

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD  
PÚBLICA, BROMATOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA  
LEGAL

DETERMINACIÓN DE VITAMINA C Y CAROTENOIDES  
EN ZUMOS DE FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCOS,  
TRATADOS POR CALOR O POR PULSOS ELÉCTRICOS DE  
ALTA INTENSIDAD (PEAI)

FRANCISCO TORREGROSA VERDÚ

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 14 de Desembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D<sup>a</sup>. Elvira Costell Ibáñez
- D<sup>a</sup>. María Pilar Aparicio Cuesta
- D. Gonzalo Clemente Martín
- D. Pablo Salvador Fernández Escamez
- D. José Miguel Soriano del Castillo

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Ana María Frígola Cánoves

D<sup>a</sup>. María José Esteve Más

©Copyright: Servei de Publicacions  
Francisco Torregrosa Verdú

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6487-2

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
***FACULTAT DE FARMÀCIA***

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,  
Bromatologia, Toxicologia i Medicina Legal  
Àrea de Nutrició i Bromatologia

**“Determinación de Vitamina C y Carotenoides en  
Zumos de Frutas y Hortalizas Frescos, Tratados por Calor o  
por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI)”.**

**TESIS DOCTORAL**

Presentada por:  
Francisco Torregrosa Verdú

Dirigida por:  
Dra. D<sup>a</sup> Ana M<sup>a</sup> Frígola Cánoves  
Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> José Esteve Más

Valencia, Julio 2005





VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

FACULTAT (C\*) DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT PÚBLICA,

BROMATOLOGIA, TOXICOLOGIA I MEDICINA LEGAL

ÀREA DE NUTRICIÓ I BROMATOLOGIA

Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot, València, Spain

Ana M<sup>a</sup> Frígola Cánoves y M<sup>a</sup> José Esteve Más, profesor titular y profesor ayudante doctor, respectivamente, del Área de Nutrición y Bromatología, del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València,

CERTIFICAN QUE: el licenciado en Farmacia D. Francisco Torregrosa Verdú ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del área, el trabajo que lleva por título: *“Determinación de Vitamina C y Carotenoides en Zumos de Frutas y Hortalizas Frescos, Tratados por Calor o por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI)”*, y autorizan su presentación para optar al Título de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Burjassot, a 7 de julio de 2005.

Fdo.: Ana Frígola Cánoves

Fdo.: M<sup>a</sup> José Esteve Más



Este trabajo ha sido financiado por:

- Proyecto de investigación y desarrollo tecnológico-FEDER (1FD97-0575-C03-02) “Estudio de las condiciones óptimas de tratamiento con pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) para la conservación de derivados de frutas y hortalizas”.
- Proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (PTR 1995-0592-OP-03-03) “Aplicación de los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) para la conservación del zumo fresco de naranja”.



### ***Mi profundo agradecimiento a:***

- Mis fantásticas directoras: Dra. Ana Frígola Cánoves y Dra. M<sup>a</sup> José Esteve Más, por todo el apoyo, paciencia y comprensión que me han prestado y sin cuya ayuda esta Tesis no hubiese visto la luz. MUCHAS GRACIAS.
- A todo el magnífico profesorado del Área de Nutrición y Bromatología, cuya profesionalidad y simpatía se contagian al resto de los presentes.
- Y como no a todos mis compañeros (pasados y presentes) que han pasado por el Departamento (mi segundo hogar) y que han sido y son gente maravillosa, de la que da prestigio a cualquier institución y con la que honra trabajar.
- También a los compañeros de Toxi y al personal técnico y administrativo, por sus ganas de ayudar, por su interés y por todo.
- No podía olvidar a toda la gente del IATA, a quienes esporádicamente he visitado y que siempre se han alegrado de verme.
- A todos mis amigos, que no sé como han aguantado mis largas etapas de estrés y “autismo”. Menos mal que me sacabais de casa...
- A mis hermanas, a mi abuela, a mis “cuñaos” y a toda mi familia, que en todo momento se han interesado por lo que hacía y siempre me han ayudado cuando lo he necesitado.
- Y muy especialmente a mis padres, que me han permitido realizar todos mis sueños y que en todo momento se han preocupado por mí. Esta Tesis Doctoral va dedicada a vosotros. OS QUIERO.



A Mis Padres.



A Toda Mi Familia.



“El hombre se descubre a sí mismo  
cuando se enfrenta a los obstáculos”.

A. de Saint-Exupéry



# ÍNDICE



## ÍNDICE

ÍNDICE.....	iii
<i>Índice de Cuadros</i> .....	vi
<i>Índice de Figuras</i> .....	xii
<i>Índice de Abreviaturas</i> .....	xvii
<i>Índice de Símbolos</i> .....	xxi
1.- INTRODUCCIÓN .....	3
1.1.- FRUTAS Y VEGETALES .....	3
1.1.1.- <i>Importancia de su Consumo en la Salud</i> .....	5
1.1.2.- <i>Carotenoides y Provitamina A</i> .....	9
1.1.3.- <i>Vitamina C</i> .....	17
1.2.- NARANJAS, MANDARINAS Y ZANAHORIAS.....	22
1.3.- ZUMOS DEL MERCADO: TRATAMIENTOS INDUSTRIALES .....	25
1.3.1.- <i>Esterilización</i> .....	28
1.3.2.- <i>Pasteurización</i> .....	29
1.3.3.- <i>Nuevas Tecnologías</i> .....	31
1.3.3.1.- <i>Altas Presiones</i> .....	32
1.3.3.2.- <i>Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI)</i> .....	36
1.4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS .....	42
1.4.1.- <i>Carotenoides</i> .....	42
1.4.2.- <i>Vitamina C</i> .....	43
2.- OBJETIVOS .....	47
3.- PLAN DE TRABAJO .....	51
4.- PARTE EXPERIMENTAL .....	55
4.1.- MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES .....	55
4.1.1.- <i>Selección, Puesta a Punto y Validación del Método</i> .....	55
4.1.1.1.- <i>Reactivos</i> .....	55
4.1.1.2.- <i>Preparación de las Muestras</i> .....	55
4.1.1.3.- <i>Preparación de Soluciones Estándar de Patrones</i> .....	56
4.1.1.4.- <i>Selección del Patrón Interno</i> .....	57
4.1.1.5.- <i>Instrumentación</i> .....	59
4.1.1.6.- <i>Extracción y Saponificación de los Carotenoides</i> .....	60
4.1.1.7.- <i>Separación de Carotenoides. Gradiente de Fase Móvil</i> .....	64
4.1.1.8.- <i>Identificación y Cuantificación de Carotenoides</i> .....	68
4.1.2.- <i>Parámetros Analíticos</i> .....	75
4.1.3.- <i>Conclusiones</i> .....	78
4.2.- MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE VITAMINA C.....	79

4.2.1.- Selección, Puesta a Punto y Validación del Método .....	79
4.2.1.1.- Reactivos .....	79
4.2.1.2.- Preparación de las Muestras .....	79
4.2.1.3.- Preparación de la Disolución Patrón de Ácido Ascórbico .....	79
4.2.1.4.- Condiciones Polarográficas .....	80
4.2.2.- Parámetros Analíticos .....	80
4.2.3.- Conclusiones.....	83
4.3.- NARANJAS Y MANDARINAS.....	84
4.3.1.- Descripción de las Muestras .....	84
4.3.2.- Recolección y Tamaño de Muestra.....	85
4.3.3.- Almacenamiento .....	85
4.3.4.- Parámetros a Analizar.....	86
4.3.4.1.- Relación Zumo/Peso.....	86
4.3.4.2.- pH.....	86
4.3.4.3.- °Brix .....	87
4.3.4.4.- Vitamina C .....	87
4.3.4.5.- Perfil Carotenoides.....	87
4.3.5.- Resultados y Discusión.....	87
4.3.6.- Conclusiones.....	151
4.4.- ZUMOS COMERCIALES.....	152
4.4.1.- Descripción de las Muestras .....	152
4.4.2.- Parámetros a Analizar.....	153
4.4.3.- Resultados y Discusión.....	153
4.4.4.- Conclusiones.....	169
4.5.- ZUMO MEZCLA DE NARANJA-ZANAHORIA.....	170
4.5.1.- Elección de la Muestra .....	170
4.5.2.- Descripción de la Muestra .....	170
4.5.3.- Preparación.....	170
4.5.4.- Parámetros a Analizar.....	171
4.5.5.- Tratamiento por Calor.....	171
4.5.6.- Tratamiento por PEAI .....	171
4.5.7.- Vida Útil (2 y 10°C).....	172
4.5.8.- Almacenamiento del Zumo Fresco a -40°C .....	173
4.5.9.- Resultados y Discusión.....	177
4.5.9.1.- Efectos del Tratamiento por Calor y por PEAI sobre el Contenido de Carotenoides ...	177
4.5.9.2.- Vida Útil (a 2 y 10°C).....	190
4.5.9.3.- Almacenamiento del Zumo Fresco de Naranja-Zanahoria a -40°C.....	215
4.5.10.- Conclusiones.....	223

5.- CONCLUSIONES .....	227
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	233

**ÍNDICE DE CUADROS**

Cuadro nº 1. Ingestas dietéticas recomendadas (RDA).....	14
Cuadro nº 2. Ingestas recomendadas de vitamina A para la población española.....	15
Cuadro nº 3. Producción a nivel mundial de cítricos (miles de toneladas, Tm·10 <sup>3</sup> ) en la temporada 2002 (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación, 2003).....	23
Cuadro nº 4. Producción de cítricos (miles de toneladas, Tm·10 <sup>3</sup> ) por Comunidad Autónoma en la temporada 2002 (Generalitat valenciana, 2005). .....	23
Cuadro nº 5. Producción de zanahoria (miles de toneladas, Tm·10 <sup>3</sup> ) por Comunidad Autónoma en la temporada 2002 (Generalitat valenciana, 2005). .....	24
Cuadro nº 6. Coeficientes de extinción de algunos patrones.....	57
Cuadro nº 7. Gradiente de fase móvil para la determinación de carotenoides por CLAR.....	65
Cuadro nº 8. Longitudes de onda y tiempos de retención de un zumo mezcla de naranja-zanahoria y de un zumo de naranja. ....	66
Cuadro nº 9. Características cromatográficas y espectrales de los carotenoides en zumos de naranja y de mezcla naranja-zanahoria.....	71
Cuadro nº 10. Características cromatográficas y espectrales de los carotenoides en zumos de naranja obtenidos por distintos autores.....	72
Cuadro nº 11. Precisión instrumental y del método en zumos de naranja y zumos mezcla de naranja-zanahoria. ....	76
Cuadro nº 12. Cuantificación de carotenoides en zumo mezcla de naranja-zanahoria y en zumo de naranja.....	78
Cuadro nº 13. Ensayos de recuperación. ....	82
Cuadro nº 14. Descripción de las naranjas y mandarinas.....	84
Cuadro nº 15. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en clemenules.....	88
Cuadro nº 16. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en clemenules. Tiempo de recolección: 0 días. ....	89
Cuadro nº 17. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en clemenules. Tiempo de recolección: 14 días. ....	90
Cuadro nº 18. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en clemenules. Tiempo de recolección: 28 días. ....	91

Cuadro nº 19. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en clemenvilla.....	92
Cuadro nº 20. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en clemenvilla. Tiempo de recolección: 0 días.....	93
Cuadro nº 21. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en clemenvilla. Tiempo de recolección: 14 días.....	94
Cuadro nº 22. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en clemenvilla. Tiempo de recolección: 28 días.....	95
Cuadro nº 23. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en fortuna.....	96
Cuadro nº 24. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en fortuna. Tiempo de recolección: 0 días.....	97
Cuadro nº 25. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en fortuna. Tiempo de recolección: 14 días.....	98
Cuadro nº 26. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en fortuna. Tiempo de recolección: 28 días.....	99
Cuadro nº 27. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en navelina.....	100
Cuadro nº 28. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en navelina. Tiempo de recolección: 0 días.....	101
Cuadro nº 29. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en navelina. Tiempo de recolección: 14 días.....	102
Cuadro nº 30. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en navelina. Tiempo de recolección: 28 días.....	103
Cuadro nº 31. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en navel.....	104
Cuadro nº 32. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en navel. Tiempo de recolección: 0 días.....	105
Cuadro nº 33. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en navel. Tiempo de recolección: 14 días.....	106
Cuadro nº 34. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en navel. Tiempo de recolección: 28 días.....	107
Cuadro nº 35. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en navel-lane.....	108
Cuadro nº 36. Contenido de carotenoides (µg/100g) y vitamina A (µgRE/100g) en navel-lane. Tiempo de recolección: 0 días.....	109

Cuadro nº 37. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navel-lane. Tiempo de recolección: 14 días.....	110
Cuadro nº 38. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navel-lane. Tiempo de recolección: 28 días.....	111
Cuadro nº 39. Vitamina C. Análisis multifactorial de los resultados.....	114
Cuadro nº 40. Vitamina C. Modelos obtenidos.....	116
Cuadro nº 41. Vitamina A. Análisis multifactorial de los resultados.....	124
Cuadro nº 42. Vitamina A. Modelos obtenidos.....	126
Cuadro nº 43. pH. Análisis multifactorial de los resultados.....	129
Cuadro nº 44. pH. Modelos obtenidos.....	130
Cuadro nº 45. °Brix. Análisis multifactorial de los resultados.....	133
Cuadro nº 46. °Brix. Modelos obtenidos.....	134
Cuadro nº 47. Relación zumo/peso (v/p). Análisis multifactorial de los resultados.....	136
Cuadro nº 48. Relación zumo/peso (v/p). Modelos obtenidos.....	138
Cuadro nº 49. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar entre naranjas y mandarinas.....	141
Cuadro nº 50. Clasificación de naranjas y mandarinas, y el porcentaje de aciertos en la predicción.....	142
Cuadro nº 51. pH, °Brix, vitamina C, relación zumo/peso (v/p), vitamina A: coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar las variedades.....	144
Cuadro nº 52. pH, °Brix, vitamina C, relación zumo/peso (v/p), vitamina A: Clasificación de las variedades y el porcentaje de aciertos en la predicción.....	145
Cuadro nº 53. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar entre naranjas y mandarinas. Carotenoides.....	146
Cuadro nº 54. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar entre naranjas y mandarinas.....	148
Cuadro nº 55. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar entre las variedades.....	149
Cuadro nº 56. Carotenoides, °Brix y vitamina C: Clasificación de las variedades y el porcentaje de aciertos en la predicción.....	150
Cuadro nº 57. Descripción de zumos y néctares de naranja comercializados.....	152
Cuadro nº 58. Valores de pH, °Brix y vitamina C en zumos y néctares de naranja comercializados.....	153

Cuadro nº 59. Contenido de carotenoides en néctares de naranja comercializados.....	157
Cuadro nº 60. Contenido de carotenoides en zumos de naranja comerciales refrigerados. ....	161
Cuadro nº 61. Contenido de carotenoides en zumos de naranja no refrigerados a base de concentrado. ....	166
Cuadro nº 61. Contenido de carotenoides en zumos de naranja no refrigerados a base de concentrado. <i>Continuación</i> . ....	167
Cuadro nº 62. Longitudes de onda y tiempos de retención del zumo mezcla de naranja-zanahoria. ....	176
Cuadro nº 63. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y de vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria sin tratar y pasteurizado. ....	181
Cuadro nº 64. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI con campo de 25 kV/cm. ....	182
Cuadro nº 65. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI con campo de 30 kV/cm. ....	183
Cuadro nº 66. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI con campo de 35 kV/cm. ....	184
Cuadro nº 67. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI con campo de 40 kV/cm. ....	185
Cuadro nº 68. Concentración de ácido ascórbico ( $\text{mg}/100\text{mL}$ ) en el zumo de naranja-zanahoria para los distintos campos y tiempos de tratamiento. ....	189
Cuadro nº 69. Constantes ( $k_T$ ) y coeficientes de correlación ( $R^2$ ) para la degradación del ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI y pasteurizado durante el almacenamiento a 2 y 10 °C. ....	193
Cuadro nº 70. Vida media (días) del zumo de naranja-zanahoria pasteurizado y tratado por PEAI cuando se almacena a 2 y 10 °C.....	194
Cuadro nº 71. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo pasteurizado durante el almacenamiento a 10°C.....	197
Cuadro nº 72. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo pasteurizado durante el almacenamiento a 2°C.....	198

Cuadro nº 73. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo tratado por PEAI a 25 kV/cm, 280 $\mu\text{s}$ , durante el almacenamiento a 10°C.....	199
Cuadro nº 74. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo tratado por PEAI a 25 kV/cm, 280 $\mu\text{s}$ , durante el almacenamiento a 2°C.....	200
Cuadro nº 75. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo tratado por PEAI a 25 kV/cm, 330 $\mu\text{s}$ , durante el almacenamiento a 10°C.....	201
Cuadro nº 76. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo tratado por PEAI a 25 kV/cm, 330 $\mu\text{s}$ , durante el almacenamiento a 2°C.....	202
Cuadro nº 77. Influencia del tratamiento aplicado, la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de vitamina A: Análisis de regresión múltiple. ....	203
Cuadro nº 78. Análisis de la varianza multifactorial para la vitamina A: temperatura almacenamiento=10°C. ....	204
Cuadro nº 79. Análisis de la varianza multifactorial para la vitamina A: temperatura de almacenamiento=2°C. ....	206
Cuadro nº 80. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar el tratamiento aplicado.....	208
Cuadro nº 81. Clasificación de los tratamientos y porcentaje de aciertos en la predicción.....	209
Cuadro nº 82. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar la temperatura de almacenamiento (2 y 10 °C). ....	210
Cuadro nº 83. Clasificación de las temperaturas de almacenamiento y porcentaje de aciertos en la predicción. ....	211
Cuadro nº 84. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar el tiempo (días) de almacenamiento (2 °C). ....	212
Cuadro nº 85. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar el tiempo (días) de almacenamiento (10 °C). ....	212
Cuadro nº 86. Clasificación de los tiempos de almacenamiento a 2°C y porcentaje de aciertos en la predicción. ....	214
Cuadro nº 87. Clasificación de los tiempos de almacenamiento a 10°C y porcentaje de aciertos en la predicción. ....	214

Cuadro nº 88. Coeficiente de correlación entre carotenoides en zumo de  
naranja-zanahoria congelado (-40°C).....222

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura nº 1. Pirámide nutricional de la dieta mediterránea tradicional óptima. ....	4
Figura nº 2. Estructuras de carotenoides: carotenos y xantofilas. ....	11
Figura nº 3. Estructura del ácido ascórbico y sus derivados. ....	18
Figura nº 4. Evolución de la producción (toneladas) citrícola de la Comunidad Valenciana, campañas 1994/95 a 2004/05. ....	24
Figura nº 5. Evolución de la producción (toneladas) de naranjas, mandarinas y limones de la Comunidad Valenciana, campañas 1990/91 a 2004/05. ....	25
Figura nº 6. Identificación del patrón interno (palmitato de retinol) en patrones saponificados (1) e insaponificados (2) ( $\lambda=350.8$ nm). ....	58
Figura nº 7. Identificación del patrón interno (palmitato de retinol) en un zumo de naranja saponificado (A) y en una mezcla de patrones sin saponificar (B) ( $\lambda=350.8$ nm). ....	59
Figura nº 8. Esquema de extracción de pigmentos carotenoides. ....	63
Figura nº 9. Cromatograma de zumo mezcla de naranja-zanahoria a $\lambda=450$ nm (A) y $\lambda=350$ nm (B). ....	67
Figura nº 10. Cromatograma de zumo de naranja a $\lambda=450$ nm (A) y $\lambda=350$ nm (B). ....	68
Figura nº 11. Espectro de absorbancia para la 9-cis-violaxantina y la neoxantina (pico 2) ( $\lambda=430$ nm). ....	70
Figura nº 12. Cromatogramas de zumo mezcla de naranja-zanahoria a $\lambda=450$ nm (A) y $\lambda=290$ nm (B). ....	73
Figura nº 13. Cromatogramas de zumo de naranja a $\lambda=450$ nm (A) y $\lambda=290$ nm (B). ....	74
Figura nº 14. Polarograma de una muestra de zumo mezcla de naranja- zanahoria con sus respectivas adiciones. ....	81
Figura nº 15. Concentración media de vitamina C (mg/100mL) para cada variedad estudiada. ....	113
Figura nº 16. Concentración media de vitamina C (mg/100mL) según la fecha de recolección. ....	113
Figura nº 17. Vitamina C. Interacciones entre los factores: variedad, recolección y almacenamiento. ....	115
Figura nº 18. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en clemenules. ....	116

Figura nº 19. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en clemenules.....	117
Figura nº 20. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en clemenvilla.....	117
Figura nº 21. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en clemenvilla.....	118
Figura nº 22. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en fortuna.....	118
Figura nº 23. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en fortuna.....	119
Figura nº 24. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en navelina.....	119
Figura nº 25. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en navelina.....	120
Figura nº 26. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en navel.....	120
Figura nº 27. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en navel.....	121
Figura nº 28. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en navel-lane.....	121
Figura nº 29. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en navel-lane.....	122
Figura nº 30. Concentración media de vitamina A ( $\mu\text{g RE}/100\text{g}$ ) para cada variedad estudiada.....	123
Figura nº 31. Concentración media de vitamina A ( $\mu\text{g RE}/100\text{g}$ ) según la fecha de recolección.....	124
Figura nº 32. Vitamina A. Interacciones entre los factores: variedad, recolección y almacenamiento.....	125
Figura nº 33. Valor del pH para cada variedad estudiada.....	127
Figura nº 34. Valor del pH según la fecha de recolección.....	128
Figura nº 35. Valor del pH según el tiempo de almacenamiento.....	128
Figura nº 36. pH. Interacciones entre los factores: variedad, recolección y almacenamiento.....	129
Figura nº 37. °Brix para cada variedad estudiada.....	131
Figura nº 38. °Brix según la fecha de recolección.....	132
Figura nº 39. ° Brix según el tiempo de almacenamiento.....	132
Figura nº 40. °Brix. Interacciones entre los factores: variedad y recolección.....	133

