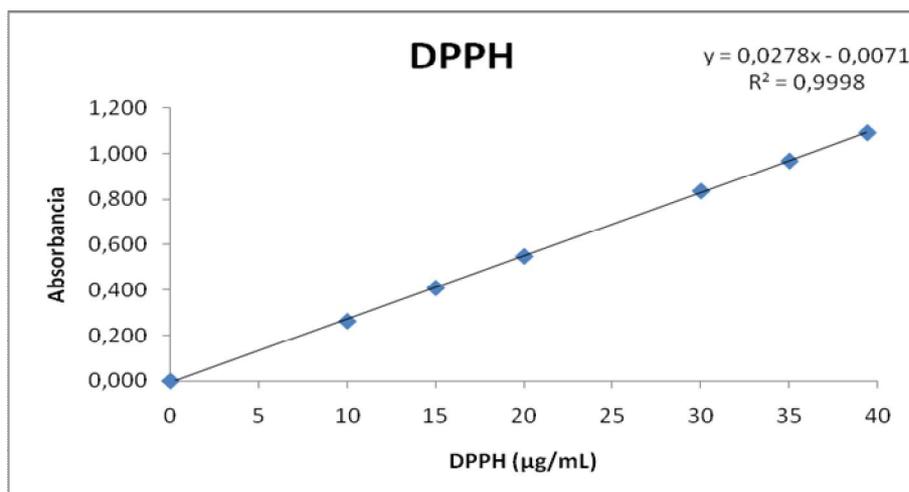
| $V_{\text{zum}} (\mu\text{L})$ | $V_{\text{DPPH}} (\mu\text{L})$ |
|--------------------------------|---------------------------------|
| 6                              | 2994                            |
| 10                             | 2990                            |
| 15                             | 2985                            |
| 20                             | 2980                            |
| 25                             | 2975                            |
| 30                             | 2970                            |

En la tabla 6 se muestran los resultados del porcentaje de inhibición para las diferentes muestras y las distintas combinaciones zumo-DPPH. Se han resaltado las celdas de la tabla en las que se ha alcanzado al menos un 50 % de inhibición.

**TABLA 7.** Valores del % de inhibición para las diferentes muestras y las distintas combinaciones zumo-DPPH.

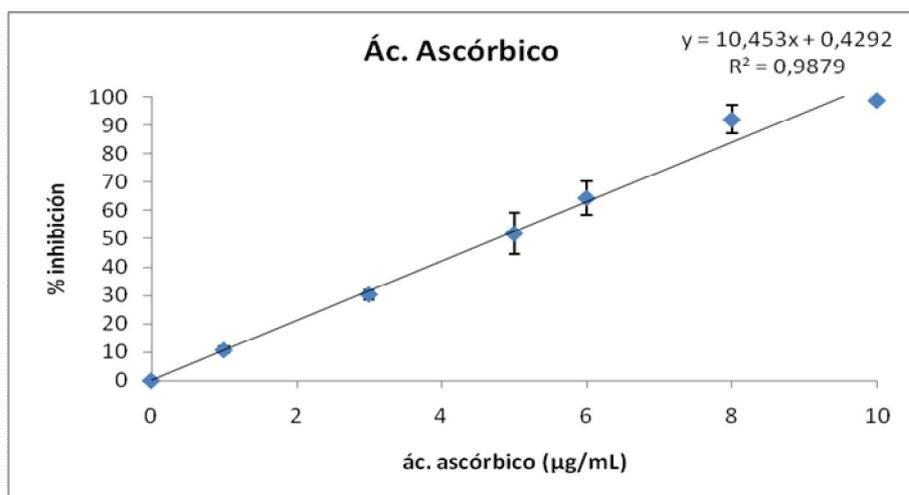
| % INHIBICIÓN  | Cantidad de zumo |                  |                  |                    |                   |                  |
|---------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|------------------|
|               | 6 $\mu\text{L}$  | 10 $\mu\text{L}$ | 15 $\mu\text{L}$ | 20 $\mu\text{L}$   | 25 $\mu\text{L}$  | 30 $\mu\text{L}$ |
| <b>0 MPa</b>  | 15,1 $\pm$ 5,6   | 24,9 $\pm$ 3,9   | 32,7 $\pm$ 10,6  | 33,5 $\pm$ 1,9     | 39,4 $\pm$ 0,2    | 50,8 $\pm$ 7,2   |
| <b>10 MPa</b> | 21,8 $\pm$ 15,3  | 28,5 $\pm$ 13,5  | 34,7 $\pm$ 10,9  | 43,0 $\pm$ 10,8    | 47,03 $\pm$ 7,07  | 50,8 $\pm$ 3,5   |
| <b>15 MPa</b> | 16,0 $\pm$ 0,6   | 23,0 $\pm$ 1,7   | 33,7 $\pm$ 2,7   | 38,786 $\pm$ 1,112 | 46,2 $\pm$ 2,6    | 55,76 $\pm$ 0,09 |
| <b>20 MPa</b> | 12,5 $\pm$ 4,5   | 19,9 $\pm$ 6,4   | 27,4 $\pm$ 6,7   | 36,5 $\pm$ 9,7     | 44,00 $\pm$ 13,12 | 50,0 $\pm$ 14,8  |
| <b>25 MPa</b> | 13,9 $\pm$ 3,0   | 25,4 $\pm$ 2,5   | 35,7 $\pm$ 15,7  | 50,63 $\pm$ 16,08  | 61,1 $\pm$ 19,3   | 68,9 $\pm$ 19,9  |
| <b>30 MPa</b> | 10,6 $\pm$ 4,7   | 20,36 $\pm$ 0,04 | 28,91 $\pm$ 0,02 | 35,7 $\pm$ 3,6     | 44,9 $\pm$ 3,7    | 53,7 $\pm$ 3,7   |