Figura nº 41. Relación zumo/peso (v/p) para cada variedad estudiada .....	135
Figura nº 42. Relación zumo/peso (v/p) según la fecha de recolección.....	135
Figura nº 43. Relación zumo/peso (v/p) según el tiempo de almacenamiento.....	136
Figura nº 44. Relación zumo/peso (v/p). Interacciones entre los factores: variedad, recolección y almacenamiento. ....	137
Figura nº 45. Mandarinas y naranjas. Funciones discriminantes: representación gráfica. ....	142
Figura nº 46. Naranjas y mandarinas. Análisis de los principales componentes. ....	143
Figura nº 47. Variedades de naranjas y mandarinas. pH, °Brix, vitamina C, relación zumo/peso (v/p), vitamina A: funciones discriminantes: representación gráfica. ....	144
Figura nº 48. Carotenoides. Mandarinas y naranjas. Funciones discriminantes: representación gráfica.....	147
Figura nº 49. Mandarinas y naranjas. Funciones discriminantes: representación gráfica. ....	148
Figura nº 50. Variedades. Funciones discriminantes: representación gráfica. ....	150
Figura nº 51. Contenido de carotenoides en néctar de naranja comercial: 12D.....	154
Figura nº 52. Contenido de carotenoides en néctar de naranja comercial: 13D.....	155
Figura nº 53. Cromatograma del néctar de naranja 13D. ....	156
Figura nº 54. Contenido de carotenoides en néctar de naranja comercial: 14D.....	156
Figura nº 55. Contenido de carotenoides en zumo refrigerado de naranja exprimida: 2B.....	158
Figura nº 56. Contenido de carotenoides en zumo refrigerado de naranja exprimida: 3B.....	158
Figura nº 57. Contenido de carotenoides en zumo refrigerado de naranja exprimida: 4B.....	159
Figura nº 58. Cromatograma del zumo de naranja 4B.....	159
Figura nº 59. Contenido de carotenoides en zumo refrigerado de naranja a base de concentrado: 1A. ....	160
Figura nº 60. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 5C. ....	162
Figura nº 61. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 6C. ....	163

Figura nº 62. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 7C. ....	163
Figura nº 63. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 8C. ....	164
Figura nº 64. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 9C. ....	164
Figura nº 65. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 10C. ....	165
Figura nº 66. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 11C. ....	165
Figura nº 67. Contenido de vitamina A en zumos y néctares comerciales de naranja. ....	168
Figura nº 68. Cromatograma de zumo mezcla de naranja-zanahoria sin tratar a $\lambda=450$ nm (A) y $\lambda=290$ nm (B). ....	175
Figura nº 69. Concentración de luteína y zeaxantina ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) en diferentes campos eléctricos en zumo de naranja-zanahoria. ....	186
Figura nº 70. Variación de la vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) con el tratamiento de PEAI y calor. ....	187
Figura nº 71. Degradación (k) del ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria en cada uno de los tratamientos de PEAI estudiados. ....	188
Figura nº 72. Cinética de degradación del ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI (campo 25 kV/cm) y pasteurizado, durante el almacenamiento a 2 °C y 10 °C. ....	195
Figura nº 73. Vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) durante el almacenamiento a 10 °C. ....	205
Figura nº 74. Vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) dependiendo del tratamiento aplicado, almacenada a 10°C. ....	205
Figura nº 75. Vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) durante el almacenamiento a 2 °C. ....	206
Figura nº 76. Vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) dependiendo del tratamiento aplicado, almacenada a 2°C. ....	207
Figura nº 77. Tratamiento de conservación. Funciones discriminantes: representación gráfica. ....	208
Figura nº 78. Temperatura de almacenamiento. Funciones discriminantes: representación gráfica. ....	210
Figura nº 79. Tiempo de almacenamiento a 2°C. Funciones discriminantes: representación gráfica. ....	213
Figura nº 80. Tiempo de almacenamiento a 10°C. Funciones discriminantes: representación gráfica. ....	213

## Índice de Figuras

---

Figura nº 81. Variación del ácido ascórbico en zumos de naranja-zanahoria durante el almacenamiento a -40°C. ....	219
Figura nº 82. Evolución del contenido en vitamina A en zumo de naranja-zanahoria durante el almacenamiento a -40°C. ....	219
Figura nº 83. Evolución de la 9-cis-violaxantina+neoxantina y de la anteraxantina en el zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C). ....	220
Figura nº 84. Evolución de la luteína, zeaxantina, β-criptoxantina, cis-β-criptoxantina, mutatoxantina y α-criptoxantina en zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C). ....	220
Figura nº 85. Evolución del 9-cis-α-caroteno, 13-cis-β-caroteno, ζ-caroteno y 9-cis-β-caroteno en zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C). ....	221
Figura nº 86. Evolución del α-caroteno, fitoeno+fitoflueno y β-caroteno en el zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C). ....	221

**ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

- A: Absorbancia.
- AA: Acetato Amónico.
- ADN: Ácido Desoxirribonucléico.
- Ag: Plata.
- AgCl: Cloruro de Plata.
- ANOVA: Análisis de la Varianza.
- ATBC: *Alpha Tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study*.
- BHT: Butil-hidroxitolueno.
- Br<sup>-</sup>: Bromuro.
- C: Concentración.
- Ca: Calcio.
- Ca<sup>2+</sup>: Ión Calcio.
- CARET: Ensayo de Eficacia de Carotenos y Retinoides.
- Cl<sup>-</sup>: Cloruro.
- CLAR: Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
- cm: Centímetro.
- CN<sup>-</sup>: Cianuro.
- DME: Electrodo de Gotas de Mercurio.
- DPP: Polarografía Diferencial de Impulsos.
- E<sup>1%</sup>: Coeficiente de Extinción.
- EDTA: Ácido EtilenDiaminoTetraAcético.
- EE.UU: Estados Unidos.
- EtOH: Etanol.
- FDA: *Food and Drug Administration*.
- Fe: Hierro.
- g: Gramos.
- h: Hora.
- H<sub>2</sub>O: Agua.
- HDL: Lipoproteína de Alta Densidad.

HHP: *High Hydrostatic Pressure*.

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana.

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*.

HPP: *High Pressure Processing*.

I: Yoduro.

IATA: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

K: Potasio.

KCl: Cloruro Potásico.

Kg: Kilogramos.

KOH: Hidróxido Potásico.

kV: Kilovoltios.

L: Litros.

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad.

LOD: Límite de Detección.

LOQ: Límite de Cuantificación.

M: Molar.

m: Pendiente de la Curva de Calibrado.

MAPA: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

MeOH: Metanol.

Mg: Magnesio.

mg: Miligramos.

min: Minuto.

mL: Mililitros.

mm: Milímetros.

MPa: MegaPascales.

ms: Milisegundos.

mV: Milivoltios.

n: Número de Muestras.

N<sub>2</sub>: Nitrógeno.

- nA: Nanoamperios.  
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Sulfato Sódico.  
NaCl: Cloruro Sódico.  
nm: Nanómetros.  
nº: Número.  
ns: Nanosegundos.  
°C: Grados Centígrados o Celsius.  
ODS: Octadecilsílice.  
°F: Grados Fahrenheit.  
OMS: Organización Mundial de la Salud.  
ONU: Organización de las Naciones Unidas.  
P: Fósforo.  
p: Peso o Probabilidad.  
PEAI: Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad.  
PI: Patrón Interno.  
PM: Peso Molecular.  
PME: Pectinmetilesterasa.  
R%: Porcentaje de Recuperación.  
R<sup>2</sup>: Coeficiente de Correlación.  
RDA: Recomendaciones Dietéticas Permitidas.  
RE: Equivalentes de Retinol.  
RSD: Desviación Relativa Estándar.  
s: Segundos.  
T<sup>a</sup>: Temperatura.  
TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido TioBarbitúrico.  
TBME: terButil-metil-éter.  
Tm: Toneladas Métricas.  
t<sub>R</sub>: Tiempo de Retención.  
UE: Unión Europea.  
UHP: *Ultra High Pressure*.  
UHT: *Ultra High Temperature*.

UNICEF: Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia.

UV-vis: Ultravioleta-visible.

V: Voltios.

v: Volumen.

$\mu\text{L}$ : Microlitros.

$\mu\text{g}$ : Microgramos.

$\mu\text{m}$ : Micrómetros.

$\mu\text{s}$ : Microsegundos.

**ÍNDICE DE SÍMBOLOS**

$\varnothing$ : Diámetro.

$\lambda$ : Longitud de Onda.

$\sigma$ : Desviación Típica.



# **INTRODUCCIÓN**



## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- FRUTAS Y VEGETALES**

El consumo de frutas y vegetales juega un papel vital para proporcionar una dieta variada y equilibrada. Hoy en día existe un consumo bajo de frutas y vegetales, solamente una pequeña e insignificante minoría de la población mundial sigue las recomendaciones generales de tomar un alto porcentaje de frutas y vegetales. En 1998 sólo 6 de las 14 regiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) disponían de frutas y vegetales en cantidad igual o superior a la ingesta diaria recomendada de 400 g por persona y día. La situación favorable de 1998 fue debida a la disponibilidad de vegetales registrada entre 1990 y 1998 por la mayoría de los países. Sin embargo, la producción de la fruta disminuyó entre 1990 y 1998 en la mayoría de los países del mundo (OMS, 2003).

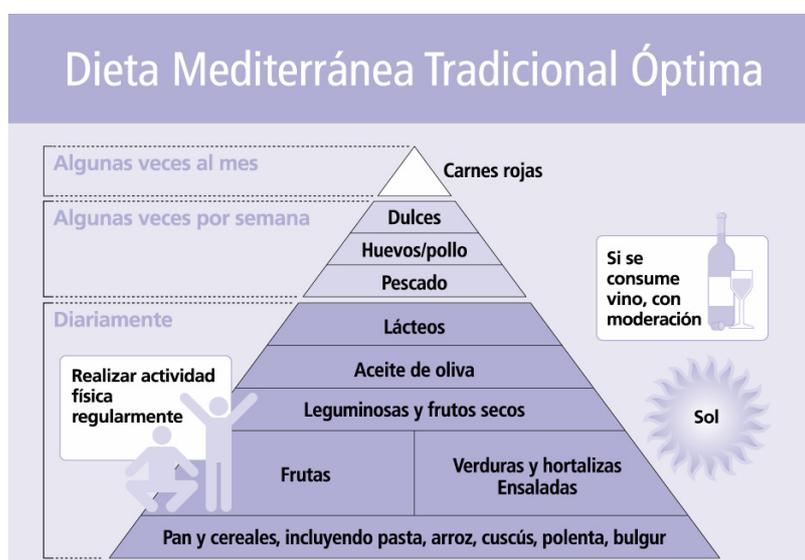
La evolución del sector de frutas y hortalizas está muy unida a su mayor o menor orientación al mercado, es decir, al objetivo de satisfacer a los clientes y a los consumidores finales, tanto nacionales como internacionales. En la actualidad existe una clara evolución de los hábitos de consumo hacia dietas más saludables como la mediterránea, con un mayor consumo de productos hortofrutícolas (figura nº 1). La decisión de compra de frutas y hortalizas debe su resultado a impulsos visuales centrándose en las dimensiones del producto, su forma, color, apariencia de fresca, pero la repetición de la compra viene determinada por los factores que tienen mucho que ver con el gusto, existiendo una demanda generalizada por recuperar el sabor y aroma de las frutas y hortalizas lo más frescas posibles.

Si bien las frutas y hortalizas se consumen generalmente frescas, un gran número de ellas han de ser procesadas y/o conservadas por razones económicas, logísticas, para mejorar su digestibilidad, por necesidades culinarias o para facilitar su consumo a determinados grupos de consumidores (niños, ancianos, enfermos o personas con poco tiempo para preparar los alimentos, etc.). El consumidor reclama alimentos seguros, obtenidos mediante un procesado y cuya preparación ocupe el menor tiempo

posible. Estos nuevos hábitos han repercutido en el aumento del consumo de zumos de frutas y hortalizas preparados. Algunos de los factores que han influido en este incremento son: la falta de tiempo en los hogares actuales para preparar los alimentos, la facilidad de consumo de frutas y hortalizas en forma de zumo para determinados segmentos de población como niños, ancianos o enfermos, así como la tendencia en comedores colectivos (colegios, oficinas o fábricas) de incrementar el consumo de frutas y hortalizas según recomendaciones de organismos relacionados con la salud (OMS, 2003).

A nivel de todas las Administraciones se está fomentando el consumo de frutas y hortalizas, la OMS, expertos en nutrición y sociedades afines estiman que el consumo recomendado es de 400 g o superior, dividido en 5 raciones variadas de frutas y hortalizas, cantidad que asegura el consumo mínimo de compuestos bioactivos de origen vegetal con efectos beneficiosos para la salud. En España este fomento está siendo fuertemente impulsado por el Club “5 al día” (Cullum, 2003; Tomás-Barberán, 2003).

Figura nº 1. Pirámide nutricional de la dieta mediterránea tradicional óptima.



Los zumos de fruta y hortalizas y productos derivados, como néctares y bebidas, han experimentado un crecimiento en su popularidad en los últimos años. Las naranjas

son una de las frutas predominantes en las áreas tropicales y subtropicales. Entre otras razones, el aumento en el consumo y en la exportación de los zumos de fruta procesados, pulpas y concentrados, pueden ser atribuidos al progreso en el cultivo y a la mejora en el procesado, transporte y distribución (Schieber et al., 2001).

En la actualidad, investigadores y tecnólogos de alimentos están realizando un gran esfuerzo para asegurar que los compuestos fitoquímicos o bioactivos presentes en los alimentos de origen vegetal se mantengan o se modifiquen mínimamente durante el procesado y almacenamiento, conservando intacto su valor nutricional y sus propiedades beneficiosas para la salud, por tanto los derivados de frutas y hortalizas, como zumos, pueden ser fuentes adecuadas de compuestos bioactivos para asegurar acciones protectoras en el organismo.

### **1.1.1.- IMPORTANCIA DE SU CONSUMO EN LA SALUD**

Las frutas son beneficiosas por sus características nutricionales, su contenido en minerales: K, Mg, Ca y P (Topuz et al., 2005) y vitaminas, así como también otros compuestos beneficiosos para nuestra salud (Cassano et al., 2003).

Las frutas y hortalizas presentan en su composición, además de nutrientes indispensables para la vida (hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas, etc.), otras sustancias, con un posible efecto protector frente a determinadas enfermedades degenerativas, conocidas como compuestos fitoquímicos o bioactivos (carotenoides, compuestos fenólicos, vitaminas A, C y E, fibra, glucosinolatos (isotiacionatos), compuestos organosulfurados, lactosas sesquiterpénicas, etc.), cuya actividad biológica ha sido estudiada en numerosos ensayos *in vitro*, *ex vivo* y mediante ensayos de intervención en humanos (Hertog et al., 1994; Giovannucci et al., 1995; Granado et al., 1997; Omaye & Zhang, 1998; Tribble, 1998; Duthie, 1999; Lampe, 1999; Kurowska et al., 2000; Slattery et al., 2000; Simon et al., 2001; Sánchez-Moreno et al., 2003; Brandt et al., 2004). La actividad antioxidante es una característica común a todos estos compuestos bioactivos por su capacidad para atrapar radicales oxígeno (hidroxilo, peroxilo, superóxido, oxígeno simple), radicales nitrógeno y radicales orgánicos (hidroperóxidos lipídicos, etc.). Los radicales libres aparecen en los tejidos en

situaciones de estrés oxidativo, atmósferas contaminadas, etc. La acumulación de estas especies provoca la aparición de daños oxidativos en el ADN, así como en las proteínas y lípidos de las membranas celulares. Todos estos daños conllevan el consecuente envejecimiento de los tejidos y la aparición de enfermedades degenerativas (Ames et al., 1993; Halliwell, 1996). Lampe (1999) describe varios mecanismos por los que las frutas y sus constituyentes pueden ejercer un efecto protector. Este mecanismo incluye la capacidad de modificar el metabolismo del colesterol, regular la detoxificación de enzimas, estimular el sistema inmune, disminuir la agregación plaquetaria, reducir la presión arterial, actuar sobre la concentración y metabolismo de las hormonas esteroideas, su papel como agente antibacteriano y antiviral y por su actividad antioxidante. Fawzi et al. (2004) obtienen en su estudio que los suplementos multivitamínicos retrasan la progresión de la enfermedad del HIV y proporcionan un efectivo, y de bajo coste, instrumento para retrasar la iniciación de la terapia antiretroviral en las mujeres infectadas por HIV.

El consumo de frutas y vegetales puede prevenir ciertas enfermedades como el cáncer y enfermedades cardiovasculares, ya que estos alimentos son ricos en vitaminas antioxidantes, como la vitamina C y E, compuestos fenólicos y carotenos (McCall & Frei, 1999; Williamson, 1999; Gardner et al., 2000; Block et al., 2001; Schieber et al., 2001; John et al., 2002; Burns et al., 2003; Sánchez-Moreno et al., 2003). Estudios epidemiológicos demuestran un gran efecto protector del consumo de frutas y vegetales frente al riesgo de determinadas enfermedades relacionadas con la edad, tales como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas, degeneración macular y diabetes (Jacques et al., 1988; Block et al., 1992; Hertog et al., 1993; Sarma et al., 1994; Giovannucci et al., 1995; Varma et al., 1995; Steinmetz & Potter, 1996; Kritchevsky et al., 1998; Law & Morris, 1998; Tribble, 1998; Albanes et al., 2000; Forastier et al., 2000; Slattery et al., 2000; Virtamo et al., 2000; Jacques et al., 2001; Simopoulos, 2001; Bazzano et al., 2002; Lichtenthaler & Marx, 2005). Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de vegetales y frutas con alto contenido en  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno y licopeno, se relaciona con una baja incidencia de ciertos tipos de cáncer: pulmón, piel y tracto digestivo, atribuyendo sus propiedades a su carácter antioxidante (Epler et al., 1993; Chen et al., 1995; Anguelova & Warthesen, 2000).

Los profesionales de la salud consideran el consumo de frutas y vegetales de gran importancia como un medio de protección contra estas enfermedades debido a su alto contenido en vitaminas antioxidantes, como las vitaminas C y E, compuestos fenólicos y carotenoides. La prevención parece ser la forma más eficaz de lucha contra esas enfermedades, desempeñando un importante papel las dietas ricas en estos compuestos (Tee, 1992; Rojas-Hidalgo, 1996; Van den Berg et al., 2000). Hay algunas situaciones (infancia, pubertad, embarazo, lactancia, vejez), en donde los patrones de nutrición así como también la suplementación vitamínica están claramente indicados. Las investigaciones epidemiológicas indican que cuanto más elevada es la ingesta de vitaminas, menor es la incidencia de ciertas enfermedades. Sin embargo, estudios de intervención consultados han aportado una pequeña evidencia inequívoca que apoya este argumento. Para ciertas vitaminas (vitaminas A, D, E, ácido fólico, ácido nicotínico, B<sub>6</sub> y  $\beta$ -caroteno), ingestas excesivas están asociadas con un riesgo para la salud o una clara toxicidad (Donma & Donma, 2005). Sin embargo, algunos estudios de suplementación con estos compuestos antioxidantes, sobre todo  $\beta$ -caroteno, han dado lugar a resultados contradictorios. Numerosos estudios epidemiológicos (ATBC, CARET, Women's health study) con suplementos de  $\beta$ -caroteno, sólo o asociado con vitamina E, no evita ni las enfermedades cardiovasculares ni algunos tipos de cáncer, siendo poco recomendables en individuos fumadores (ATBC, 1994; Hennekens et al., 1996; Taylor, 1996; Lee & Coates, 1999). Sin embargo, los estudios epidemiológicos con frutas y hortalizas o derivados, sí muestran resultados beneficiosos para la salud (Lampe, 1999; Aviram et al., 2000; Kris-Etherton et al., 2002; Temple & Gladwin, 2003).

Los cítricos, como las naranjas y mandarinas, contienen un cierto número de carotenoides y también un alto contenido en vitamina C. La zanahoria es el alimento con mayor contenido de carotenos. Los zumos de cítricos tienen muchos carotenos pero no todos son precursores de la vitamina A, por lo que el zumo mezcla de naranja-zanahoria es rico en antioxidantes y por tanto una importante fuente dietética de éstos (Bureau & Bushway, 1986).

En las zanahorias el agua es el componente más abundante (88%), seguido de los hidratos de carbono; nutrientes que nos aportan energía, en cantidades superiores a

otras hortalizas, ya que se trata de una raíz. Su color naranja se debe a la presencia de carotenos, entre ellos destaca el  $\beta$ -caroteno. Asimismo es fuente de vitamina E, que interviene en la estabilidad de las células sanguíneas y en la fertilidad, y de acción antioxidante, y de vitaminas del grupo B, tales como los folatos y la vitamina B<sub>3</sub> o niacina. En lo que se refiere a su contenido mineral destaca el aporte de potasio, calcio, fósforo y yodo. El consumo regular de zanahorias contribuye a cubrir las necesidades de vitamina A cuyos requerimientos diarios son de 0.8 a 1 mg. El  $\beta$ -caroteno o provitamina A, tras ser absorbido en nuestro cuerpo se transforma en vitamina A o retinol; esencial para la visión, el buen estado de la piel, los tejidos y para el buen funcionamiento de nuestro sistema inmunológico. Además, como antioxidante, al igual que la vitamina E, neutraliza los radicales libres, por lo que el consumo frecuente de zanahorias contribuye a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, degenerativas y del cáncer. El ácido fólico que aportan las zanahorias contribuye a tratar o prevenir anemias y a reducir el riesgo cardiovascular y de espina bífida en el embarazo. La niacina interviene en el funcionamiento del sistema digestivo, el buen estado de la piel, el sistema nervioso y en el metabolismo energético. También a la zanahoria se le atribuyen propiedades vermífugas (antiparasitarias) debido a la presencia de un aceite esencial. Este aceite, junto con la pectina (fibra soluble) presente en cantidades considerables, proporciona a la zanahoria un alto poder de gelificación y su acción astringente (Fundación Grupo Eroski, 2003).

Stern (1998) abordó el desarrollo de los zumos mezcla de frutas y vegetales enriquecidos con vitaminas, y entre los zumos seleccionados dió relevancia al zumo mezcla de naranja-zanahoria por su gran aceptación por parte de los consumidores. Está claro que, además de las excelentes y particulares características sensoriales y nutritivas del zumo de naranja, la incorporación de un porcentaje de zanahoria proporciona una considerable contribución a la salud del consumidor. Además de esto, el zumo de naranja es el más popular entre los consumidores por su sabor agradable, su aroma fresco y su valor nutricional. También tiene un elevado contenido en carotenoides antioxidantes ( $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina y luteína). Y, por otro lado, el zumo de zanahoria es también uno de los zumos vegetales más populares y representa

una fuente natural rica en  $\beta$  y  $\alpha$ -caroteno y luteína (Chen et al., 1996; Marx et al., 2003).

Es evidente, que además de las excelentes características intrínsecas tanto sensoriales como nutritivas del zumo de naranja, la incorporación de una parte de zanahoria hace una importante contribución para la salud del consumidor puesto que las naranjas tienen un contenido en vitamina C elevado y las zanahorias tienen el mayor contenido de carotenos entre los alimentos frescos (Bureau & Bushway, 1986). Este nuevo producto proporciona un aumento en la calidad (valor nutritivo, color, etc.), siendo el factor que más contribuye en la aceptación por parte del consumidor de dicho producto y aumenta su valor añadido.

### **1.1.2.- CAROTENOIDES Y PROVITAMINA A**

Los carotenoides son pigmentos naturales que proporcionan el color naranja, amarillo, rojo y púrpura a los vegetales (Burns et al., 2003). La vitamina A es poco sensible al calor y a la luz solar y ultravioleta, y sensible al oxígeno y al pH ácido entre otros factores (Casas y Mallent, 1988; Abraham, 1991).

La mayoría de los carotenoides se nombran por su nomenclatura tradicional, cuyas normas están basadas en nombres semisistemáticos, publicadas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC).

Dependiendo de la disposición de los sustituyentes, los dobles enlaces carbono-carbono pueden existir en dos configuraciones, llamadas como isómeros E/Z o *cis/trans*. En la actualidad, en el campo de la bioquímica de los carotenoides se utiliza el término *cis/trans*. Según el número de dobles enlaces presentes en la molécula, teóricamente se pueden formar un gran número de diferentes mono y poli *cis* isómeros geométricos. Sin embargo, debido a los impedimentos estéricos, pocos isómeros se formarán en concentración apreciable en las reacciones de isomerización. En la naturaleza, los carotenoides principalmente se encuentran en la configuración *all-trans*.

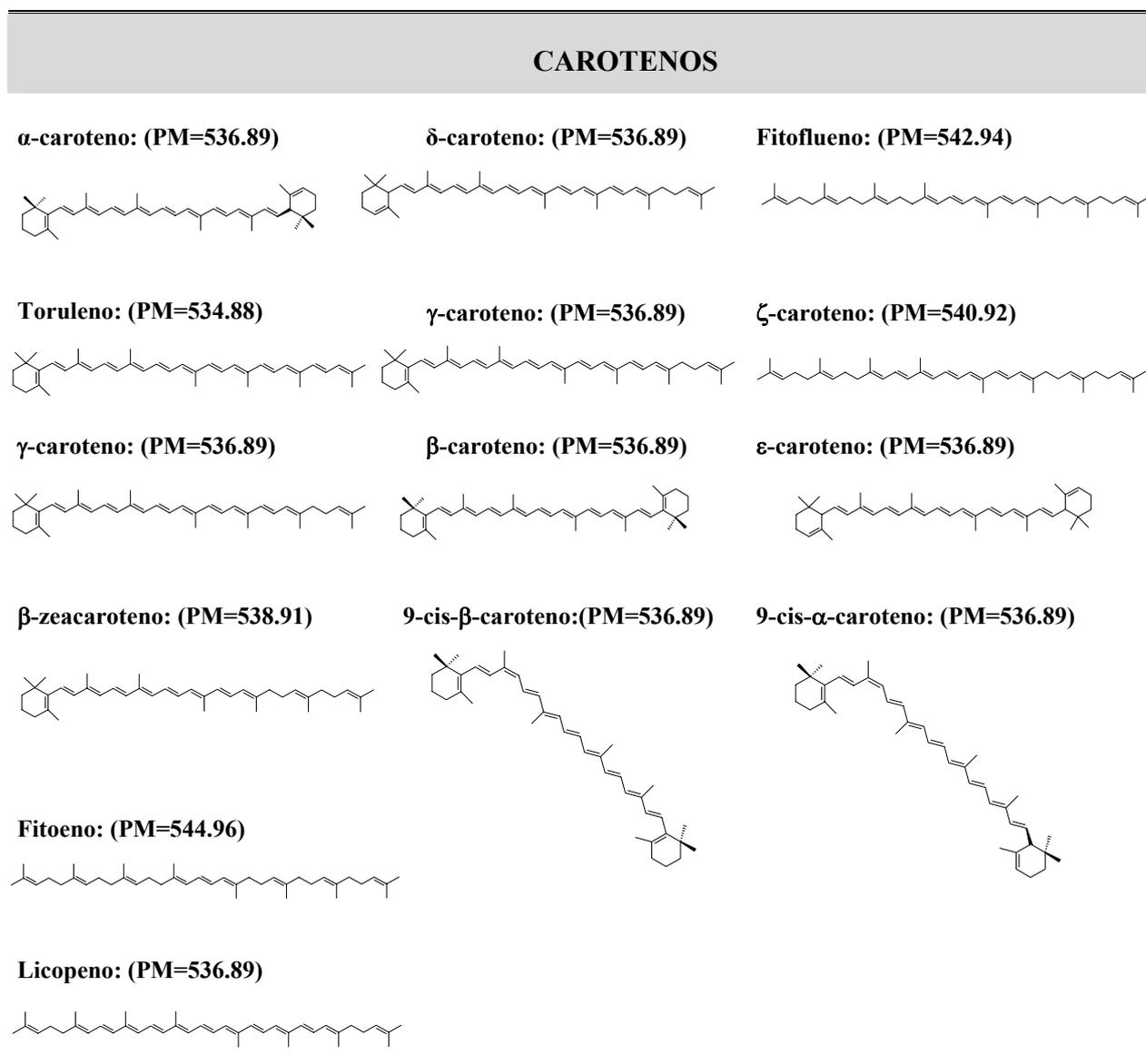
Su estructura básica es un esqueleto simétrico de tetraterpeno formado por la conjugación de dos unidades de C<sub>20</sub>. Formalmente, todos los carotenoides pueden ser

obtenidos desde una unidad acíclica  $C_{40}H_{56}$ , y todos contienen un sistema de dobles enlaces conjugados que les confiere sus propiedades físicas, bioquímicas y químicas.

Basándonos en su composición, los carotenoides se subdividen en dos grupos: aquellos que contienen solamente átomos de carbono e hidrógeno: carotenos o carotenoides hidrocarbonados ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno...), y los carotenoides que contienen al menos un grupo oxígeno, y se llaman xantofilas u oxocarotenoides (carotenoides oxigenados). Las xantofilas se encuentran esterificadas con ácidos grasos.

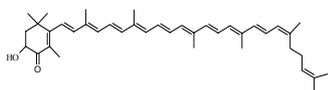
A continuación, en la figura nº 2, se pueden ver las estructuras de algunos de los carotenoides más comunes (Straub, 1987; Furr et al., 1992; Olmedilla et al., 1992; Britton, 1995; Mínguez-Mosquera, 1997; Mercadante et al., 1998).

Figura n° 2. Estructuras de carotenoides: carotenos y xantofilas.

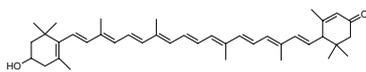


XANTOFILAS

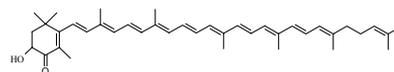
**3-hidroxi-beta, γ-5'-cis-caroten-4-ona: (PM=566.88)**



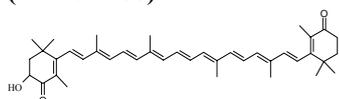
**3'-dehidro-luteína: (PM=566.88)**



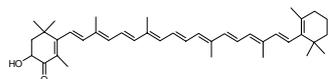
**3-hidroxi-beta, γ-caroten-4-ona: (PM=566.88)**



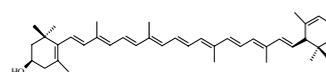
**3-hidroxi-echinenona: (PM=566.88)**



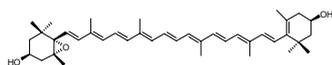
**Adonirubina: (PM=580.86)**



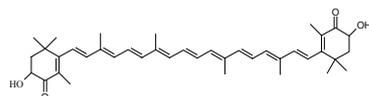
**α-criptoxantina: (PM=552.89)**



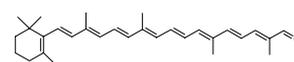
**Anteraxantina: (PM=584.89)**



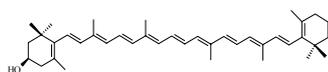
**Astaxantina: (PM=596.86)**



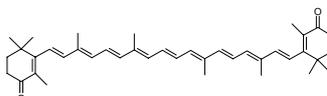
**β-apo-8'-carotenal: (PM=416.65)**



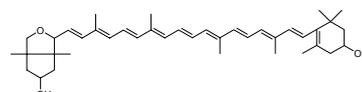
**β-criptoxantina: (PM=552.89)**



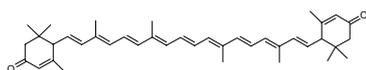
**Cantaxantina: (PM=564.86)**



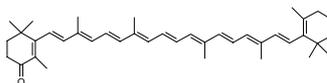
**Capsantina: (PM=584.89)**



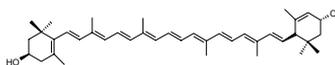
**ε,ε-caroten-3,3-diona: (PM=564.86)**



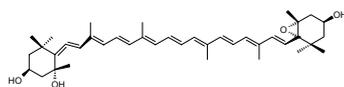
**Echinenona: (PM=550.88)**



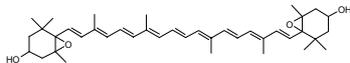
**Luteína: (PM=568.89)**



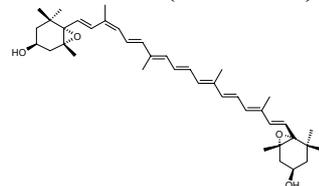
**Neoxantina: (PM=600.89)**



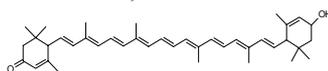
**Violaxantina: (PM=600.89)**



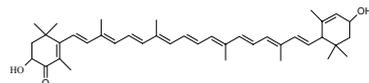
**9-cis-violaxantina: (PM=600.89)**



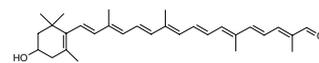
**3'-hidroxi-ε,ε-caroten-3-ona: (PM=566.88)**



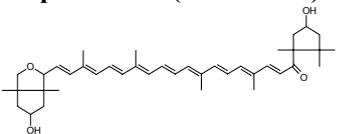
**α-doradexantina: (PM=582.87)**



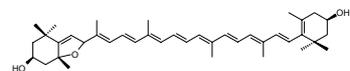
**β-citraurina: (PM=432.65)**



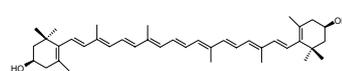
**Capsorubina: (PM=600.89)**



**Mutatoxantina: (PM=584.89)**



**Zeaxantina: (PM=568.89)**



Los carotenoides son pigmentos liposolubles y se encuentran en los plastidios del flavedo y en las vesículas del zumo y constituyen una mezcla muy compleja. Los carotenoides, además de dar color a los zumos cítricos, tienen importancia desde el punto de vista nutritivo por la actividad de provitamina A que poseen algunos de ellos. Poseen carácter de provitamina A aquellos carotenoides que tienen al menos un anillo de  $\beta$ -ionona no sustituido en uno de los extremos de su molécula (Casas y Mallent, 1988) y puede perderse por la formación de isómeros cis durante el calentamiento (Chen & Chen, 1993).

La vitamina A es un nutriente esencial para el hombre y para todas las especies mamíferas porque no pueden sintetizarla (Meléndez-Martínez et al., 2003). Hoy en día, más de 700 tipos de carotenoides han sido aislados en la naturaleza (O'Neil & Schwartz, 1992). Los carotenoides presentes en los cítricos son una mezcla compleja de >115 sustancias naturales (Klavi & Bauernfeind, 1981), pero no todos ellos son precursores de la vitamina A. Varios carotenoides, incluyendo  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y zeaxantina, tienen actividad provitamina A, pero en menor grado que el  $\beta$ -caroteno, siendo transformados en los mamíferos mediante reacciones enzimáticas en la mucosa intestinal y en el hígado (Misawa et al., 1994). La importancia de los carotenoides, así como de los alimentos que los contienen, se basa en sus dos propiedades más importantes, su actividad provitamínica A y su capacidad antioxidante (Granado et al., 1992; Grassmann et al., 2002), además son capaces de modular la patogénesis de los cánceres (Van Breemen et al., 1993; Van Poppel & Goldbohm, 1995; Giovannucci, 1999; Slattery et al., 2000) y de enfermedades coronarias (Kritchevsky, 1999). Las xantofilas (oxocarotenoides) luteína y zeaxantina son también conocidas por proporcionar protección contra la degeneración macular relacionada con la edad, a través de su habilidad para capturar el oxígeno libre y la luz azul en la retina (Landrum & Bone, 2001).

La prevalencia de ingestas inadecuadas y el riesgo de deficiencia es más elevada de lo esperado, según se desprende de los estudios llevados a cabo en las Comunidades Autónomas de Madrid, Cataluña y País Vasco (Aranceta et al., 2000).

En los cuadros nº 1 y 2 se muestran las ingestas recomendadas de vitamina A para la población americana (Food & Nutrition Board, 2000) y para la población

española (Departamento de Nutrición. Universidad Complutense de Madrid) respectivamente. Se puede comprobar que las recomendaciones españolas son ligeramente superiores a las americanas.

Cuadro nº 1. Ingestas dietéticas recomendadas (RDA).

<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Vitamina A (equivalentes de retinol)</b>
<b>Lactantes</b>		
0 – 6 meses		400
7 – 12 meses		500
<b>Niños</b>		
1 – 3 años	M	300
	F	300
4 – 8 años	M	400
	F	400
9 – 13 años	M	600
	F	600
14 – 18 años	M	900
	F	700
<b>Adultos</b>		
19 – 30 años	M	900
	F	700
31 – 50 años	M	900
	F	700
51 – 70 años	M	900
	F	700
> 70 años	M	900
	F	700
<b>Embarazo</b>		
14 – 18 años		750
19 – 30 años		770
31 – 50 años		770
<b>Lactancia</b>		
14 – 18 años		1200
19 – 30 años		1300
31 – 50 años		1300

M: masculino, F: femenino

Cuadro nº 2. Ingestas recomendadas de vitamina A para la población española.

<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Vitamina A (equivalentes de retinol)</b>
<b>Niños</b>		
0 – 6 meses		450
7 – 12 meses		450
1 – 3 años		300
4 – 5 años		300
6 – 9 años		400
<b>Adultos</b>		
10 – 12 años	M	1000
	F	800
13 – 15 años	M	1000
	F	800
16 – 19 años	M	1000
	F	800
20 – 39 años	M	1000
	F	800
40 – 49 años	M	1000
	F	800
50 – 59 años	M	1000
	F	800
60 – 69 años	M	1000
	F	800
> 70 años	M	1000
	F	800
<b>Embarazo</b>		
		800
<b>Lactancia</b>		
		1300

M: masculino, F: femenino

El déficit de vitamina A produce un efecto adverso en el desarrollo, la reproducción y en la resistencia a las infecciones, aunque la gravedad depende del grado de insuficiencia. La manifestación más importante del déficit de vitamina A es la xerofltalmia, con ceguera irreversible en uno o en los dos ojos. Los déficits en vitamina A están ampliamente extendidos en países en vías de desarrollo, afectando gravemente al crecimiento de los jóvenes (Fawzi et al., 1994; Biesalski, 1997; Chytil, 1999). UNICEF y ONU consideran que mejorar el estado de vitamina A en los jóvenes con una deficiencia marginal puede reducir la mortalidad en un 23% por término medio. Las

estrategias dietéticas son necesarias para sustituir los programas de suplementación, asegurando la sostenibilidad y una adecuada cobertura de los niños necesitados (Scrimshaw & Murray, 2000). Aunque las frutas y vegetales que contienen carotenoides son accesibles en los países en desarrollo, las deficiencias suelen encontrarse fuera de temporada (Zeitlin et al., 1992).

Aunque todos los tejidos resultan alterados por la deficiencia de vitamina A, los ojos son los que resultan afectados de modo más sobresaliente. En los lactantes y niños pequeños, el estado patológico conocido como xerofthalmia (ojos secos), constituye un síntoma temprano de esta deficiencia y es causa corriente de ceguera en algunas zonas tropicales, donde la nutrición es generalmente escasa. En los adultos, uno de los primeros signos de deficiencia en vitamina A es la ceguera nocturna, dificultad de adaptación a la oscuridad que se emplea frecuentemente como prueba para el diagnóstico.

Puesto que la deficiencia de vitamina A afecta a todos los tejidos de los mamíferos y no solamente a la retina, el papel del retinol en el ciclo visual no representa, por tanto, la acción total de la vitamina A. Es posible que esta vitamina desempeñe un papel general en el transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de ciertas membranas, por analogía con su papel en las células bastoncillo; un papel más general y de este tipo podría explicar los efectos de la deficiencia y del exceso en vitamina A sobre los huesos y los tejidos conectivos (Lehninger, 1993).

Una deficiencia suave de vitamina A está ampliamente extendida entre niños y mujeres embarazadas en países en desarrollo. Esta deficiencia aumenta la severidad de las enfermedades infecciosas, anemias relacionadas con el hierro y alteraciones en el crecimiento. Mejorar el estado de vitamina A podría prevenir un millón o más de muertes anuales entre la población pediátrica. Por otro lado, altas dosis de suplementos de vitamina A causan pocos efectos adversos en niños que se recuperan de la neumonía. Por esta razón, no son recomendables durante el tratamiento de tales pacientes a menos que haya una evidencia clínica de falta de vitamina A o exista una infección concurrente de sarampión. En niños con edades > 6 meses, los suplementos de vitamina A son beneficiosos para reducir la morbilidad y la mortalidad en países en vías de desarrollo, incluyendo los niños infectados por HIV. Actualmente los carotenoides están llamando

la atención de los consumidores y de especialistas en el campo de la nutrición, básicamente por sus propiedades antioxidantes y por sus funciones en relación al sistema inmune (Hosotani & Kitagawa, 2003). Sin embargo, entre mujeres embarazadas, los suplementos de vitamina A aumentan el riesgo de transmisión madre-hijo. La asociación inversa entre el nivel de  $\beta$ -caroteno y algunas formas de cáncer no han sido confirmadas en la actualidad.

El  $\beta$ -caroteno en los fumadores ha sido asociado con el aumento de niveles de cáncer de pulmón y enfermedades cardíacas (Blumberg & Block, 1994; Nicol & Savoure, 1993). A los fumadores oficialmente se les recomendaba abstenerse de comidas ricas en  $\beta$ -caroteno (ATBC, 1994). Conforme a una reciente recomendación, la suplementación con  $\beta$ -caroteno no debería exceder de 2 mg (Schieber et al., 2001). Los suplementos con vitamina A en unión con el hierro durante el embarazo beneficia el estado de la vitamina A en los niños (Donma & Donma, 2005).

Alrededor de un 70% de la ingesta de  $\beta$ -caroteno se absorbe, y la eficiencia de la absorción decrece rápidamente cuando se incrementa la ingesta. Sin embargo, la absorción depende del tipo de vegetal. Se ha comprobado que los carotenos se absorben dos o tres veces mejor de los vegetales de hoja verde que de los vegetales rojos o amarillos como las zanahorias (Krinsky, 1993).

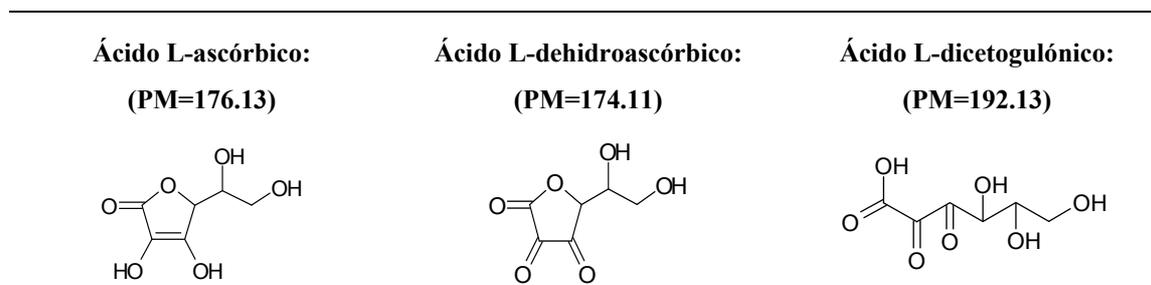
### **1.1.3.- VITAMINA C**

La vitamina C es un micronutriente esencial necesario para el normal funcionamiento metabólico del cuerpo. Es una de las vitaminas de estructura más sencilla, pues se trata de la lactona de un azúcar-ácido. El ácido ascórbico sólo se precisa en la dieta de unos pocos vertebrados: el hombre, los monos, el cobaya, el murciélago frugívoro de la India y en algunos peces. Algunos insectos y otros invertebrados necesitan también ácido ascórbico, pero la mayor parte de los demás animales superiores y de los vegetales pueden sintetizar el ácido ascórbico a partir de la glucosa y de otros precursores sencillos. El ácido ascórbico no está presente en los microorganismos y por tanto, no parece serles necesario.

El ácido ascórbico tiene una estructura química análoga a los carbohidratos, con

seis átomos de carbono, es hidrosoluble, termolábil y sensible frente a la oxidación y a los álcalis e iones metálicos.

Figura nº 3. Estructura del ácido ascórbico y sus derivados.



La vitamina C es un antioxidante soluble en agua e importante en los fluidos biológicos, la reserva total en el organismo es de 1500 a 2500 mg.

El ácido ascórbico es un potente reductor, pierde con facilidad átomos de hidrógeno y se transforma en ácido dehidroascórbico, que también posee actividad de vitamina C. Sin embargo, la actividad vitamínica se pierde cuando el anillo lactónico del ácido dehidroascórbico se hidroliza para formar ácido dicetogulónico (figura nº 3).

La vitamina C también puede actuar como un coantioxidante regenerando el  $\alpha$ -tocoferol (la vitamina E) desde el radical de  $\alpha$ -tocoferoxil, producido por la vía del secuestro de radicales solubles en lípidos. La vitamina C ha sido reconocida y aceptada por la US Food and Drug Administration (FDA) como uno de los cuatro antioxidantes dietéticos, los otros tres son las vitaminas E, la vitamina A cuyo precursor es el  $\beta$ -caroteno, y el selenio, un componente esencial de las enzimas antioxidantes glutatión-peroxidasa y tioredoxina-reductasa.

El Panel de Antioxidantes Dietéticos y los Compuestos Relacionados con la Comida y Tabla de la Nutrición ha coincidido, en principio, con esta definición, y además tiene en consideración otros carotenoides. Se publicaron las nuevas regulaciones recientemente, en las que la FDA declaró que la vitamina C servía como un efectivo secuestrador de radicales libres para proteger a las células del daño ocasionado por las moléculas de oxígeno reactivo.

La vitamina C se encuentra mayoritariamente en los vegetales y frutos frescos,

entre éstos, destacan por su contenido la acerola, grosella y fresa, siguiéndole los frutos cítricos, que tradicionalmente han sido los alimentos de referencia en cuanto al contenido de vitamina C por su elevada contribución al aporte dietético.