Para poder expresar los resultados como  $EC_{50}$ , fue necesaria la realización de una recta que relacionara la absorbancia con la cantidad de DPPH (figura 3). De esta manera, sabiendo cuál es la absorbancia a la que se consigue la reducción del 50 % de DPPH, se puede calcular  $EC_{50}$  (mg DPPH/mL muestra).



**FIGURA 3.** Relación entre la absorbancia y el DPPH (µg/mL).

Finalmente, se expresó la actividad antioxidante como mmol de ácido ascórbico por L de muestra. Para ello, fue necesaria la obtención de una curva patrón de ácido ascórbico que cubriera todo el rango de inhibición (de 0 a 100 %) (figura 4).



**FIGURA 4.** Curva patrón de ácido ascórbico (inhibición (%) vs. ácido ascórbico (µg/mL)).

En la tabla 7 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del zumo homogeneizado a las distintas presiones. La absorbancia, el % de inhibición y los mmol ácido ascórbico/mL muestra, se obtuvieron para una relación zumo-DPPH de 30-2970 µL y para un tiempo de reacción en el espectrofotómetro de 70 min.

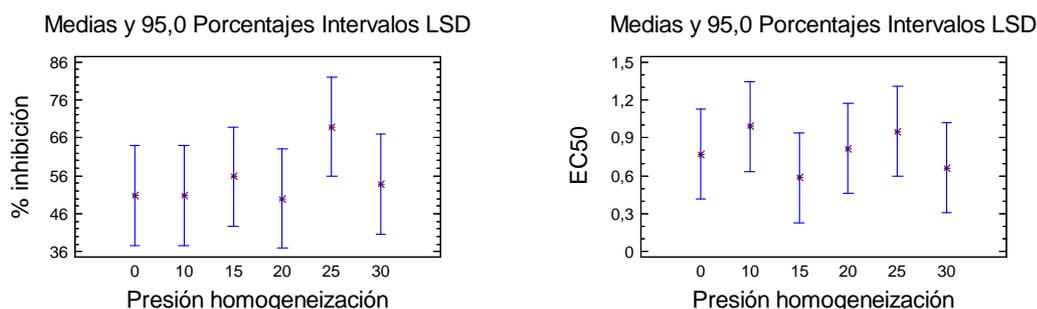
**TABLA 8.** Valores de actividad antioxidante a los 70 min en función de la presión de homogeneización.