La ingesta diaria recomendada para adultos es de 60 mg/día (Food & Nutrition Board, 2000), si bien en la actualidad se aconseja aumentar esta cantidad con el fin de ser más efectiva frente a los procesos de envejecimiento. Es importante destacar que la ingesta de zumos de frutas aporta al organismo el 21% de la vitamina C diaria, mientras que el consumo global de frutas y hortalizas aporta el 45% del total (Ancos (de) et al., 2005).

Los estudios realizados sugieren que una ingesta diaria de 90-100 mg de vitamina C reduce el riesgo de padecer enfermedades crónicas en hombres y mujeres no fumadores (Carr & Frei, 1999).

Aunque los síntomas del escorbuto en el hombre pueden subsanarse por administración de unos 20 mg de ácido ascórbico diarios, existe cierta evidencia de que puedan necesitarse cantidades mayores para una función fisiológica y un bienestar completamente normales. La falta de vitamina C en la dieta causa la enfermedad, por deficiencia, del escorbuto. Esta enfermedad potencialmente fatal puede prevenirse con tan poco como 10 mg de vitamina C/día, una cantidad que fácilmente se obtiene a través del consumo de fruta fresca y vegetales. La RDA se ha fijado por la proporción de existencias y la proporción del vaciamiento de una reserva inicial en el cuerpo de 1500 mg de vitamina C y dando por hecho una absorción de  $\approx 85\%$  de la vitamina en las tomas usuales. Esta cantidad proporciona un margen adecuado de seguridad: 60 mg/día prevendrían el desarrollo del escorbuto durante aproximadamente 1 mes con una dieta carente de vitamina C. Las RDAs están principalmente determinadas sobre la base de prevenir la deficiencia; porque el escorbuto no es un problema de salud importante en los Estados Unidos, esta finalidad está claramente cumplida por la actual RDA para la vitamina C.

Los mecanismos moleculares del efecto antiescorbútico de la vitamina C están ampliamente, aunque no completamente, establecidos. La vitamina C es un cofactor para varias enzimas involucradas en la biosíntesis del colágeno, la carnitina, y de neurotransmisores, actúa como cofactor en la hidroxilación enzimática de la prolina a

hidroxiprolina y en otras reacciones de hidroxilación, pero no es específico en estas reacciones y puede sustituirse por otros agentes reductores carentes de actividad antiescorbútica (Lehninger, 1993).

Entre las funciones corporales de la vitamina C cabe mencionar las siguientes: es necesaria para mantener la integridad del tejido conjuntivo, especialmente de las paredes capilares, actúa en la prevención del escorbuto, cataliza las reacciones de hidroxilación en la síntesis del colágeno y de la norepinefrina, participa en la amidación de las hormonas peptídicas, en la regeneración de la vitamina E y protege frente al “estrés oxidativo” (Anderson et al., 1987; Halliwell et al., 1995). Parece que el ácido ascórbico es el factor más eficaz en la formación del colágeno, más que sus metabolitos, aunque éstos también son activos (Davey et al., 2000). Otra reacción importante de hidroxilación en la que interviene la vitamina C es la síntesis de catecolaminas. La formación y activación de estos transmisores está claramente afectada, a nivel del sistema vascular, por las carencias graves de ácido ascórbico (Gershoff, 1993).

La vitamina C participa en la biosíntesis de carnitina, factor implicado en la  $\beta$ -oxidación a nivel mitocondrial de los ácidos grasos de cadena larga. El 80% de los ácidos grasos de la dieta es de cadena larga, por lo tanto, a pesar de las controversias respecto del papel de la vitamina C en la patología cardiovascular, es obvio que resulta indispensable para la normal oxidación de los ácidos grasos (Anderson et al., 1987; Jacob et al., 1987; Gershoff, 1993).

Las mujeres embarazadas o las lactantes también requieren una mayor ingesta de vitamina C para mantener sus concentraciones plasmáticas de vitamina C cercanas a las de otras mujeres. Las elevadas necesidades probablemente se deben al transporte activo placentario de la vitamina C, por lo cual las concentraciones de vitamina C son significativamente superiores en la sangre del cordón y en los niños recién nacidos que en las madres, y a la pérdida adicional de vitamina C a través de la leche materna.

Una deficiencia de vitamina C produce un debilitamiento de las estructuras de colágeno, causando la pérdida dentaria, acompañado de dolores, desórdenes en el tejido conectivo y en el hueso, y una mala curación de las heridas, las cuales son características del escorbuto. Los ancianos son proclives a tener deficiencias en vitamina C, probablemente debido a sus hábitos dietéticos, además de que también

parecen tener una mayor necesidad de vitamina C. Un reciente estudio de cohortes también mostró que el consumo de suplementos de vitamina C estaba asociado con una menor prevalencia del deterioro cognoscitivo severo. Finalmente, otros dos recientes estudios encontraron que los pacientes con la enfermedad de Alzheimer tenían concentraciones de vitamina C en plasma más bajas, a pesar de tener una dieta adecuada y de que los suplementos con vitamina C podían disminuir el riesgo de padecer Alzheimer (Carr & Frei, 1999). Perrig et al. (1997) establecieron una relación positiva entre altos niveles de ácido ascórbico en sangre y la capacidad de memoria.

Un porcentaje significativo de investigaciones han indicado que los fumadores tienen unos requisitos más altos de vitamina C que los no fumadores. Las concentraciones de vitamina C son más bajas en los fumadores que en los no fumadores y se relaciona inversamente al consumo de cigarrillos. La RDA para los fumadores es de 100 mg de vitamina C/día, aunque se ha propuesto que los fumadores requieren  $\geq 2-3$  veces la actual RDA de 60 mg/día para mantener las concentraciones plasmáticas de vitamina C comparables a las de los no fumadores.

La vitamina C se considera uno de los antioxidantes naturales más eficaces y menos tóxicos, se encuentra a elevada concentración en numerosos tejidos, si se compara con los contenidos plasmáticos, y posee las características de lo que podría considerarse un secuestrador ideal de radicales libres. Como tal, es eficaz frente a los radicales superóxido e hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y el oxígeno singulete (Slater & Block, 1991; Halliwell et al., 1995).

En la síntesis del colesterol a partir de los ácidos biliares participa el citocromo P450, cuya acción está modulada por el ácido ascórbico. Según Sastre-Gallego (1995) la trigliciridemia y la colesterolemia son más altas en la hipovitaminosis C.

El zumo de naranja es una fuente muy importante de ácido ascórbico, un nutriente que además de su acción vitamínica es apreciado por su efecto antioxidante, por la estimulación del sistema inmunitario y por otros beneficios para la salud que están siendo activamente investigados y descritos, tal como la inhibición en la formación de los cánceres causados por compuestos N-nitroso en el estómago (Hussein et al., 2000; Sánchez-Mata et al., 2000).

## **1.2.- NARANJAS, MANDARINAS Y ZANAHORIAS**

Entre los zumos de frutas el de naranja es el de mayor elaboración y consumo principalmente a partir de concentrado. Brasil y EE.UU. suministran el 85% del que se consume en el mundo. Destacando Florida que industrializa el 95% de su producción de naranjas como zumo. En Europa los tres principales productores, España, Italia y Grecia, producen una cantidad de zumo que no cubre la demanda europea, por lo que se recurre a importaciones de zumos de naranja de Brasil y de EE.UU. (Worsley, 2001).

España es el mayor exportador mundial de cítricos frescos, aproximadamente 3 millones de Tm. La cantidad de fruta que se destina en España a la industrialización depende de la demanda del mercado fresco (exportación y consumo nacional). Se estima que la media de transformación en España, en los últimos cinco años, es de 600000 Tm de naranja al año, por lo que la producción española de zumo de naranja es de 240 millones de litros (Generalitat Valenciana, 2005).

Las zanahorias (*Daucus carota*) se consumen mucho en fresco, no siendo importante su producción comercial como zumo de zanahoria. Son una excelente fuente de  $\beta$ -caroteno, con contenidos moderados de ácido ascórbico y diversos minerales.

El zumo de zanahoria es una bebida nutritiva si las condiciones de procesado y almacenamiento se eligen cuidadosamente, siendo los problemas más comunes los debidos a: la baja acidez, cuajado, cambios en el color y aroma. La acidificación con ácido cítrico o con zumos ácidos (zumo de naranja) mejora algunas de las dificultades del procesado, como la retención del color y la prevención de la coagulación. La temperatura de almacenamiento del zumo de zanahoria parece ser el factor de estabilidad más importante, debiendo conservarse a 5°C o menos, para alargar la vida útil del zumo y conservar más tiempo su calidad nutricional y organoléptica (Ayranci & Tütüncüler, 1993).

En cuanto a la producción de zanahorias, en el año 2001 en España se produjeron 383.3 miles de toneladas (17.9 en la Comunidad Valenciana), de ellas se destinaron 313.6 para consumo en fresco y 41.7 para su transformación (MAPA, 2003).

En los cuadros nº 3-5 se muestran los datos de producción de cítricos (naranjas y mandarinas) y zanahoria en los últimos años a nivel mundial y por comunidades autónomas en España.

Cuadro nº 3. Producción a nivel mundial de cítricos (miles de toneladas, Tm·10<sup>3</sup>) en la temporada 2002 (Ministerio de agricultura, pesca y alimentación, 2003).

Localización	Naranjas	Mandarinas
Mundo	63091	18497
España	2867	1952
Grecia	1165	119
Italia	1724	548
Brasil	18447	910
EE.UU.	11226	533
Méjico	3844	360

Cuadro nº 4. Producción de cítricos (miles de toneladas, Tm·10<sup>3</sup>) por Comunidad Autónoma en la temporada 2002 (Generalitat valenciana, 2005).

Localización	Navelina	Navel	Navel-Lane	Mandarinas
España	1293	329	464	1952
Comunidad Valenciana	926	156	213	1484
Murcia	46	22	40	39
Andalucía	297	130	204	84

Cuadro nº 5. Producción de zanahoria (miles de toneladas, Tm·10<sup>3</sup>) por Comunidad Autónoma en la temporada 2002 (Generalitat valenciana, 2005).

Localización	Zanahorias
España	437
Castilla y León	174
Castilla La Mancha	14
Comunidad Valenciana	19
Extremadura	10
Andalucía	199

En el grupo de la naranja dulce y subgrupo Navel destacan tres variedades por su mayor cultivo, Navelina, Navel y Navel Lane late, cuya producción en la Comunidad Valenciana (campaña 2003/2004) fue de 883141, 135135 y 239032 toneladas, respectivamente.

Dentro de las mandarinas en el subgrupo de las clementinas las tres variedades que se cultivan mayoritariamente en la Comunidad Valenciana son: Clemenules (Clementina de Nules), Clemenvilla (Nova) y Fortune, siendo su producción (campaña 2003/2004) de 621705, 150541 y 105593 toneladas, respectivamente (Generalitat Valenciana, 2005).

En las siguientes figuras se observa la producción citrícola de la Comunidad Valenciana en los últimos diez años.

Figura nº 4. Evolución de la producción (toneladas) citrícola de la Comunidad Valenciana, campañas 1994/95 a 2004/05.

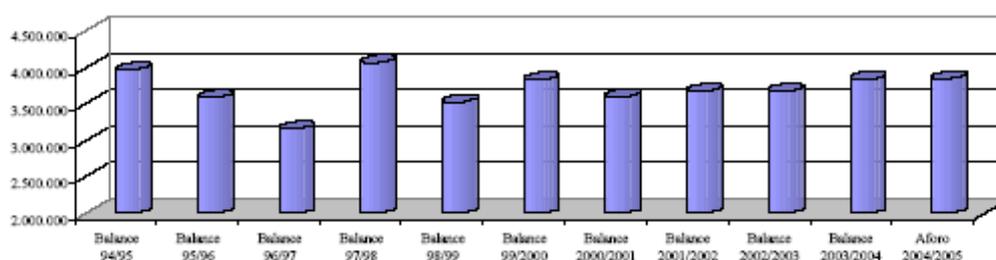
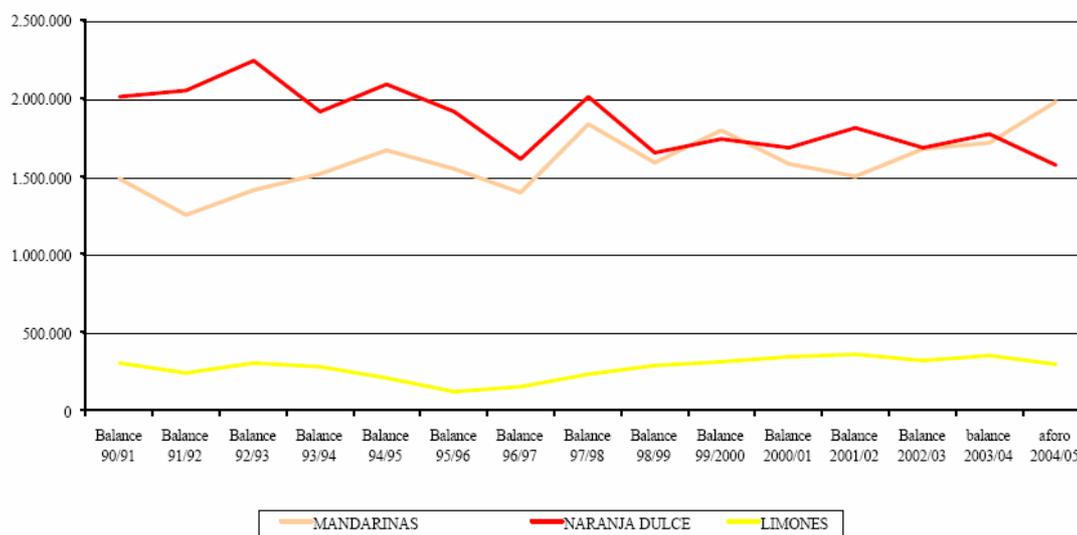


Figura nº 5. Evolución de la producción (toneladas) de naranjas, mandarinas y limones de la Comunidad Valenciana, campañas 1990/91 a 2004/05.



### **1.3.- ZUMOS DEL MERCADO: TRATAMIENTOS INDUSTRIALES**

Las tendencias actuales en la producción de alimentos tratan de desarrollar nuevas tecnologías, para la conservación de los mismos con el mínimo tratamiento, para conseguir una seguridad microbiológica y para preservar los atributos de calidad del alimento. Adaptarse a las nuevas corrientes y exigencias del consumidor ha sido uno de los objetivos prioritarios del sector, por lo que desde hace algunos años se están elaborando zumos más parecidos al natural, zumos de primera extracción, con una ligera pasteurización, que se comercializan bajo refrigeración con un tiempo de vida útil limitado. En esta línea se están desarrollando, además del zumo de naranja, nuevos productos, mezclas de zumos, que aumenten la calidad (valor nutritivo, color, etc.) que es el factor que más contribuye a la aceptación por parte del consumidor.

La estacionalidad y el carácter perecedero de frutas y vegetales explican la necesidad de aplicar las tecnologías de conservación. El objetivo es combinar el

aumento de la vida media del producto con el mantenimiento de las características nutritivas y sensoriales (Giannakourou & Taoukis, 2003).

El color de la corteza y del zumo de los frutos cítricos son atributos de calidad de gran importancia, y constituyen factores decisivos en la adquisición de los mismos por los consumidores (Casas y Mallent, 1988).

El procesado térmico es uno de los métodos por los que los alimentos son conservados y se hacen accesibles al consumidor. Durante el tratamiento térmico, además de la inactivación de microorganismos, constituyentes deseables como nutrientes, color, aroma y textura se destruyen en distintos porcentajes (Chen & Chen, 1993; Lessin et al., 1997; Rodrigo et al., 1997; Parish, 1998; Bezman et al., 2001; Manso et al., 2001; Alwazeer et al., 2002; Lee & Coates, 2003; Polydera et al., 2004). La vitamina C es termolábil y por consiguiente en frutas y vegetales es indicativa de la pérdida de otras vitaminas y se utiliza como parámetro de calidad para otros componentes organolépticos o nutritivos, tales como los pigmentos naturales y sustancias aromáticas. Su concentración disminuye durante el almacenamiento, dependiendo de las condiciones del mismo, tales como la temperatura, el contenido en oxígeno, la luz y el tiempo (Esteve et al., 1995<sup>a</sup>; Murata et al., 2002; Alwazeer et al., 2003; Polydera et al., 2003; Zerdin et al., 2003; Blasco et al., 2004).

La congelación de zumos de frutas y vegetales es una de las formas más comunes de mantener la calidad de estos productos. Se ha especificado que los cambios nutritivos más importantes en los alimentos congelados se deben al tiempo de almacenamiento (Sahari et al., 2004). Sin embargo, la congelación no previene de la pérdida de sabor y aroma, de la deterioración del color y de la textura en los vegetales congelados, porque los sistemas enzimáticos permanecen activos (Rodríguez-Saona et al., 1995). La concentración de vitamina C, además de ser un indicador del valor nutritivo, se utiliza, en el caso de los zumos congelados, como un indicador fiable y representativo para estimar la pérdida de la calidad. Al igual que el ácido ascórbico, los carotenoides son muy susceptibles al deterioro durante el almacenamiento de los alimentos que los contienen. La estabilidad de los carotenoides durante el almacenamiento es un objetivo importante para hacer que el producto final sea atractivo

y aceptable, aunque la degradación de los carotenoides no sólo afecta al color de los alimentos si no también a su valor nutritivo y a su sabor.

Durante el almacenamiento, el zumo de naranja sufre un número importante de reacciones de deterioro (degradación del ácido ascórbico, pérdida de la “nube”, putrefacción microbiana, desarrollo de olores extraños, cambios en el color, en la textura y en la apariencia), que redundan en una pérdida de la calidad del producto (Ewaidah, 1992; Goyle & Ojha, 1998; Roig et al., 1999; Ayhan et al., 2001; Bezman et al., 2001).

Lo que se conoce como “nube” en los zumos es una composición final de una división de partículas de pectina, celulosa, hemicelulosa, proteínas y lípidos en suspensión (Irwe & Olsson, 1994; Klavons et al., 1994) y se considera una característica deseable porque afecta favorablemente a la turbidez, sabor y color del zumo de naranja. La pérdida de la “nube” que se produce en los procesos de gelificación en los zumos de naranja concentrados es el mayor problema asociado al deterioro del mismo. Esta alteración de la “nube” se debe principalmente a la actividad de la pectin metilesterasa (PME), una enzima que se localiza en la pared celular y que se ve liberada durante la extracción del zumo (Versteeg et al., 1980; Oakenfull & Scott, 1984; Cameron et al., 1998). La PME hidroliza el C<sub>6</sub> metil éster de los residuos del ácido galacturónico en pectinas. La pectina desmetilada interacciona con los iones de calcio causando la precipitación de los pectatos de calcio insolubles, aunque también otros componentes de la “nube” son atrapados. Además las pectinas con un bajo grado de esterificación llegan a ser altamente susceptibles a la degradación por acción de enzimas endoactivas como la poligalacturonasa (Macmillan & Sheiman, 1974).

La aplicación de diversos tratamientos industriales puede llevar a la formación de isómeros *cis* en los carotenos, que no poseen la misma actividad provitamínica A que los isómeros *trans*, pero Shi & Le Maguer (2000) indican que la biodisponibilidad de los isómeros *cis* del licopeno es mayor que la de los isómeros *trans*. Según Southon (2000) la biodisponibilidad de los carotenoides aumentó el quintuplo en los productos procesados como consecuencia de un calentamiento moderado o de la ruptura enzimática de la estructura celular vegetal. En general la actividad antioxidante total de

zumos de diferentes vegetales aumenta significativamente después del tratamiento térmico (Gazzani et al., 1998; West & Castenmiller, 1998).

En los comercios existe una amplia oferta de zumos de naranja envasados que constituyen una buena fuente de nutrientes y una saludable opción para mantener hidratado el organismo. Los avances técnicos en el proceso de elaboración de estos productos permiten que se conserven casi todas las sustancias nutritivas de la fruta fresca y los métodos de conservación les confieren una larga vida útil. Debido al tratamiento térmico que sufren estos zumos industriales y a su prolongado almacenamiento puede producirse una pérdida de vitamina C. Para compensarla, se permite la adición de ácido ascórbico (E-300) (Fundación Grupo Eroski, 2003).

Las zanahorias (*Daucus carota*) se consumen mucho en fresco, no siendo importante su producción comercial como zumo de zanahoria. Son una excelente fuente de  $\beta$ -caroteno, con contenidos moderados de ácido ascórbico y diversos minerales. El zumo de zanahoria es una bebida nutritiva si las condiciones de procesado y almacenamiento se eligen cuidadosamente. Los problemas más comunes en este aspecto se deben a: la baja acidez, cuajado, cambios en el color y aroma. La acidificación con ácido cítrico o con zumos ácidos (zumo de naranja) mejora algunas de las dificultades del procesado, como la retención del color y la prevención de la coagulación. La temperatura de almacenamiento del zumo de zanahoria parece ser el factor de estabilidad más importante, debiendo conservarse a 5°C o menos, para alargar la vida útil del zumo y conservar más tiempo su calidad nutricional y organoléptica (Ayranci & Tütüncüler, 1993).

### **1.3.1.- ESTERILIZACIÓN**

La esterilización es un tratamiento severo por calor cuyo fin es eliminar todos los microorganismos presentes en el alimento, resultando un alimento comercialmente estéril. Sus principales ventajas son: proporcionar una mayor vida útil al alimento y poderse almacenar a temperatura ambiente. Entre sus desventajas están: sobrecocción del alimento y cambios en cuanto a la textura, aroma, sabor y calidad nutricional del producto.

Los tiempos y las temperaturas de calentamiento varían, pero el tratamiento por calor debe ser suficiente para esterilizar el alimento. Normalmente se aplican temperaturas muy altas (entre 135 y 150°C) que permiten tiempos muy cortos (sólo 4-15 segundos) (Vaclavik, 1998).

Las industrias de zumos, derivados lácteos, sopas, helados, etc. suelen aplicar tratamientos UHT (*Ultra High Temperature*), que pueden corresponder a dos tecnologías diferentes: (Bello, 2000)

- Tratamiento térmico directo: el producto toma contacto directo con el medio calefactor, que generalmente es vapor de agua.

- Tratamiento térmico indirecto: el calor se transmite a través de una superficie de separación integrada en un intercambiador de calor.

La mayoría de los alimentos estériles comercializados tienen una vida útil de dos años o más. Cualquier deterioro que ocurra después de este tiempo es debido a los cambios en la textura o aromas, no a los crecimientos microbianos (Vaclavik, 1998; Bello, 2000).

En general, las frutas y verduras sufren cambios drásticos tras los tratamientos por calor, tanto en las características nutricionales como en las características físicas: aroma, textura, etc. (Prochaska et al., 2000).

### **1.3.2.- PASTEURIZACIÓN**

El propósito de los tratamientos suaves por calor son: eliminar los microorganismos patógenos, reducir el recuento microbiano (aunque el alimento no será estéril) e inactivar las enzimas del alimento, proporcionar las mínimas pérdidas de aroma, sabor, textura y calidad nutritiva. Sin embargo también tiene inconvenientes, pues el producto resultante tiene una corta vida media y necesita de otro método de conservación (como la refrigeración o la congelación) (Vaclavik, 1998).

La pasteurización es el método de conservación que sólo conduce a una destrucción selectiva de la población microbiana patógena. Hay dos grandes grupos de tecnologías de pasteurización:

- Empleo de bajas temperaturas (60-65°C) y tiempos bastante largos.

- Empleo de altas temperaturas (75-90°C) y tiempos cortos.

Es normal que la pasteurización se acompañe de procedimientos que garanticen la buena conservación: envases herméticamente cerrados, envasado a vacío, refrigeración hasta su consumo, adición de agentes acidulantes, adición de azúcares concentrados, etc. (Bello, 2000).

Actualmente, el zumo se somete a temperaturas entre los 90-95°C durante 15-60 segundos y éste se envasa asépticamente en caliente, se enfría y se almacena para su comercialización (Cano et al., 2003).

Estudios recientes del efecto que ejerce el calor sobre la calidad de varios tipos de frutas y vegetales, entre ellos el zumo de naranja, han indicado una relativa pérdida del contenido total de vitamina A por disminución de algunos carotenos presentes en el zumo de naranja. Esta reducción se ha estimado en un 36% (Lessin et al., 1997), a pesar de que en el mismo estudio no se observan pérdidas de los carotenos de la uva tinta bajo condiciones de pasteurización, siendo el perfil de carotenos del zumo de naranja mucho más complicado. En las naranjas dulces, las xantofilas oxigenadas representan más del 90% del contenido total de carotenos (Philip, 1975) y éstas tienen diferente estabilidad térmica en comparación con los carotenoides hidrocarbonados como el  $\beta$ -caroteno.

Lee y Coates (2003), presentaron resultados del contenido total de carotenoides en el zumo fresco de naranjas de la variedad dulce de  $6.25 \pm 0.11$  mg/mL, mientras que en el mismo estudio en los zumos pasteurizados el contenido total era de  $5.70 \pm 0.08$  mg/mL, lo que representa pérdidas del 10%. Después del tratamiento de pasteurización se ven afectados los carotenoides presentes en la naranja, de tipo 5,6-epóxidos, como la violaxantina, cis-violaxantina y anteraxantina. Sin embargo, otros aumentan su contenido, los del tipo 5,8-epóxido, como la luteína y la mutatoxantina, después del tratamiento. Esto se debe a que la violaxantina es uno de los carotenoides más lábiles y es fácilmente isomerizado en presencia de ácidos a luteoxantina y después a auroxantina (Rodríguez-Amaya, 2000). Lee y Coates (2003) no encontraron pérdidas significativas para los contenidos de los carotenos que presentan actividad provitamina A ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina) en comparación con las encontradas para las xantofilas.

Los tratamientos térmicos descomponen el  $\beta$ -caroteno en sus isómeros *cis* o en productos resultantes de su fragmentación. Estas reacciones afectan al total de provitamina A y a la actividad de los carotenos de manera significativa (Butz et al., 2002).

Se ha demostrado también una relación entre el contenido de carotenoides presentes en el zumo de naranja y el color que el mismo presenta. Después de la pasteurización el color del zumo se hace más luminoso y menos saturado. Estos resultados son debidos a la posible precipitación de las partículas en suspensión (Genovese et al., 1997).

La pérdida de vitamina C durante el almacenamiento del zumo de naranja, hasta niveles inaceptables por la legislación define en muchos casos la vida media del propio zumo, convirtiendo al ácido ascórbico en un indicador de calidad del zumo de naranja (Ryley et al., 1990; Polydera et al., 2003). Durante el almacenamiento el contenido de vitamina C disminuye gradualmente dependiendo del procesado, temperatura de almacenamiento y tipo de envase. Cuando el tratamiento dado al zumo es de tipo térmico la pérdida de vitamina C puede ser del 43%, siendo la velocidad de degradación de la vitamina C mayor que cuando se aplican tecnologías alternativas (Polydera et al., 2003).

El pardeamiento puede producirse por las reacciones de Maillard que ocurren entre grupos amino con azúcares reductores o por otros mecanismos no enzimáticos con carbohidratos no reductores durante el almacenamiento comercial (Friedman et al., 1992). Las pérdidas de calidad nutricional en parte se atribuyen a estas reacciones por: (a) destrucción de aminoácidos esenciales, (b) menor digestibilidad, (c) producción de compuestos antinutritivos o tóxicos (Mauron, 1981; Finot et al., 1990; Friedman, 1991; Loscher et al., 1991).

### **1.3.3.- NUEVAS TECNOLOGÍAS**

La demanda de alimentos mínimamente procesados ha aumentado en los últimos años, debido a la retención de aroma, color y valor nutritivo y a la demanda del consumidor por alimentos de alta calidad lo más parecidos al natural (aroma, sabor,

color y valor nutritivo) y seguros. Aunque, los procesos térmicos convencionales garantizan la seguridad y extienden la vida media de los alimentos, llevan a menudo a cambios perjudiciales en la calidad sensorial del producto (Bull et al., 2004).

La innovación tecnológica en la industria alimentaria es uno de los pilares en los que se sustenta el incremento de la competitividad y el aporte de alimentos seguros desde el punto de vista microbiológico, con una calidad y disponibilidad acordes con las exigencias del consumidor actual, que demanda “productos semejantes al fresco”. Actualmente están emergiendo nuevas tecnologías no térmicas para obtener alimentos con una mayor calidad nutritiva y sensorial, ya que éstos se ven afectados por los tratamientos térmicos aunque sean mínimos. Por consiguiente, los procesos no térmicos están desarrollándose para la conservación de alimentos como una alternativa a los métodos térmicos tradicionales (Selma et al., 2003; Spilimbergo et al., 2003).

Mediante el uso de estas tecnologías se pretende inactivar la actividad de los microorganismos presentes en el alimento así como algunas enzimas de interés, sin destruir los componentes nutritivos y sensoriales que normalmente sí son afectados durante los tratamientos por calor.

Las nuevas tecnologías no térmicas son equivalentes a los procesos de pasteurización pero, no a los de esterilización. Se consiguen reducciones significativas de la población de *Escherichia coli* mediante estas tecnologías, comparables a la pasteurización a 60-70°C (Lado & Yousef, 2002), sin embargo sólo el tratamiento por altas presiones (HPP) combinado con calor es capaz de destruir también las esporas. El tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) es bueno para inactivar, en poco tiempo y en continuo, las células vegetativas pero no consigue eliminar las esporas (Grahl & Märkl, 1996).

### ***1.3.3.1.- Altas Presiones***

Esta tecnología conocida por las siglas de *High Pressure Processing* (HPP), o como *Ultra High Pressure* (UHP) o *High Hydrostatic Pressure* (HHP) ha sido estudiada como técnica para la conservación de alimentos durante más de un siglo (Hite, 1899). En Japón, Francia, España y EE.UU. ya están siendo comercializados una serie

de productos tratados por altas presiones. Esta tecnología se utiliza para conservar alimentos sólidos y líquidos, envasados o no, mediante presiones entre 100 y 800 MPa. Las temperaturas que se alcanzan durante el tratamiento pueden ir desde los 0°C a los 100°C y los tiempos de exposición desde pocos segundos hasta 20 minutos.

Los cambios químicos y microbiológicos que se producen en los alimentos dependen de la temperatura y del tiempo de tratamiento. Los efectos de las altas presiones hidrostáticas sobre los microorganismos pueden ser divididos en: efectos relativos a la cubierta celular, cambios celulares inducidos por la presión, aspectos bioquímicos y efectos en los mecanismos genéticos.

La compresión aumenta uniformemente la temperatura de los alimentos aproximadamente 5°F (3°C) por cada 100 MPa. La compresión de los alimentos puede cambiar el pH de éstos como efecto de la presión impuesta y debe determinarse para cada proceso de tratamiento de alimentos. La actividad del agua y el pH están entre los factores críticos del proceso en la inactivación de microorganismos por altas presiones. Un aumento en la temperatura del alimento por encima de la temperatura ambiente, y en menor grado, una disminución por debajo de la temperatura ambiente aumentan la tasa de inactivación de los microorganismos durante el tratamiento por altas presiones.

Un incremento de la temperatura durante el tratamiento por altas presiones ayuda a la inactivación de dichos microorganismos, siendo suficientes temperaturas entre 45-50°C para inactivar patógenos y microorganismos. Temperaturas comprendidas entre 90-110°C combinadas con las altas presiones (500-700 MPa) son suficientes para la inactivación de esporas del género *Clostridium*. Junto a la destrucción de los microorganismos se producen cambios en el alimento a nivel de: desnaturalización o modificación de proteínas, inactivación o activación de enzimas, cambios en las interacciones enzima-sustrato, cambios en las propiedades de carbohidratos y grasas. La aplicación de esta tecnología sigue el principio de Le Chatelier donde bajo condiciones de equilibrio, los procesos asociados al aumento o descenso de volumen son favorecidos por la presión y viceversa.

Las altas presiones actúan sobre las enzimas modificando las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas. La actividad biológica de las enzimas depende de la localización del centro activo dentro de la configuración tridimensional de la

molécula, cualquier cambio, por pequeño que sea, puede provocar la pérdida de dicha actividad. La estructura terciaria se mantiene por interacciones hidrofóbicas e iónicas y para verse afectada se deben sobrepasar los 200 MPa, mientras que la estructura cuaternaria es más débil al sostenerse por enlaces no covalentes que se rompen a presiones por debajo de los 150 MPa (Cano et al., 2003).

Hendrickx et al. (1998) observaron que presiones por debajo de los 100 MPa pueden activar ciertas enzimas, sobretodo de tipo monomérico, mientras que presiones más elevadas provocan la inactivación enzimática.

La PME (pectinmetilesterasa) es una enzima a inactivar por el papel que ejerce en la pérdida de la “nube” característica de un zumo de naranja fresco. El efecto que produce la combinación de la presión con temperaturas intermedias en la inactivación de dicha enzima bajo las condiciones de HPP es satisfactorio para la estabilidad de la “nube” del zumo de naranja.

Las altas presiones producen cambios morfológicos en las células vegetativas de los microorganismos como: compresión del gas de las vacuolas, alargamiento de las células, separación de la membrana celular de la pared celular, contracción de la pared celular con formación de poros, modificaciones del citoesqueleto, modificaciones de los núcleos y orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares fuera de la célula. Otras modificaciones son a nivel bioquímico y genético por inactivación de enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN (Téllez- Luis et al., 2001). Las células vegetativas se inactivan a presiones entre 300-600 MPa mientras que las esporas bacterianas son mucho más resistentes y se deben alcanzar presiones mayores de 1.200 MPa (Knorr, 1993).

El efecto combinado de presión, temperatura y tiempo de tratamiento en los carotenoides totales o en los carotenoides con capacidad antioxidante: luteína, zeaxantina,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno, estudiados por Ancos (de) et al. (2002), dió como resultado un incremento significativo en el contenido total de carotenos. El tratamiento a 350 MPa, 30°C durante 5 minutos proporcionó unos incrementos: del 50% para el  $\beta$ -caroteno, 60% del  $\alpha$ -caroteno, 42% de la  $\beta$ -criptoxantina y 63% de la  $\alpha$ -criptoxantina, en comparación con el zumo fresco. Sin embargo presiones entre los 50-200 MPa no producen cambios significativos en el perfil

de carotenoides. Tampoco fueron encontradas correlaciones directas entre los valores de presión y la extracción de carotenoides. Una posible explicación a estos hechos sería que los carotenos no se encuentran libres en el medio sino que están formando enlaces con proteínas en las membranas celulares. El incremento que se produciría a ciertas presiones podría deberse al aumento de la capacidad de extracción. El tratamiento a 350 MPa aumenta el contenido de carotenos después de la desnaturalización de los enlaces caroteno-proteína inducidos por la presión. Se ha hipotetizado por tanto que las HPP pueden ser un tratamiento adecuado para aumentar la extracción de carotenos desde la matriz, lo cual estaría asociado a un aumento del valor nutricional.

El mismo estudio reveló además que los zumos tratados a presiones entre 200-350 MPa a 30°C durante 5 minutos presentaban un contenido similar de carotenos a lo largo del periodo de vida útil del alimento (30 días), bajo condiciones de almacenamiento a refrigeración a 4°C.

Fernández et al. (2001) observaron que no existían pérdidas significativas de ácido ascórbico en los zumos tratados por HPP y almacenados a 4°C durante 21 días. Este estudio apoyaba los resultados obtenidos por Nienaber y Shellhammer (2001) que describieron una pérdida similar de ácido ascórbico en los zumos de naranja tratados por HPP debido a la oxidación, al igual que en los zumos frescos. Cuando el tratamiento es por altas presiones, el zumo de naranja retiene un 70-79% de la vitamina C, mientras que si se aplica un tratamiento térmico sólo retiene un 57% (Polydera et al., 2003).

Los factores críticos del proceso por altas presiones incluyen; la presión, tiempo a esa presión, tiempo para lograr la presión del tratamiento, tiempo de descompresión, temperatura del tratamiento (incluso del calentamiento adiabático), temperatura del producto inicial, distribución de temperatura en el recipiente a esa presión, pH del producto, composición del producto, actividad del agua del producto, integridad del material de empaquetado, y las contribuciones del proceso coexistentes. Las altas presiones hidrostáticas pueden causar cambios estructurales indeseables en alimentos estructuralmente frágiles tales como fresas o lechuga (por ejemplo, deformación celular y daño de la membrana celular). Los productos alimenticios que han sido comercializados son: ostras crudas, jaleas de fruta y mermeladas, zumos de fruta, aliños para la ensalada, calamar crudo, pasteles de arroz, hígado de pato, jamón y guacamole.

Los alimentos tratados por esta tecnología conservan sus propiedades originales, color, sabor y aroma. La ventaja es que el tratamiento es instantáneo y actúa uniformemente por toda la masa del alimento, independientemente del tamaño, empaquetado, estado, tipo o composición del alimento. Los zumos tratados por HPP retienen más el sabor que los tratados por calor (Parish, 1998).

### ***1.3.3.2.- Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad (PEAI)***

Fruto de la innovación tecnológica en la industria alimentaria es la aparición de esta nueva tecnología; los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), con la que se espera tratar alimentos líquidos con determinadas propiedades (ligeramente viscosos, conductividad baja y con pocas partículas y de pequeño tamaño), a los que se les aporte una mayor calidad nutritiva y sensorial y una mayor vida útil, en comparación con las técnicas tradicionales, puesto que la calidad es el factor que más contribuye a la aceptación por parte del consumidor y al aumento del valor añadido del producto.

El origen de su uso se sitúa al final de los años 20 en EE.UU. cuando Fettecman intentó tratar leche mediante impulsos eléctricos para pasteurizarla.

El uso de los pulsos eléctricos de alta intensidad proviene del campo de la biología molecular y de la ingeniería genética. La investigación en estas áreas hace uso de los electroporadores para abrir huecos en la membrana plasmática de los microorganismos y permitir de esta manera la introducción de material genético procedente de otro microorganismo y con ello conseguir ciertas mejoras, bien en la funcionalidad del microorganismo en el cual se introduce el material genético o bien en los metabolitos de interés tecnológico que es capaz de producir. En estos casos las intensidades aplicadas no superan los 10-12 kV/cm. En la tecnología de PEAII se aplican intensidades de campo que oscilan entre 15 y 50 kV/cm, de tal modo que originan poros de tamaño y número tan elevado que la célula no puede reparar el daño, produciéndose salida de material celular e inactivándose (Martínez et al., 2000; Góngora-Nieto et al., 2002; Ulmer et al., 2002; Abram et al., 2003). El éxito de esta técnica depende de la fuerza del campo eléctrico, de la longitud del pulso, del número de pulsos, de la forma del pulso y de la temperatura de arranque. Un aumento en la intensidad del campo

eléctrico y en el tiempo del tratamiento, definido como el producto del número de pulsos y la longitud del pulso, aumenta la inactivación microbiana. La aplicación de los pulsos, cuantificados como intensidad de energía, resultan en una dispersión de la energía térmica y por consiguiente en un aumento de la temperatura del producto (Abram et al., 2003). Adicionalmente, los parámetros medioambientales en los alimentos pueden influir en la eficacia de la inactivación de los microorganismos por PEAI. Los parámetros del tratamiento óptimos dependen; de la matriz específica del alimento, de la temperatura, del pH, de la presencia de compuestos antimicrobianos y de la conductividad del medio (Ulmer et al., 2002).

El tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad ha ganado un interés creciente al ofrecer algunas ventajas sobre los métodos térmicos que actualmente se usan en la elaboración de alimentos y materias crudas (Abram et al., 2003). Los PEAI se han utilizado con gran éxito en productos líquidos, sin embargo, algunos alimentos semisólidos y pulverulentos también han sido tratados (Góngora-Nieto et al., 2002). Los alimentos retienen más aromas y vitaminas cuando son elaborados por PEAI que con calor (métodos térmicos), manteniendo sus propiedades organolépticas y sus vitaminas casi intactas e inactivando los microorganismos y algunas enzimas, sin presentar diferencias significativas respecto al mismo producto sin elaboración (Qin et al., 1995; Grahl & Märkl, 1996; Jia et al., 1998; Qiu et al., 1998; Bendicho et al., 1999; Bendicho et al., 2001). La técnica implica menos cambios en las propiedades físicas y sensoriales del alimento que cuando el mismo se trata por calor (Pothakamury et al., 1997; Barbosa-Cánovas et al., 1999; Jeyamkogan et al., 1999; Góngora-Nieto et al., 2002).

Se conoce que los PEAI inactivan enzimas, como la PME (pectinmetilesterasa), aunque no está realmente claro ni su efecto ni su mecanismo de actuación (Bendicho et al., 2001). Algunos de los mecanismos propuestos para la inactivación enzimática incluyen reacciones oxidativas y cambios conformacionales en la estructura terciaria de la proteína, que es la que induce su acumulación (Mermelstein, 1998).

La tecnología de los pulsos eléctricos de alta intensidad es una tecnología emergente en el campo de la conservación de alimentos. Los PEAI tienen la aptitud de pasteurizar no térmicamente diversos alimentos mediante su exposición a pulsos cortos de alto voltaje, mientras el material se encuentra entre los electrodos de la cámara de

tratamiento. El campo eléctrico afecta a las membranas celulares (Barsotti & Cheftel, 1999), pudiendo producir la rotura irreversible de las membranas (Zimmermann, 1986; Pothakamury et al., 1997; Calderón-Miranda et al., 1999), alterando el transporte de iones (Kim et al., 2001) e induciendo cambios en la estructura de las enzimas (Vega-Mercado et al., 1995; Fernández-Díaz et al., 2000). Hay muchos estudios sobre el efecto que esta nueva tecnología ejerce sobre los microorganismos y su vida media.

Rodrigo et al. (2001), Ulmer et al. (2002) y Abram et al. (2003) han estudiado la inactivación de *Lactobacillus plantarum*, de *Escherichia coli* y de *Enterobacter aerogenes*, así como también se han estudiado mesófilos, mohos y levaduras (McDonald et al., 2000; Rodrigo et al., 2003<sup>a</sup> y 2003<sup>b</sup>; Selma et al., 2003; Spilimbergo et al., 2003).

Diferentes autores han estudiado la evolución de los factores de calidad de zumos de naranja después de ser tratados por pulsos, y en algunos casos se ha comparado con la evolución después de aplicar un tratamiento térmico (Ho et al., 1997; Jia et al., 1998; Giner et al., 2000; Yeom et al., 2000<sup>a</sup> y 2000<sup>b</sup>; Ayhan et al., 2001; Van Loey et al., 2001; Min et al., 2002; Min & Zhang, 2002).

Los mecanismos por los cuales se inactivan los microorganismos pueden explicarse de varios modos:

- Ruptura dieléctrica. La fuerte polarización de las células producida por un campo eléctrico externo, aumenta la permeabilidad y la conductividad de la membrana. El grado de permeabilidad depende de la intensidad y duración del campo aplicado. Según Zimmermann et al. (1976), cuando la membrana celular se expone a pulsos eléctricos de 1 a 10 kV/cm durante 20 ns a 10 ms, tiene lugar una ruptura eléctrica que es reversible. Sin embargo, si la duración del pulso aumenta de 10-15 ms el daño se vuelve irreversible. La ruptura dieléctrica supone una inestabilidad local en la membrana debida a la compresión electromecánica y la tensión del campo eléctrico inducida, dando lugar a la formación de poros.

- Electroporación. Es el fenómeno por el que una célula expuesta a un campo eléctrico sufre una desestabilización temporal de la bicapa lipídica y de las proteínas de su membrana. La consecuencia es la formación de poros en la membrana, por lo que ésta queda parcial o totalmente dañada (Chang, 1992).

Los aspectos que hay que tener en cuenta a la hora de usar esta tecnología son; la intensidad del campo eléctrico, el diseño de las cámaras donde se va a tratar el alimento para que el tratamiento se realice de forma uniforme con un mínimo incremento de la temperatura durante el procesado, y el diseño de los electrodos para minimizar el efecto que pudiera causar la electrolisis (Butz & Tauscher, 2000).

La aplicación de los pulsos eléctricos de alta intensidad se adecua mejor a alimentos líquidos, aunque también han sido probados en algunos semisólidos y purés (Zhang et al., 1995; Keith et al., 1997). El tamaño de las partículas de los alimentos en ambos tratamientos, modo estático y fluido, es una limitación para la aplicación de los pulsos. Además, estos alimentos a tratar deben tener una baja viscosidad, gran homogeneidad y bajo riesgo de ruptura dieléctrica, por lo cual los zumos de fruta son idóneos para la aplicación de esta tecnología (Góngora-Nieto et al., 2002).

Hasta ahora, los PEAI se han aplicado principalmente para aumentar la vida media de los alimentos, estando restringidos a los alimentos que puedan soportar elevados campos eléctricos, que tengan una baja conductividad eléctrica y que no contengan o formen burbujas.

Qin et al. (1998) trataron un zumo de naranja fresco y reconstituido con diferentes tipos de pulsos y en todos los casos eliminaron hasta el 99.9% de la microflora, aunque el nivel de inactivación en zumo fresco fue menor. Yeom et al. (2000<sup>a</sup>) consiguieron 7 reducciones logarítmicas en el recuento de aerobios totales, mohos y levaduras en zumo de naranja procesado mediante PEAI (35 kV/cm y 59  $\mu$ s). Con idénticas condiciones de tratamiento se consiguió una inactivación del 88% de la pectinmetilesterasa (PME), pero fue inferior a la inactivación obtenida por el tratamiento térmico (2% de actividad residual).