|  | 0 MPa        | 10 MPa      | 15 MPa       | 20 MPa      | 25 MPa      | 30 MPa      |
|--|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Absorbancia</b>                                   | 0,6 ± 0,2    | 0,63 ± 0,15 | 0,43 ± 0,02  | 0,7 ± 0,4   | 0,3 ± 0,2   | 0,51 ± 0,08 |
| <b>Inhibición (%)</b>                                | 50,8 ± 7,2   | 50,8 ± 3,5  | 55,76 ± 0,09 | 50,0 ± 14,8 | 68,9 ± 19,9 | 53,7 ± 3,7  |
| <b>EC<sub>50</sub><br/>(µg DPPH/<br/>mL muestra)</b> | 0,8 ± 0,2    | 1,0 ± 0,5   | 0,59 ± 0,03  | 0,82 ± 0,03 | 0,9 ± 0,5   | 0,66 ± 0,05 |
| <b>T<sub>EC50</sub> (min)</b>                        | 70 ± 0       | 61,0 ± 12,7 | 70 ± 0       | 70 ± 0      | 16 ± 0      | 70 ± 0      |
| <b>AE (-10<sup>-3</sup>)</b>                         | 19,23 ± 5,08 | 18,4 ± 5,7  | 24,44 ± 1,13 | 17,5 ± 0,6  | 74,7 ± 36,3 | 21,7 ± 17   |
| <b>mmol ác.asc./<br/>L muestra</b>                   | 0,9 ± 0,1    | 0,91 ± 0,06 | 1,00 ± 0,02  | 0,9 ± 0,3   | 1,2 ± 0,4   | 0,9 ± 0,3   |

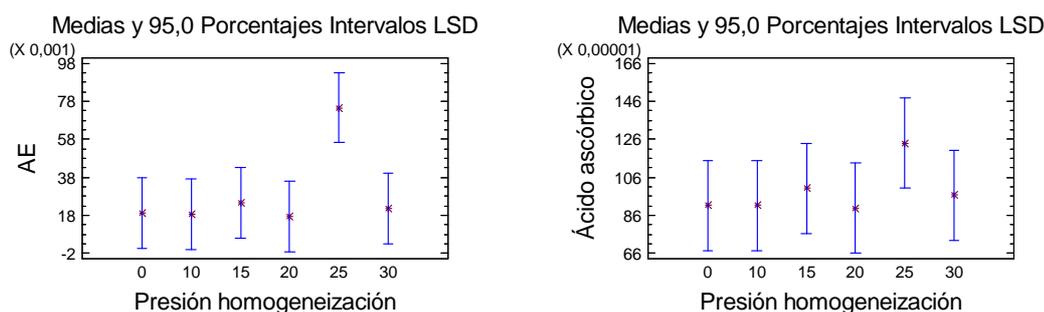
Con el fin de determinar el nivel de significación de las diferencias observadas en el porcentaje de inhibición, la actividad antirradical (EC<sub>50</sub>), la eficiencia antirradical (AE) y los milimoles de ácido ascórbico por litro de muestra, en función de la presión de homogeneización, se realizó un análisis simple de la varianza. Los análisis estadísticos pusieron de manifiesto con un nivel de confianza del 95 %, que la presión de homogeneización no afecta de forma significativa a ninguno de los parámetros estudiados (figuras 5 y 6).

Además, mediante este método no es posible observar la tendencia a aumentar la actividad antioxidante con el aumento de la presión de homogeneización, que se observa en el método ABTS. Este hecho puede ser debido a la diferencia en la preparación de las muestras de zumo por ambos métodos.

Por otra parte, los resultados obtenidos en este análisis para la actividad antioxidante expresada como mmol ác.asc./L muestra son del mismo orden que los encontrados en la bibliografía (Sentandreu, 2006) al igual como los resultados de la eficiencia antirradical (Kelebek et al., 2008).



**FIGURA 5.** Medias e intervalos LSD para el efecto de la presión de homogeneización sobre el porcentaje de inhibición y la actividad antirradical.



**FIGURA 6.** Medias e intervalos LSD para el efecto de la presión de homogeneización sobre la eficiencia antirradical y los milimoles de ácido ascórbico por litro de muestra.

## CONCLUSIONES

Ninguno de los dos métodos de valoración de capacidad antioxidante pone de manifiesto un efecto significativo de la presión de homogeneización sobre la capacidad antioxidante del zumo, si bien en los resultados del método ABTS es posible observar una clara tendencia a aumentar la capacidad antioxidante cuando la presión de homogeneización es mayor. Este resultado obliga a recomendar la aplicación de un tercer método de valoración de capacidad antioxidante que permita establecer cualquier posible relación entre la presión de homogeneización y la capacidad antioxidante.

## AGRADECIMIENTOS

Finalmente me gustaría agradecer a Noelia y a Ester su ayuda en este trabajo. También quisiera dar las gracias a Regina y a Rocío, por los buenos momentos que hemos pasado durante este año de máster. Y, por supuesto, a mi familia.