En el año 1999 ya se había doblado el número de grupos de investigación que trabajaban con pulsos eléctricos en el año 1996 (Barbosa-Cánovas et al., 2001). Los estudios se llevan a cabo en laboratorios y en plantas piloto. Los PEAI deberían ser considerados para la incorporación a los procesos industriales ya existentes, por ejemplo, para reemplazar operaciones térmicas del tipo pasteurizaciones por PEAI o podría conseguirse una combinación de ambas técnicas. La mayor limitación de los pulsos se encuentra a nivel industrial por la velocidad de procesado. Actualmente los

aparatos de pulsos pueden procesar aproximadamente 1800 L/h, mientras que la industria está demandando procesar 10.000 L/h. El capital de inversión y los costes que conllevaría esta adaptación está también limitando la introducción de los PEAI en los procesos industriales, a pesar de las mejores ventajas sobre el producto que su uso supone (Barbosa-Cánovas et al., 2001).

La pasteurización tradicional por calor produce la inactivación de la PME y por tanto previene de la desestabilización de la “nube”. La inactivación térmica de la PME ha sido motivo de estudio en numerosos trabajos (Wicker et al., 1988; Cameron & Grohmann, 1996; Castaldo et al., 1997; Chen & Wu, 1998; Van den Broeck et al., 1999). Debido a que la PME es más resistente al calor que los microorganismos alteradores más comunes, el estudio de inactivación de la misma se utiliza generalmente para determinar la intensidad del tratamiento térmico durante la pasteurización comercial. A pesar de que la pasteurización a 90°C durante 1 min puede inactivar los tipos de PME más tolerantes al calor, reduce también la frescura del zumo afectando a las características sensoriales y nutricionales del mismo. De ahí que los pulsos eléctricos de alta intensidad se ofrezcan como una alternativa a dicho tratamiento.

El ácido ascórbico es una vitamina muy lábil sensible a la luz, el oxígeno, el calor, etc. (Saguy et al., 1978), por ello las altas temperaturas durante el procesado y el almacenamiento causan sensibles pérdidas del mismo (Nagy & Smoot, 1977). Los zumos pasteurizados por calor tienen una menor concentración de ácido ascórbico que aquellos tratados mediante pulsos durante el almacenamiento a 4°C, si bien es cierto que no se han observado diferencias significativas entre ambos tratamientos cuando el almacenamiento se produce a 22°C (Yeom et al., 2000<sup>b</sup>).

La degradación del ácido ascórbico se produce por dos posibles mecanismos, los oxidativos y los no oxidativos (Varsel, 1980). El oxígeno atmosférico es responsable de muchas de las pérdidas de vitamina C durante el almacenamiento y muchos envases de tipo polimérico son capaces de dejar pasar el oxígeno atmosférico (Kimball, 1991). El envasado aséptico en envases poliméricos mostró una degradación rápida del ácido ascórbico independientemente de los métodos de procesado. La mayor retención de ácido ascórbico en los zumos tratados por PEAI fue hallada para los zumos envasados en botellas de vidrio y PET por Ayhan et al. (2000).

Cortés et al. (2005) estudiaron el efecto del tratamiento por PEAI sobre la calidad de la horchata de chufa. Para ello determinaron el pH, grasa total, índice de peróxidos, índice de TBARS (sustancias reactivas al tiobarbitúrico), índice de formol y actividad peroxidásica en horchata natural y horchata tratada por PEAI, así como su estabilidad durante su almacenamiento (2-4°C). Después del tratamiento por PEAI, sólo la actividad de la peroxidasa disminuye significativamente.

Yeom et al. (2000<sup>b</sup>) observaron que los zumos tratados mediante PEAI contenían partículas de menor tamaño que aquellos tratados por calor. Además no existían diferencias significativas entre el zumo control y los zumos tratados por pulsos. El calor produce la coagulación de los coloides en suspensión en los zumos de fruta (Joslyn, 1961), como se sabe estas partículas en suspensión en el zumo de naranja dan textura al zumo y contribuyen a sus características sensoriales. Los parámetros °Brix y pH no se ven afectados por el tratamiento por PEAI y se mantienen a lo largo del almacenamiento tanto a 4°C como a 22°C.

El uso de PEAI puede reducir el uso de la energía empleada en el tratamiento comparado con los procesos térmicos, puesto que menos energía se convierte en calor, reduciendo también los cambios perjudiciales en las propiedades físicas y sensoriales de los alimentos.

Los factores que afectan a la inactivación microbiana en los tratamientos por pulsos son: factores del proceso (intensidad del campo eléctrico, amplitud del pulso, tiempo de tratamiento y temperatura y el tipo de onda de los pulsos), los factores de identidad microbianos (tipo, concentración y periodos de crecimiento de los microorganismos) y factores del medio (pH, componentes antimicrobianos e iónicos, conductividad y fuerza iónica del medio).

## **1.4.- MÉTODOS DE ANÁLISIS**

### **1.4.1.- CAROTENOIDES**

La determinación de la composición completa de carotenoides es complicada, costosa y árdua (Kimura & Rodríguez-Amaya, 2002).

La aplicación de los distintos tratamientos industriales puede provocar la formación de isómeros (*cis*) que no tienen la misma actividad vitamínica y la formación de nuevos compuestos. Por lo que cuando se desarrolla un nuevo producto es necesario conocer su valor nutritivo y comprobar sus posibles modificaciones al aplicar un proceso de conservación.

De la revisión bibliográfica realizada se concluye que de todas las técnicas analíticas empleadas en el análisis de carotenoides la única que permite identificar y cuantificar el mayor número de carotenoides en alimentos es la cromatografía líquida. La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) está considerada como el método de elección para la separación, identificación y cuantificación de carotenoides presentes en tejidos biológicos (Bushway, 1986; Barua et al., 1993; Van Breemen et al., 1993; Chen et al., 1996; Emenhiser et al., 1996; Kidmose et al., 2001; Sio (de) et al., 2001; Ancos (de) et al., 2002; Humphries & Khachik, 2003; Mendes-Pinto et al., 2004). La mejor separación de carotenoides se ha logrado con columnas C<sub>18</sub> (Bushway, 1986; Cano, 1991; Biacs et al., 1993; Chen & Chen, 1993; Cano & Ancos (de), 1994; Cano et al., 1996<sup>a</sup>; Emenhiser et al., 1996). Las razones para elegir el empaquetado C<sub>18</sub> incluyen: compatibilidad con muchos disolventes, su utilidad para el rango entero de polaridad de los carotenoides, y una amplia disponibilidad comercial. La buena separación de los isómeros geométricos de los carotenoides por las fases poliméricas de C<sub>18</sub> es evidente (Craft et al., 1990; Jinno & Lin, 1995). Muchos autores han usado una columna polimérica C<sub>18</sub> de 5 µm, Vydac 201TP54 (Saleh & Tan, 1991; Chen & Chen, 1994; Chen et al., 1995; Chen et al., 1996; Konings & Roomans, 1997; Ben-Amotz & Fishler, 1998; Pupin et al., 1999). Históricamente, la eficiencia de la separación ha sido mejorada usando un tamaño de partículas más pequeño, cambiando la forma de las partículas desde irregular a esféricas, asegurando un tamaño de partícula uniforme y por

tanto fabricando columnas más reproducibles. Las ventajas de un tamaño de partícula menor comprenden una elevada eficiencia y un bajo consumo de disolventes porque se usan columnas más cortas. Los inconvenientes son la disminución en la vida de la columna como resultado de la obstrucción y una alta presión. El aumento de la presión se puede reducir filtrando convenientemente las muestras y usando precolumnas. El recubrimiento de la fase estacionaria no beneficia la separación de las xantofilas, y en consecuencia no es recomendable para la determinación de los carotenoides (Craft et al., 1990; Chen et al., 1995; Pupin et al., 1999).

El máximo de absorción en los carotenoides depende del número de dobles enlaces conjugados y se encuentra en la región entre 400-500 nm. Su espectro UV-vis es característico y puede usarse para la identificación de un carotenoide concreto. Los isómeros *cis* muestran una banda de absorción adicional alrededor de 320-360 nm. La intensidad de estas bandas depende de la localización del enlace *cis* dentro de la molécula y es muy fuerte cuando el enlace *cis* se encuentra en el centro de la molécula. Es débil o incluso inexistente cuando el doble enlace *cis* se localiza hacia el final de la molécula (Van den Berg et al., 2000).

La utilización del detector fotodiodo-array en la identificación de los carotenoides por cromatografía líquida es una herramienta valiosa para la caracterización de los isómeros *cis* y *trans* en los zumos de cítricos y vegetales (Khachik et al., 1989; Chen & Chen, 1993; Rouseff et al., 1996; Kimura & Rodríguez-Amaya, 2002).

#### **1.4.2.- VITAMINA C**

Tras la revisión bibliográfica realizada, los métodos más frecuentemente utilizados para la determinación de la vitamina C son:

1.- Métodos volumétricos: basados en el poder reductor del ácido ascórbico sobre los distintos reactivos usados en la valoración, entre los más utilizados se halla el 2,6-diclorofenolindofenol (International Organization for Standardization, 1984; Rohle & Voigt, 1984; A.O.A.C., 1990).

2.- Métodos espectrofotométricos: se diferencian entre los que usan un indicador rédox en su forma oxidada y los que incluyen la formación de un cromóforo por derivatización, como por ejemplo las reacciones con 2,4-dinitrofenilhidrazina (Tee et al., 1988).

3.- Métodos fluorimétricos: basados en la medida de la fluorescencia del compuesto formado por la reacción entre el ácido dehidroascórbico y la o-fenilendiamina (Peinado et al., 1987; A.O.A.C., 1990). Se han propuesto distintos procedimientos para la oxidación del ácido ascórbico a dehidroascórbico, como por ejemplo el de Nie y Peng (1984) que utilizan el 2,6-diclorofenolindofenol, y el de Davies et al. (1991) que proponen la adición de EDTA, para eliminar la interferencia del hierro II.

4.- Métodos cromatográficos: la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) es en la actualidad la más utilizada para la determinación del ácido ascórbico, dehidroascórbico e isoascórbico, el tipo de soporte más habitual es el aminado, y la fase móvil más frecuente es una mezcla de disolución de fosfato o citrato con un disolvente orgánico. El tipo de detector más utilizado es el UV (de 247 a 290 nm) (Kissinger & Pachla, 1987; Kishida et al., 1992; Benloch et al., 1993).

5.- Métodos electroquímicos: entre ellos cabe mencionar la voltametría y dentro de ésta la polarografía (Ruiz et al., 1977; Lau et al., 1985; Roca de Togores, 1988; Aparicio et al., 1992). Los métodos polarográficos se han utilizado para determinar el ácido ascórbico en alimentos sólidos y líquidos. Kozar et al. (1988) demostraron que para algunos tipos de frutas frescas o procesadas, por ejemplo los cítricos y las grosellas, la vitamina C podía ser fácilmente determinada por polarografía diferencial de impulsos (DPP). Esteve et al. (1995<sup>a</sup>, 1995<sup>b</sup>) aplicaron esta técnica para determinar ácido ascórbico en espárragos y fórmulas infantiles.

6.- Otros métodos: como los enzimáticos y turbidimétricos son poco utilizados.

De todos ellos, se eligen los cromatográficos aunque conllevan mucho tiempo para la preparación de la muestra y la precisión del método depende del detector empleado, y los polarográficos, siendo estos últimos los seleccionados en este trabajo por su sensibilidad, precisión, exactitud y reproducibilidad.

# **OBJETIVOS**



## **2.- OBJETIVOS**

El consumo de frutas y vegetales es indispensable para proporcionar una dieta variada y equilibrada. A nivel de todas las administraciones se está fomentando el consumo de frutas y vegetales. La OMS, expertos en nutrición y sociedades afines estiman que el consumo recomendado es de 400 g o superior, cantidad que asegura el consumo mínimo de compuestos bioactivos de origen vegetal con efectos beneficiosos para la salud.

Si bien las frutas y vegetales se consumen generalmente frescas, un gran número de ellas han de ser procesadas y/o conservadas. Los zumos de frutas y vegetales y productos derivados, como néctares y bebidas han experimentado un gran crecimiento en los últimos años.

En la actualidad, investigadores y tecnólogos de alimentos están realizando un gran esfuerzo para asegurar que los compuestos fitoquímicos o bioactivos presentes en los alimentos de origen vegetal se mantengan o modifiquen mínimamente durante el tratamiento y almacenamiento, conservando su valor nutricional y sus propiedades beneficiosas para la salud. Entre estos compuestos bioactivos destacan por su gran poder antioxidante la vitamina C y los carotenoides.

El OBJETIVO GENERAL del presente trabajo es la determinación del contenido de vitamina C y carotenoides en frutos cítricos y productos derivados como zumos y néctares obtenidos por tratamiento térmico convencional y por una nueva tecnología no térmica, los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad.

Para alcanzar este objetivo general se plantean los siguientes OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterización del zumo de las tres variedades de mandarinas (*Citrus reticulata*) de mayor producción.
- Caracterización del zumo de las tres variedades de naranja (*Citrus sinensis*) de mayor producción.
- Caracterización de los zumos y néctares de naranja comercializados.
- Evaluación de la influencia sobre la vitamina C y carotenoides (compuestos bioactivos) del tratamiento térmico y de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad en un zumo mezcla de naranja-zanahoria.
- Estimación de la vida útil del zumo de naranja-zanahoria pasteurizado y tratado por PEAI.

# **PLAN DE TRABAJO**



### **3.- PLAN DE TRABAJO**

Para la consecución de los objetivos del trabajo se propone el siguiente PLAN DE TRABAJO:

- Puesta a punto y validación de un método cromatográfico para la identificación y cuantificación de carotenoides y sus isómeros.
- Puesta a punto y validación de un método polarográfico para la determinación de vitamina C.
- Caracterización del zumo de tres variedades de mandarina (clemenules, clemenvilla y fortuna) y tres variedades de naranja (navel, navelina y navel-lane). Modificaciones que se producen durante las fechas de recolección y durante el almacenamiento.
- Caracterización de los zumos y néctares de naranja, exprimidos y a base de concentrado, comercializados en España.
- Elaboración de un zumo mezcla de naranja-zanahoria:
  - Influencia del tratamiento de pasteurización.
  - Influencia del tratamiento por PEAI.
- Estimación de la vida útil del zumo de naranja-zanahoria:
  - Almacenamiento a 2°C.
  - Almacenamiento a 10°C.
- Evolución de los compuestos bioactivos en el zumo mezcla de naranja-zanahoria fresco almacenado a -40°C.



**PARTE**  
**EXPERIMENTAL**



## **4.- PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1.- MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE CAROTENOIDES**

En este trabajo se pone a punto y se valida un método de determinación por cromatografía líquida de los distintos carotenoides (*trans* y *cis*) en zumo mezcla de naranja-zanahoria y en zumo de naranja, frescos, para poder de esta manera evaluar su calidad nutritiva.

#### **4.1.1.- SELECCIÓN, PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO**

##### ***4.1.1.1.- Reactivos***

$\beta$ -caroteno, all trans palmitato de retinol, 15-cis- $\beta$ -caroteno, sudán I y terbutil-hidroxitolueno (BHT) (calidad para análisis) de Sigma (Steinheim, Alemania). Cantaxantina, luteína y zeaxantina fueron cedidos gratuitamente por Hoffman La Roche (Basel, Suiza). Acetato amónico (calidad HPLC), éter de petróleo, hexano (calidad HPLC), hidróxido potásico (85%) y terbutil-metil-éter (TBME) (calidad HPLC) de Scharlau (Barcelona, España), acetonitrilo (calidad para análisis), hidroxicarbonato magnésico (40-45%) de Panreac (Barcelona, España), etanol, dietil éter, metanol y cloruro sódico (calidad para análisis) de Baker (Deventer, Holanda), cloroformo de Merck (Darmstadt, Alemania).  $\beta$ -apo-8'-carotenal (*trans*) de Fluka (Steinheim, Alemania).

##### ***4.1.1.2.- Preparación de las Muestras***

El proceso general de manufacturado del zumo de naranja fue el siguiente: después de un adecuado lavado e higienización de las frutas, éstas se someten a un proceso de extracción (el zumo se filtra con un filtro de diámetro de poro de 2 mm), y el zumo obtenido se introduce en el interior de un tanque.

Para obtener el zumo de zanahoria, las zanahorias se lavan primero con una solución de hidróxido sódico y después con agua potable, a continuación se exprimen y el zumo que se obtiene se tamiza. El zumo mezcla de naranja-zanahoria tiene la siguiente proporción: naranja-zanahoria, 80:20 (v/v), se envasa asépticamente y congela a  $-40^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis. Se elige la congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$  ya que en estudios previos se había comprobado que el contenido de ácido ascórbico en muestras de espárragos verdes no variaba (Esteve et al., 1995<sup>c</sup>).

#### ***4.1.1.3.- Preparación de Soluciones Estándar de Patrones***

Para preparar la disolución “madre” se pesan 12.5 mg de  $\beta$ -caroteno, 4 mg de luteína, 5.2 mg de zeaxantina y 35 mg de palmitato de retinol, y se disuelven en 25 mL de cloroformo con BHT al 0.1% (p/v). Se conservan en frascos topacio, en atmósfera de  $\text{N}_2$ , en refrigeración ( $2^{\circ}\text{C}$ ) y oscuridad, durante un mes.

La concentración exacta de cada uno de los patrones se comprueba periódicamente mediante su coeficiente de extinción. Para ello se toman 100  $\mu\text{l}$  de la disolución madre de  $\beta$ -caroteno, de luteína, de zeaxantina y de palmitato de retinol, se evaporan con  $\text{N}_2$  y se redisuelve cada uno de ellos con 10 mL del disolvente adecuado (véase cuadro n<sup>o</sup> 6) para su posterior medida espectrofotométrica, previa filtración de la disolución (Hart & Scott, 1995).

Disolución de trabajo: se prepara diariamente a partir de la disolución madre de cada uno de los patrones, para ello se toman 25, 150, 90 y 100  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina y palmitato de retinol, respectivamente, se evapora el cloroformo y se redisuelve con 1 mL de metanol:TBME (70:30, v/v). Se calcula la concentración en la solución estándar patrón tras aplicar la ecuación:

$$C (\mu\text{g/mL}) = A \cdot 10^6 / E^{1\%},$$

Donde: C es concentración, A absorbancia y  $E^{1\%}$  es el coeficiente de extinción.

Cuadro nº 6. Coeficientes de extinción de algunos patrones.

Compuesto	Disolvente	$\lambda$ (nm)	$E^{1\%}$
Luteína	Etanol	445	2550
Zeaxantina	Etanol	452	2480
$\beta$ -caroteno	Etanol	453	2620
Palmitato de Retinol	Etanol	328	975

#### 4.1.1.4.- Selección del Patrón Interno

La incorporación de un patrón interno está altamente recomendada, ya que es esencial para la cuantificación de los carotenoides puesto que durante el proceso de preparación de la muestra (extracción, saponificación y evaporación) pueden producirse pérdidas. Un patrón interno adecuado no debe encontrarse en la muestra a determinar, debe tener una estructura similar y, por tanto, un comportamiento parecido al compuesto que se desea determinar y no debe aparecer a un tiempo de retención que pueda interferir con otros componentes presentes en la muestra.

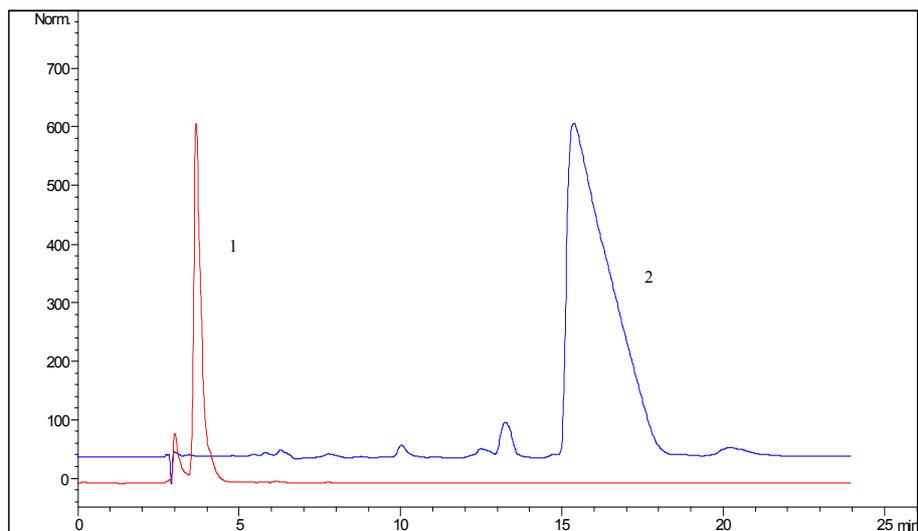
Se prueban diversos compuestos como patrón interno:  $\beta$ -apo-8'-carotenal (*trans*) (Noga & Lenz, 1983; Marx et al., 2000), que se descarta por encontrarse en la corteza de la naranja y por tanto cabía la posibilidad de encontrarlo en los zumos de naranja; sudán I (Cano et al., 1996<sup>b</sup>; Pupin et al., 1999), que se descarta por no tener una estructura similar a los carotenoides y *all-trans*-palmitato de retinol (Granado et al., 1992; Olmedilla et al., 1992; Oliver & Palou, 2000).

Otros posibles patrones internos como la cantaxantina, el licopeno o el 15-*cis*- $\beta$ -caroteno (figura nº 2), que han sido utilizados por diferentes autores, interfieren con algunos carotenoides y además cabe la posibilidad de encontrarlos en los zumos de naranja por lo que se descartan.

Se selecciona como patrón interno el palmitato de retinol, el cual también sirve para indicar si la saponificación es completa, debido a que se transforma en retinol, que

aparece a tiempos de retención mucho más bajos (Oliver & Palou, 2000) (ver figura nº 6).

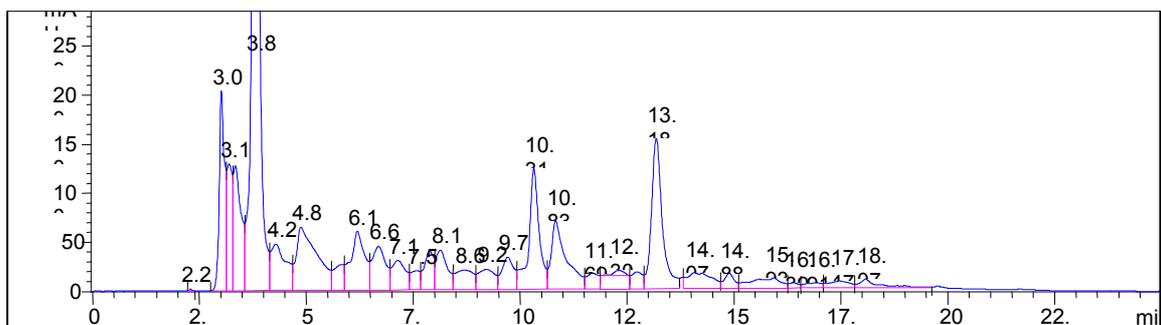
Figura nº 6. Identificación del patrón interno (palmitato de retinol) en patrones saponificados (1) e insaponificados (2) ( $\lambda=350.8$  nm).



A continuación, en la figura nº 7 se muestran los cromatogramas de un zumo de naranja saponificado y en una mezcla de patrones sin saponificar ( $\lambda = 350.8$  nm), en el que se puede identificar el patrón interno (palmitato de retinol).

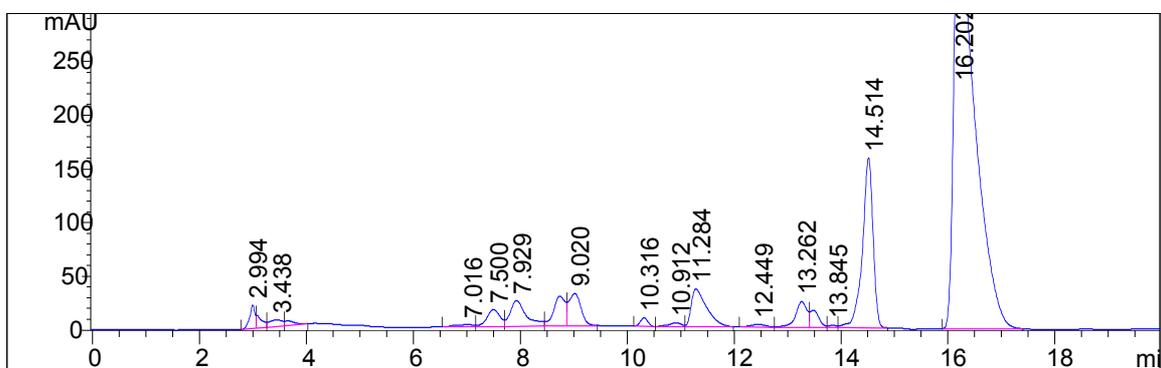
Figura nº 7. Identificación del patrón interno (palmitato de retinol) en un zumo de naranja saponificado (A) y en una mezcla de patrones sin saponificar (B) ( $\lambda=350.8$  nm).

(A)



$t_R=3.812$  min, PI saponificado.

(B)



$t_R=16.202$  min, PI sin saponificar.

#### 4.1.1.5.- Instrumentación

- Cromatógrafo: Hewlett-Packard, 1050 series, con sistema de bomba cuaternario.
- Detector fotodiodo-array, Hewlett-Packard DAD, 1100 series.
- Software HP Chemstation-A.06.03.
- Termostatazador de columna (Agilent 1100 series).

- Columna VYDAC 201TP54 (250 mm · 4.6 mm Ø, empaquetado con partículas de 5 µm, Hesperia, California, EE.UU.), C<sub>18</sub> de fase reversa.
- Precolumna (guard column): VYDAC 201TP (4.6 mm Ø, cartucho con partículas de 5 µm, Hesperia, California, EE.UU.).
- Volumen de inyección: 20 µl.

#### **4.1.1.6.- Extracción y Saponificación de los Carotenoides**

La saponificación de los extractos de carotenoides es necesaria para eliminar grasas neutras, clorofilas y derivados clorofílicos, que interfieren en el ensayo espectrofotométrico de los carotenoides y liberan xantofilas esterificadas (O'Neil & Schwartz, 1992; Lesellier et al., 1993).

La saponificación se emplea para evaluar la presencia de ésteres de carotenoides, puesto que la saponificación de carotenoides esterificados con ácidos grasos da lugar a sus derivados hidroxicarotenoides, simplificando mucho el perfil del cromatograma (Cano et al., 1996<sup>b</sup>), con una pérdida considerable de xantofilas (Cano & Ancos (de), 1994).

Los carotenoides son liposolubles pero la gran cantidad de agua en los tejidos de las plantas, hace necesaria una extracción preliminar con disolventes miscibles con agua. El metanol suele usarse como un extractante inicial (O'Neil & Schwartz, 1992). Los disolventes inmiscibles en agua pueden usarse después de que la muestra sea deshidratada, sin embargo se ha encontrado que los extractantes más eficientes están compuestos por una mezcla de un disolvente ligeramente polar junto con un disolvente apolar (Ritter (de) & Purcell, 1981).

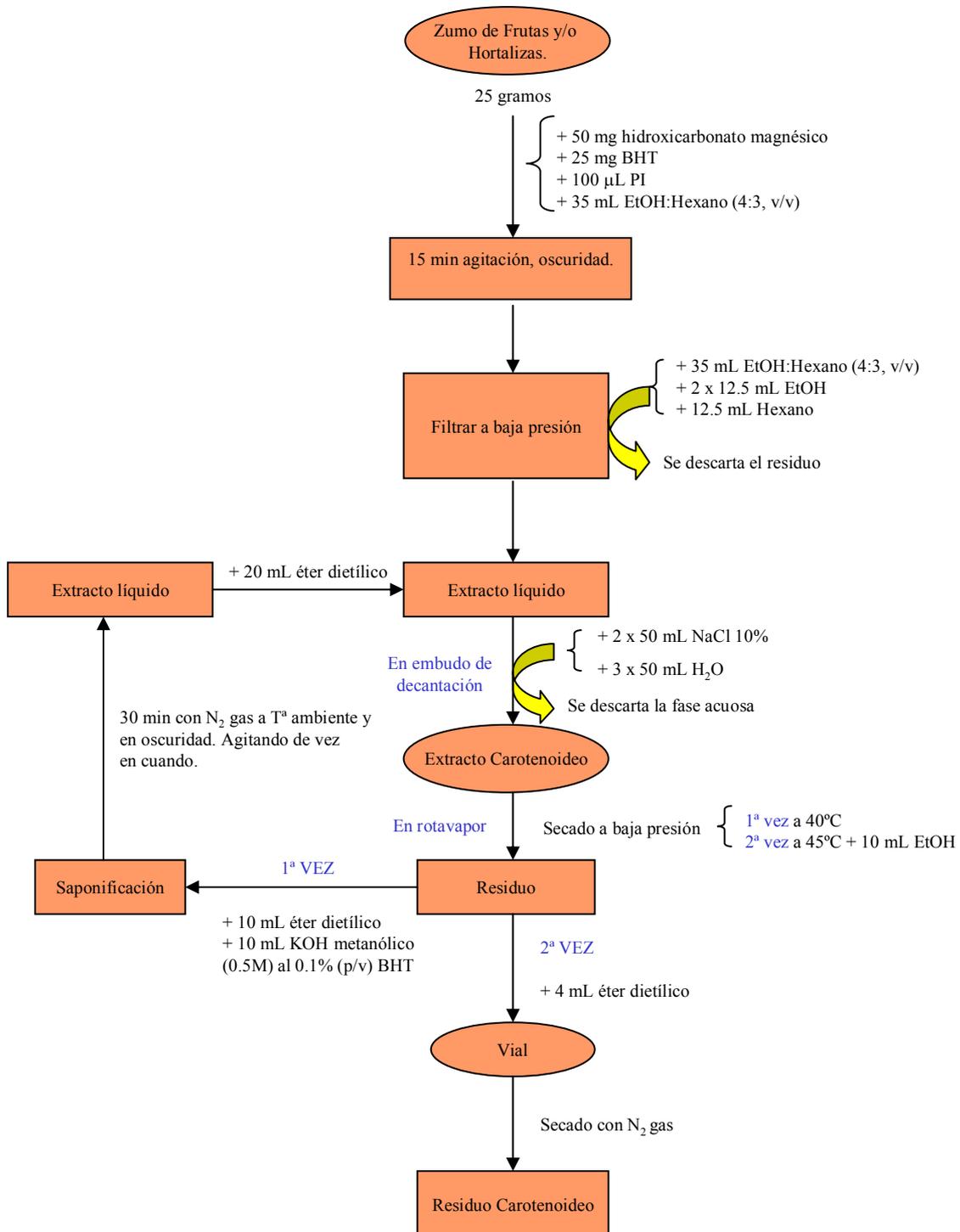
Al aplicar la extracción y posterior saponificación propuesta por Rouseff et al. (1996) se observa la separación de distintos picos cromatográficos, identificando claramente el β-caroteno, aunque existe una derivación de la línea base. Para subsanar este inconveniente se elige el método de extracción propuesto por Taungbodhitham et al. (1998). Estos autores parten de 2 g de zumo al que añaden hidroxicarbonato magnésico y extraen con etanol y hexano, y no saponifican la muestra, observándose únicamente cuatro picos cromatográficos. Por lo que se modifica el método. Se aumenta

el tamaño de muestra a 25 g de zumo, se le añade BHT (0.1%, p/v), 100 µl patrón interno, 0.05 g de hidroxicarbonato magnésico y 35 mL de etanol/hexano (4:3, v/v). Se estudian varios tiempos de agitación (5, 15 y 30 min) obteniendo los mejores resultados con un tiempo de 15 min (bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y protegido de la luz) y se filtra a vacío. El residuo se lava con 35 mL de etanol/hexano (4:3, v/v), y se filtra. El filtrado se lava 2 veces con 12.5 mL de etanol y finalmente con 12.5 mL de hexano (hasta no tener color). Se unen todos los líquidos de filtrado y se lavan 2 veces con 50 mL de NaCl 10% en embudo de decantación topacio y posteriormente con 50 mL de agua (3 veces). La fase orgánica se evapora a 40°C en un rotavapor (Eyela NE-1) y el residuo se redissuelve con 1.5 mL de fase móvil. El cromatograma obtenido en estas condiciones presenta numerosos picos cromatográficos pero la resolución no es buena, puesto que la línea base no se recupera. Para subsanar este inconveniente se decide saponificar el residuo obtenido anteriormente al evaporar la fase orgánica en el rotavapor a 40°C. Saponificamos el residuo obtenido y variamos los volúmenes de éter dietílico utilizados (5, 10 y 15 mL) y de KOH metanólico (5, 10 y 15 mL) añadidos para la saponificación, comprobando que la saponificación varía con el tipo de zumo (naranja-zanahoria, naranja común, etc.). Finalmente, se decide añadir 10 mL de éter dietílico y 10 mL de KOH metanólico (0.5 M) con 0.1% de BHT (p/v) dejándolo durante toda la noche a temperatura ambiente protegido de la luz. Para evitar posibles alteraciones (oxidaciones) y reducir el tiempo de saponificación, se estudiaron distintos tiempos de saponificación: 0.5, 1, 3 y 24 h. Se verificó que la saponificación era completa después de 30 min, siendo éste el tiempo seleccionado. Se realiza la saponificación en atmósfera inerte (N<sub>2</sub>). Algunos autores emplean 2, 3, 5 y 6 horas (Konings & Roomans, 1997; Khachik & Beecher, 1988; O'Neil et al., 1991 y Khachik et al., 1988, respectivamente) para llevar a cabo el proceso de saponificación en la oscuridad a temperatura ambiente. Otros autores emplean más de 12 horas (Matus et al., 1991; Chen & Chen, 1994; Jinno & Lin, 1995; Rouseff et al., 1996; Mercadante et al., 1998; Mouly et al., 1999<sup>b</sup>; Lee, 2001; Lee et al., 2001). Se comprueba que es suficiente con 30 min para realizar la saponificación, el mismo tiempo usado por Wingerath et al. (1996).

Pasado este tiempo, se añaden 20 mL de éter etílico y se extrae dos veces con 50 mL de NaCl 10% (p/v). La fase etérea se lava tres veces con 50 mL de H<sub>2</sub>O hasta

obtener un pH neutro. Se filtra en presencia de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, sin embargo se observa que en algunas muestras en la fase etérea quedan restos de agua, por lo que para asegurar que se elimina totalmente el agua se añaden 10 mL de etanol absoluto (después de comprobar diferentes volúmenes: 2, 5 y 10 mL), siendo necesario en algunas muestras añadir otros 5 mL para llegar a sequedad, evaporando a 45°C. El residuo se disuelve con 4 mL de éter dietílico y se pasa a un vial de vidrio topacio, evaporando el disolvente con  $\text{N}_2$  y conservando a  $-20^\circ\text{C}$  hasta el momento de la determinación cromatográfica (se ha comprobado que los resultados permanecen invariables hasta 4 días después de la extracción). En la figura nº 8 se muestra un esquema del proceso de extracción final.

Figura nº 8. Esquema de extracción de pigmentos carotenoides.



#### ***4.1.1.7.- Separación de Carotenoides. Gradiente de Fase Móvil***

En el momento de la inyección cromatográfica se reconstituye el extracto carotenoideo con 1 mL de MeOH-TBME (70:30, v/v).

Para seleccionar el gradiente de fase móvil es necesario tener en cuenta el hecho de que el disolvente principal sea levemente orgánico y tenga poca viscosidad, también que permita una buena solubilidad de los carotenoides y trabajar en condiciones de bajas presiones. Estos criterios limitan la elección al acetonitrilo y al metanol. Recientemente se ha descrito que el metanol proporciona mayores recuperaciones de carotenoides que el acetonitrilo, y además tiene un menor coste y toxicidad (Craft, 1992; Epler et al., 1993).

En primer lugar se elige metanol, al que se le añade acetato amónico a diferentes concentraciones (0.05, 0.1 y 0.2 M) que permite la estabilización de la línea base (Hart & Scott, 1995), obteniendo los mejores resultados con una concentración de 0.1 M, ya que existe una creciente mejora en la separación de los diferentes picos cromatográficos a la vez que una mayor recuperación de éstos. Por la bibliografía se conoce que los carotenoides sufren pérdidas o degradaciones en la columna. La adición de acetato amónico al metanol usado en la fase móvil incrementa y mejora la recuperación de la zeaxantina y de una mezcla de carotenoides cuando se usan columnas C<sub>18</sub> (Epler et al., 1993; Emenhiser et al., 1996).

El TBME favorece la elución de los compuestos más apolares, por lo que se introduce en los primeros minutos en pequeña proporción y se aumenta progresivamente hasta un 25% al final del cromatograma. Se observa que en los primeros minutos no se resuelven correctamente los picos cromatográficos, por lo que se opta por añadir un pequeño porcentaje de H<sub>2</sub>O en los primeros 10 minutos, teniendo la precaución de no tener a la vez agua y TBME (para evitar la formación de pequeñas burbujas). Finalmente se elige introducir un 5% de agua con un 95% de metanol durante los 3 primeros minutos, y a partir de este tiempo se elimina el agua y se eluye con metanol. A continuación, se va introduciendo TBME aumentado progresivamente el mismo hasta un 25% en el minuto quince a partir del cual se disminuye para tener un

100% de metanol al final del cromatograma. En el cuadro nº 7 se muestra el gradiente de fase móvil elegido.

Cuadro nº 7. Gradiente de fase móvil para la determinación de carotenoides por CLAR.

Tiempo (min)	MeOH + AA (%)	H <sub>2</sub> O (%)	TBME (%)
0	95	5	0
3	100	0	0
5	95	0	5
10	86	0	14
15	75	0	25
22	95	0	5
23	100	0	0

AA: Acetato amónico 0.1M

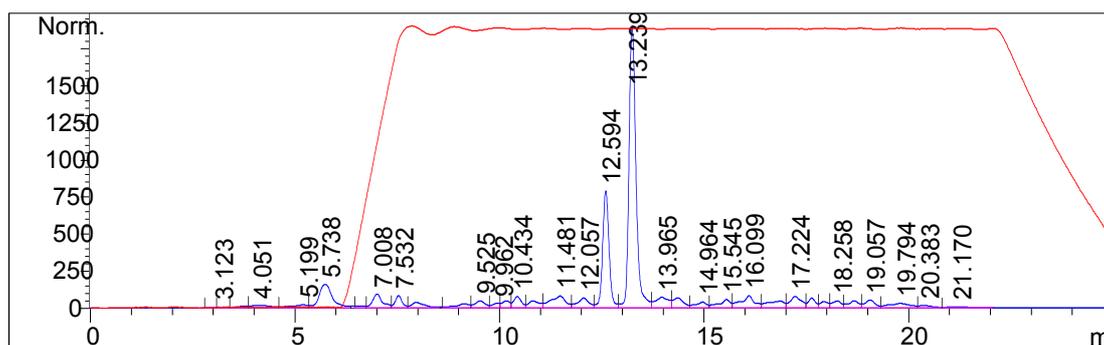
La influencia que ejerce la temperatura ambiental en la elución de los carotenoides se estandariza con la elección de un gradiente de temperatura (0 min, 20°C; 6 min, 30°C; 22 min, 20°C). Algunos autores utilizan columnas termostalizadas con temperaturas de 20 a 40°C (Scott & Hart, 1993; Müller, 1997; Mouly et al., 1999<sup>a</sup>; Pupin et al., 1999; Burns et al., 2003; Lee, 2001), sin embargo con temperaturas superiores a 40 °C, la separación del  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno es peor, observándose una curvatura alrededor de 40°C, motivado por un cambio de la fase estacionaria polimérica ODS del estado sólido al líquido (Jinno & Lin, 1995). En las figuras nº 9 y 10 se pueden observar los cromatogramas obtenidos al aplicar el método puesto a punto para la separación de carotenoides en zumos mezcla de naranja-zanahoria y en zumos de naranja. Los tiempos de retención y las longitudes de onda se muestran en el cuadro nº 8.

Cuadro nº 8. Longitudes de onda y tiempos de retención de un zumo mezcla de naranja-zanahoria y de un zumo de naranja.

Pico	Carotenoides	$\lambda$ (nm)	$t_R$ (min) $\pm\sigma$	
			naranja-zanahoria	naranja
1	Valencixantina	430	3.78 $\pm$ 0.01	3.86 $\pm$ 0.03
2	9-cis-violaxantina+ neoxantina	430	5.75 $\pm$ 0.04	5.88 $\pm$ 0.06
3	cis-Anteraxantina	430	-	6.46 $\pm$ 0.04
4	Anteraxantina	450	7.01 $\pm$ 0.03	7.13 $\pm$ 0.05
5	Mutatoxantina	430	7.20 $\pm$ 0.01	-
6	Luteína	450	7.54 $\pm$ 0.02	7.71 $\pm$ 0.05
7	Zeaxantina	450	7.96 $\pm$ 0.04	8.23 $\pm$ 0.08
8	$\alpha$ -Criptoxantina	450	9.53 $\pm$ 0.03	9.61 $\pm$ 0.06
9	$\beta$ -Criptoxantina	450	10.45 $\pm$ 0.04	10.49 $\pm$ 0.05
10	9-cis- $\alpha$ -Caroteno	430	12.06 $\pm$ 0.04	12.12 $\pm$ 0.05
11	$\alpha$ -Caroteno	450	12.63 $\pm$ 0.03	12.89 $\pm$ 0.03
12	Fitoeno + Fitoflueno	290	13.06 $\pm$ 0.02	13.44 $\pm$ 0.03
13	$\beta$ -Caroteno	450	13.28 $\pm$ 0.03	13.57 $\pm$ 0.03
14	$\zeta$ -caroteno	430	14.28 $\pm$ 0.04	-
15	9-cis- $\beta$ -Caroteno	450	-	13.77 $\pm$ 0.04

Figura nº 9. Cromatograma de zumo mezcla de naranja-zanahoria a  $\lambda=450$  nm (A) y  $\lambda=350$  nm (B).

(A)



(B)

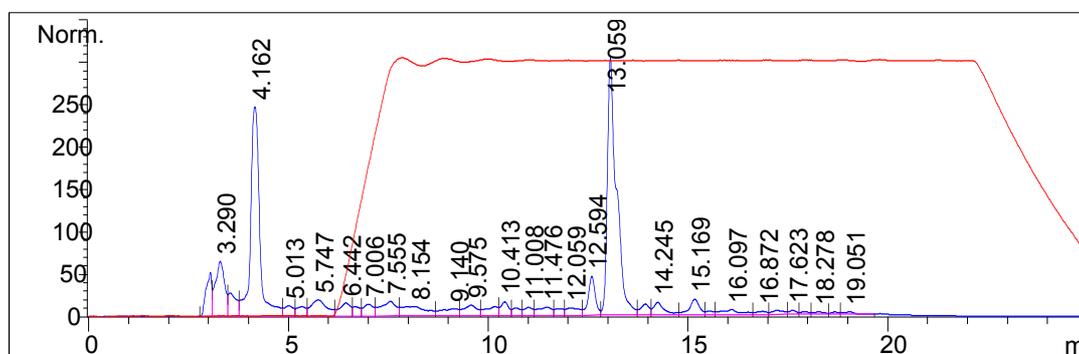
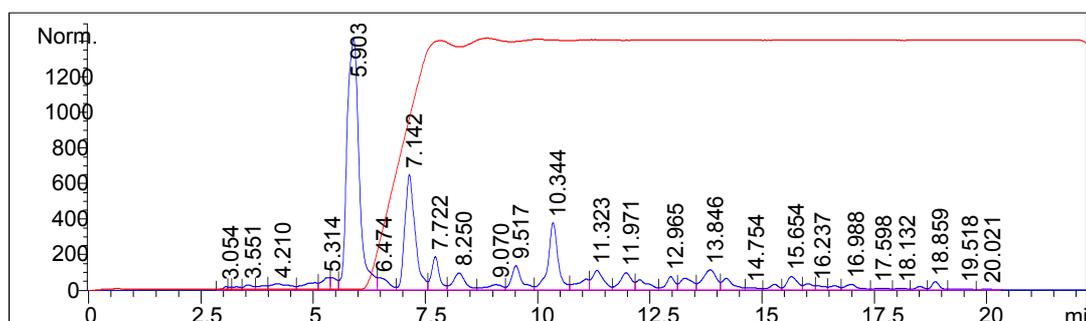
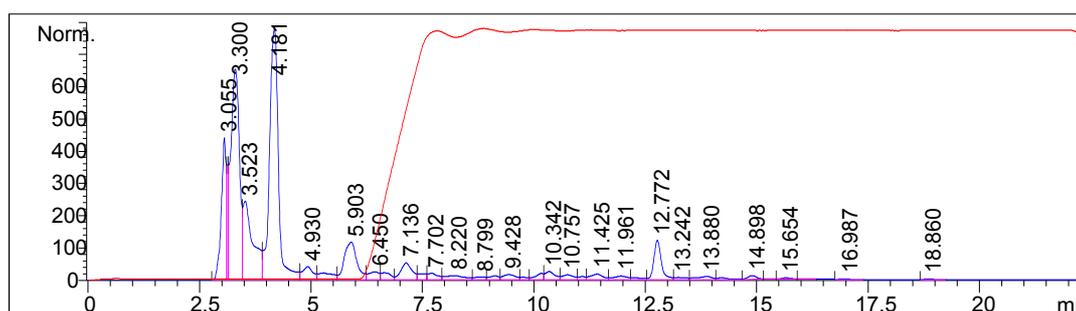


Figura nº 10. Cromatograma de zumo de naranja a  $\lambda=450$  nm (A) y  $\lambda=350$  nm (B).