## REFERENCIAS

- Baghurst K. 2003. Report: The health benefits of citrus juices. CSIRO Health Sciences and Nutrition.
- Betoret E., Betoret N., Carbonell J.V., Fito P. 2009. Effects of pressure homogenization on particle size and the functional properties of citrus juices. *Journal of Food Engineering*, 92, 18-23.
- Block G., Patterson B., Subar A. 1992. Fruits, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and cancer-An International Journal*, 18, 1-29.
- Codoñer-Franch P., López-Jaén A. B., Muñoz P., Sentrandreu E., Valls Bellés V. 2008. Mandarin Juice Improves the Antioxidant Status of Hypercholesterolemic Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 47, 349-355.

- Del Caro A., Piga A., Vacca V., Agabbio M. 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84, 99-105.
- Elez-Martínez P., Martín-Belloso O. 2007. Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, 102, 201-209.
- Fito P., Chiralt A. 2000. Vacuum Impregnation of Plant Tissues. En: *Design of Minimal processing technologies for Fruits and Vegetables*. Ed. Alzamora S.M, Tapia M.S & López-Malo A. Aspen Publisher, Inc. Maryland, 189-204.
- Goodner K. L., Rouseff R. L., Hofsommer H. J. 2001. Orange, mandarin, and hybrid classification using multivariate statistics based on carotenoid profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1145-1150.
- Guihua X., Donghong L., Jianchu C., Xingqian Y., Yaqin M., John S. 2008. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106, 545-551.
- Johnston C. S., Bowling D. L. 2002. Stability of ascorbic acid in commercially available orange juices. *Journal of the American Dietetic Association*, 102, 525-529.
- Kelebek H., Canbas A., Selli S. 2008. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 107, 1710-1716.
- Kelebek H., Selli S., Canbas A., Cabaroglu T. 2009. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91, 187-192.
- Klimczak I., Malecka M., Szlachta M., Gliszczynska-Swiglo A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313-322.
- Mezadri T., Villaño D., Fernández-Pachón M.S., García-Parrilla M.C., Troncoso A.M. 2008. Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 282-290.
- Miller N.J., Rice-Evans C.A. 1997. The relative contributions of ascorbic acid and phenolic antioxidants to the total antioxidant activity of orange and apple fruit juices and blackcurrant drink. *Food Chemistry*, Vol. 60, No. 3, pp. 331-337.
- Pernice R., Borriello G., Ferracane R., Borrelli R.C., Cennamo F., Ritieni A. 2009. Bergamot: A source of natural antioxidants for functionalized fruit juices. *Food Chemistry*, 112, 545-550.
- 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 F., Fanella F., Maccarone E. 2000. Reliability of analytical methods for determining anthocyanins in blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2249-2252.
- 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.
- Robards K., Antolovich M. 1995. Methods for assessing the authenticity of orange juice. *Analyst*, 120, 1-28.
- Rouseff R. L., Nagy S. 1994. Health and nutritional benefits of citrus fruits components. *Food Technology*, 48, 125-132.
- Sanchez-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.
- Sendra J. M., Navarro J. L., Izquierdo L. 1988. C18 solid-phase isolation and highperformance liquid chromatography-ltraviolet diode array determination of fully methoxylated flavones in citrus juices. *Journal of Chromatographic Science*, 26, 443-448.

- Sendra J.M., Sentandreu E., Navarro J.L. 2006. Reduction kinetics of the free stable radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) for determination of the antiradical activity of citrus juices. *European Food Research and Technology*, 223, 615–624.
- Sentandreu E. 2006. Determinación de la actividad antirradical de zumos cítricos y caracterización de zumos de mandarina en función de su contenido en flavonoides y de su actividad antirradical. Tesis Doctoral. Consejo Superior de Investigaciones Científicas Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.
- Scout W.C., Veldhuis M.K. 1966. Rapid estimation of recoverable oil in citrus juices by bromate titration. *J. AOAC*. 49:628-633.
- So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK. 1996. Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer*; 262,167- 81.
- Steinmetz K. A., Potter J. D. 1996. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, 53, 536-543.
- Tárrega J. 2008. Determinación de algunos aspectos nutricionales, sensoriales y tecnológicos del zumo de mandarina (var. Ortanique) relevantes para su uso en la obtención de un producto funcional. Trabajo final de carrera. Universidad Politécnica de Valencia, España.