(A)



(B)



#### 4.1.1.8.- Identificación y Cuantificación de Carotenoides

Debido fundamentalmente a la falta de patrones comerciales de carotenoides, sobretodo de los isómeros *cis*, se ha recurrido a distintas técnicas de identificación que son usadas por muchos autores, entre las que destacan:

- Comparación de los espectros UV/vis y de las  $\lambda$  máximas de los carotenoides, lo cual indica indirectamente la mayor o menor conjugación entre sus enlaces, debido a que a mayor conjugación de los mismos, mayores son las  $\lambda$  máximas.
- La polaridad de los carotenoides, ya que al tratarse de cromatografía líquida en fase reversa los tiempos de retención se ordenan de mayor a menor polaridad.
- Diferentes parámetros para averiguar la estructura del espectro:

%III/II: porcentaje del cociente entre la banda III y la banda II (normalmente  $\lambda_{\text{máx}}$ ), cogiendo como línea base el valle entre ambas bandas. Se ha utilizado por: Britton, 1995; Mercadante et al., 1998; Psomiadou & Tsimidou, 1998; Lee, 2001; Lee et al., 2001.

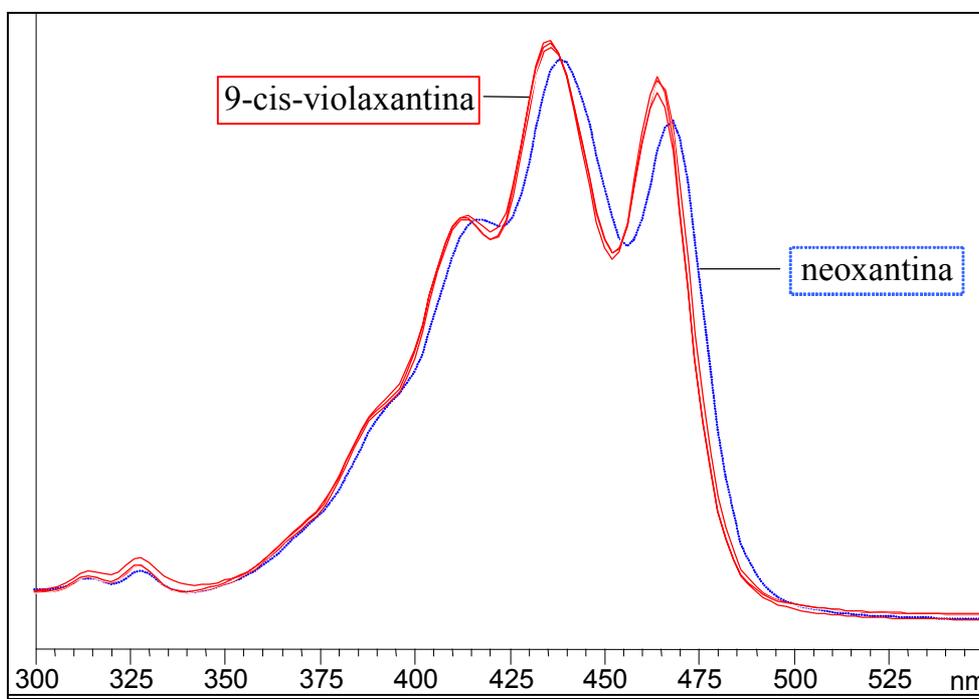
%D<sub>B</sub>/D<sub>II</sub>: porcentaje del cociente entre la banda del pico *cis* y la banda II (normalmente  $\lambda_{\text{máx}}$ ). Se ha utilizado para identificar los diferentes isómeros *cis* de los carotenoides: Craft, 1992; Epler et al., 1993; Britton, 1995; Hart & Scott, 1995; Rouseff et al., 1996; Taungbodhitham et al., 1998; Oliver & Palou, 2000.

Q ratio= D<sub>II<sub>máx</sub></sub>/D<sub>B</sub>: cociente entre la banda II (normalmente  $\lambda_{\text{máx}}$ ) y la banda del pico *cis*. Se ha utilizado para identificar los diferentes isómeros *cis* de los carotenoides: Tsukida et al., 1982; O'Neil et al., 1991; Saleh & Tan, 1991; Chen & Chen, 1994; Chen et al., 1995.

Con estas técnicas, se han podido identificar los carotenoides más característicos en los zumos de naranja y de naranja-zanahoria.

Luteína y zeaxantina (picos 6 y 7, respectivamente) presentan gran dificultad para su correcta resolución puesto que difieren solamente en la posición de un enlace simple en uno de los anillos terminales (ver figura nº 2) y algunos autores no pueden resolverlos (Noga & Lenz, 1983; Mouly et al., 1999<sup>a</sup>), sin embargo en las condiciones cromatográficas descritas se resuelven completamente. Por otra parte, la 9-*cis*-violaxantina no ha podido separarse completamente de la neoxantina (pico 2). La coelución de estos picos se debe a su similar estructura (figura nº 2) y características espectrales (cuadro nº 9). Los espectros de absorción de estos carotenoides incompletamente resueltos se muestran en la figura nº 11.

Figura nº 11. Espectro de absorbancia para la 9-cis-violaxantina y la neoxantina (pico 2) ( $\lambda=430$  nm).



El cuadro nº 9 muestra las características cromatográficas y espectrales de los carotenoides obtenidos en los zumos de naranja y naranja-zanahoria.

En el cuadro nº 10 se comparan las características cromatográficas y espectrales de los carotenoides del zumo de naranja obtenidos por otros autores.

Y en las figuras nº 12 y 13 se muestran los cromatogramas de zumo de naranja-zanahoria y de zumo de naranja con los carotenoides identificados.

La cuantificación de los diversos carotenoides identificados en las muestras estudiadas se ha realizado según su similitud en cuanto a comportamiento químico-estructural y polaridad respecto a los patrones validados de los que disponíamos de una curva de calibración: luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno. Así, para la cuantificación se ha procedido del siguiente modo:

- Todas las muestras llevan añadido palmitato de retinol (patrón interno). Se elige como su máximo de absorción 350 nm.

- Se ha separado el cromatograma en tres partes: todos los carotenoides hasta la luteína, incluida ésta, se han cuantificado como tal, y el resto de xantofilas se han cuantificado como zeaxantina. Los carotenos se han cuantificado como  $\beta$ -caroteno.

- Cada carotenoide se ha cuantificado según su  $\lambda$  máxima se aproximaba a 290, 350, 430 ó 450 nm. El contenido de cada carotenoide en  $\mu\text{g}/100$  g de muestra se ha determinado tras aplicar la siguiente ecuación:

$$(A_{\text{muestra}} / A_{\text{PI}}) \cdot \mu\text{g Patrón} \cdot 100 / (A_{\text{patrón}} / A_{\text{PI}}) \cdot \text{g muestra}$$

(PI= Patrón Interno).

Cuadro nº 9. Características cromatográficas y espectrales de los carotenoides en zumos de naranja y de mezcla naranja-zanahoria.

Picos	Carotenoides	$\lambda_{\text{cis}}$	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	Q ratio	%III/II
1	Valencixantina	-	372	392	414	1.49	51.4
2	9-cis-violaxantina	328	414	436	464	11.03	95.1
2	Neoxantina	-	414	436	464	11.00	79.7
3	cis-anteraxantina	330	(418)	438	464	2.14	22.2
4	Anteraxantina	-	420	442	468	10.50	52.9
5	Mutatoxantina	-	(404)	428	452	11.47	55.7
6	Luteína	-	(424)	444	470	5.90	54.6
7	Zeaxantina	-	(422)	444	472	10.08	31.0
8	$\alpha$ -criptoxantina	-	(416)	438	466	7.06	59.5
9	$\beta$ -criptoxantina	-	(430)	450	478	26.20	25.2
10	9-cis- $\alpha$ -caroteno	328	414	436	464	6.40	76.6
11	$\alpha$ -caroteno	-	424	446	474	27.07	55.6
12	Fitoeno	-	(276)	286	(298)	-	9.9
12	Fitoflueno	-	332	348	368	-	89
13	$\beta$ -caroteno	-	(424)	446	472	12.03	26.3
14	$\zeta$ -caroteno	-	380	400	426	14.70	96.2
15	9-cis- $\beta$ -caroteno	330	(422)	442	470	8.85	26.5

Cuadro nº 10. Características cromatográficas y espectrales de los carotenoides en zumos de naranja obtenidos por distintos autores.

<b>Carotenoides</b>	$\lambda_{cis}$	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	<b>Q ratio</b>	<b>%III/II</b>	<b>Referencias</b>
Valencixantina	-	351	369	389	-	-	Rouseff et al., 1996
9-cis-violaxantina	328	414	438	466	-	95.1-98	Khachik & Beecher, 1987 Philip et al., 1988 Britton, 1995 Lee et al., 2001
Neoxantina	-	415	437	465	-	80-85	Khachik & Beecher, 1987 Cheng & Yang, 1992 Britton, 1995
cis-anteraxantina	-	416	438	464	-	-	Mouly et al., 1999 <sup>a</sup>
Anteraxantina	-	421	443	471	-	52.4-60	Khachik & Beecher, 1987 Epler et al., 1993 Britton, 1995
Mutatoxantina	-	406	427	451	-	40.9-50	Khachik & Beecher, 1987 Britton, 1995 Rouseff et al., 1996
Luteína	-	(424)	444	470	11.5	50-60	Khachik & Beecher, 1987 Britton, 1995 Chen et al., 1995
Zeaxantina	-	424	449	477	-	26-31.2	Khachik & Beecher, 1987 Britton, 1995 Mouly et al., 1999 <sup>a</sup>
$\alpha$ -criptoxantina	-	421	443	471	-	60	Britton, 1995 Mouly et al., 1999 <sup>a</sup>
$\beta$ -criptoxantina	-	429	450	477	-	27-28.8	Khachik & Beecher, 1987 Britton, 1995 Rouseff et al., 1996
9-cis- $\alpha$ -caroteno	-	421	442	468	8.3	-	Chen et al., 1995
$\alpha$ -caroteno	-	424	445	473	-	55	Britton, 1995 Rouseff et al., 1996
Fitoeno	-	277	287	298	-	-	Simpson et al., 1985 Khachik & Beecher, 1987
Fitoflueno	-	333	347	367	-	-	Khachik & Beecher, 1987 Rouseff et al., 1996
$\beta$ -caroteno	-	(423)	444	470	12.7	25	Chandler & Schwartz, 1987 Khachik & Beecher, 1987 Britton, 1995
$\zeta$ -caroteno	-	379	399	425	-	-	Khachik & Beecher, 1987 Rouseff et al., 1996
9-cis- $\beta$ -caroteno	342	(421)	444	471	8.7	-	Chen & Chen, 1994

Figura nº 12. Cromatogramas de zumo mezcla de naranja-zanahoria a  $\lambda=450$  nm (A) y  $\lambda=290$  nm (B).

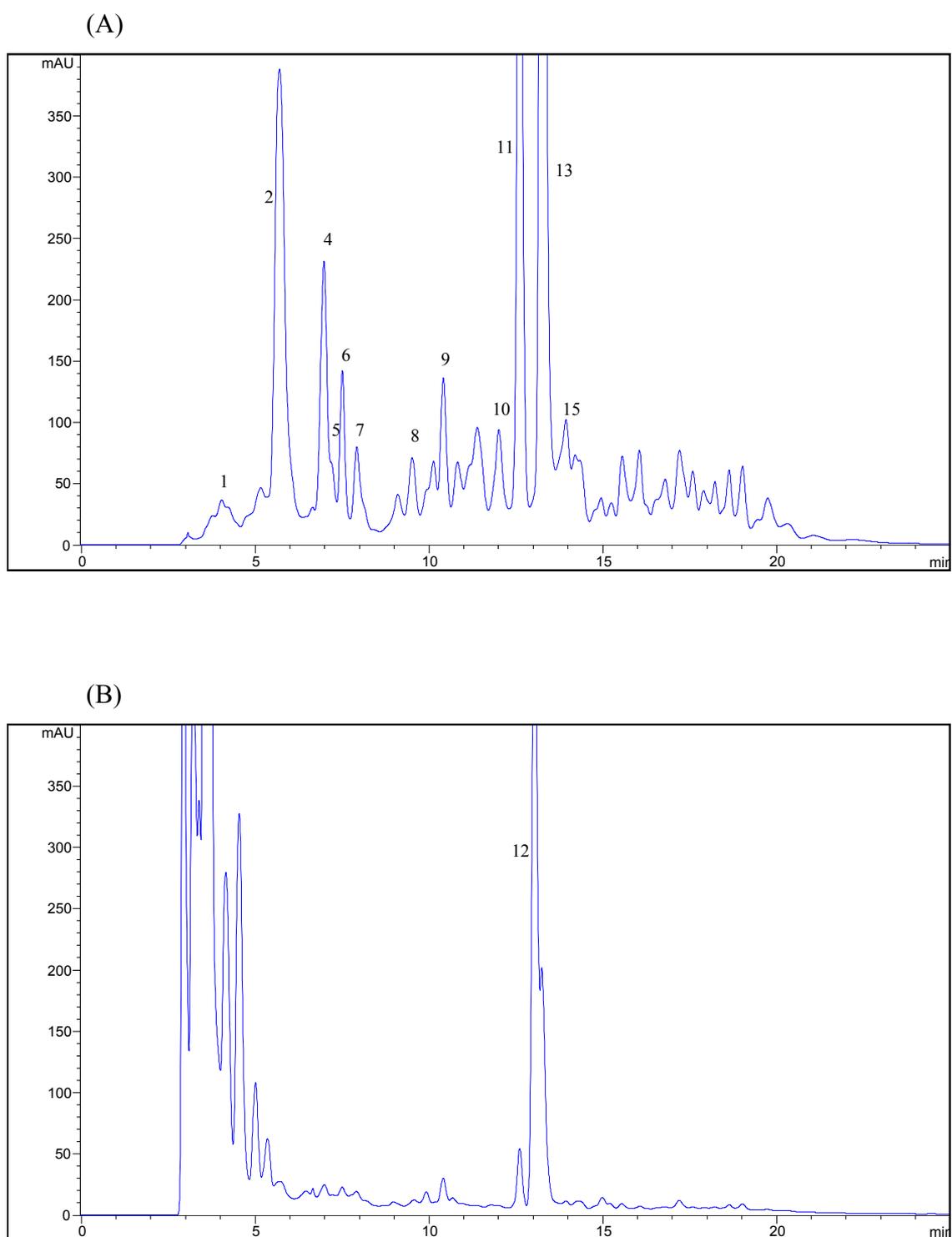
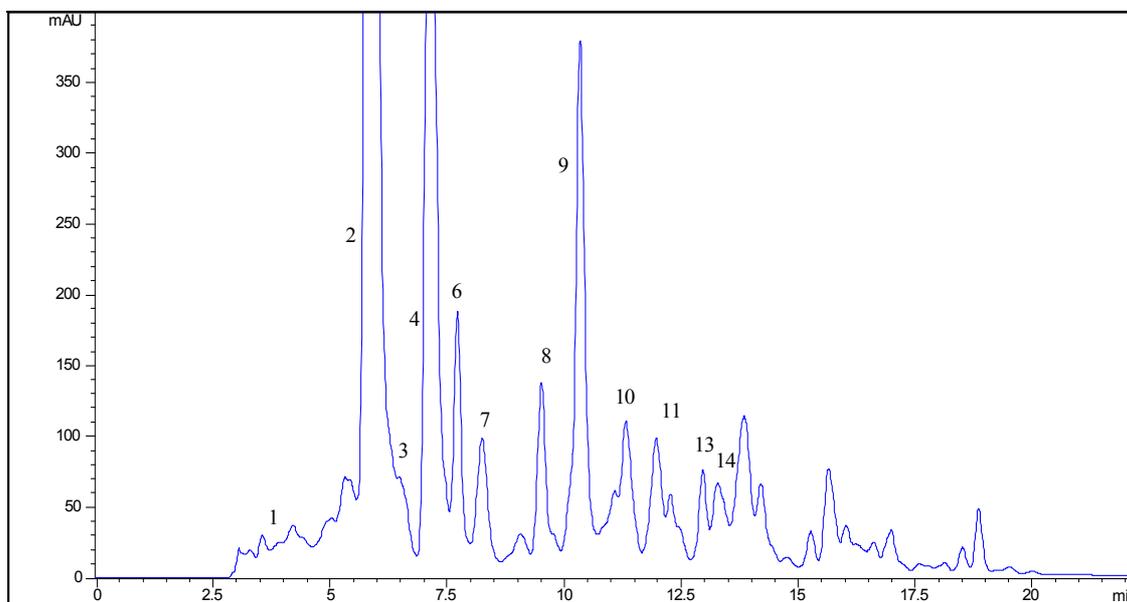
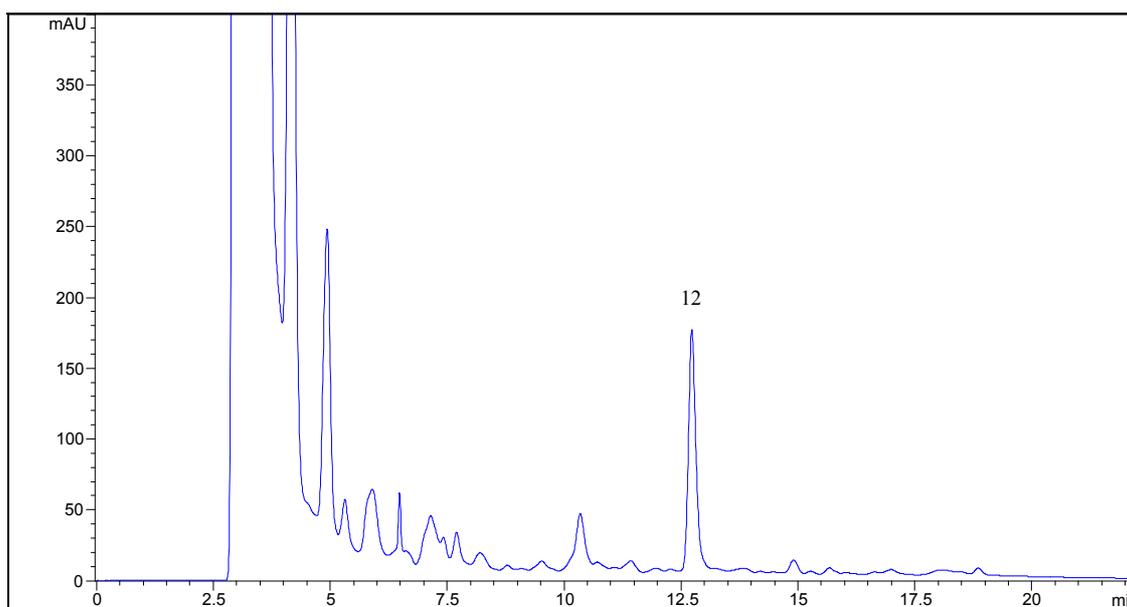


Figura nº 13. Cromatogramas de zumo de naranja a  $\lambda=450$  nm (A) y  $\lambda=290$  nm (B).

(A)



(B)



#### **4.1.2.- PARÁMETROS ANALÍTICOS**

Para verificar la fiabilidad y la utilidad del método propuesto se determinaron los parámetros analíticos para los carotenoides de los que se dispone patrones comerciales: luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno.

Las respuestas fueron lineales en los intervalos y con las ecuaciones siguientes: 2.02-56.55  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=7$ ) con la ecuación  $y=0.022x + 0.0425$  ( $r=0.991$ ) para la luteína, 2.56-51.29  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=7$ ) con la ecuación  $y=0.026x - 3 \cdot 10^{-5}$  ( $r=0.992$ ) para la zeaxantina y 5.54-776.15  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=7$ ) con la ecuación  $y=0.0034x + 0.7654$  ( $r=0.989$ ) para el  $\beta$ -caroteno. La concentración de los carotenoides en las muestras está incluida en el intervalo de concentraciones estudiado.

El límite de detección se calcula preparando 5 blancos de reactivos y aplicando el cociente entre el triple de la desviación estándar y la pendiente de la curva de calibrado ( $\text{LOD}= 3 \cdot S_{n-1}/m$ ). Los límites de detección obtenidos fueron 0.0196, 0.0166 y 0.1404  $\mu\text{g/mL}$  para la luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente. El límite de cuantificación (LOQ) corresponde a una cantidad, a partir de la cual se puede cuantificar sin incertidumbre ( $\text{LOQ}= 10 \cdot S_{n-1}/m$ ). Los límites de cuantificación fueron 0.0652, 0.0552 y 0.4680  $\mu\text{g/mL}$  para la luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente. Para el cálculo de los parámetros LOD y LOQ se ha cogido la pendiente de la curva de calibración externa (sin adición de patrón interno) y la desviación estándar a partir de los picos máximos a 450 nm de los blancos de reactivos. Los límites de detección y cuantificación muestran que el método es muy sensible para los carotenoides estudiados.

La exactitud se estimó mediante ensayos de recuperación. Una muestra (16.69, 14.14 y 17.02  $\mu\text{g}$  para luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente) a la cual se le habían añadido cantidades conocidas de patrones de luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno (38.30, 30.32 y 12.37  $\mu\text{g}$ , respectivamente) fue sometida a la extracción completa y al proceso de determinación. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron 94.0, 89.2 y 92.8 para la luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente.

La precisión instrumental se verificó a partir de seis inyecciones consecutivas de una solución estándar, las desviaciones relativas estándar (RSDs) obtenidas fueron 0.55, 0.34 y 5.33% para la luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente. Cuando las soluciones estándar se preparan y miden en días alternos, los valores de RSD son de 0.57, 0.51 y 5.67% para la luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno, respectivamente. La precisión instrumental también se verificó a partir de seis inyecciones consecutivas del extracto de una muestra. La precisión del método se determinó preparando seis alícuotas de una misma muestra de zumo de naranja y seis alícuotas de una misma muestra de zumo mezcla de naranja-zanahoria. En ambos casos la precisión se expresó como coeficiente de variación. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro n° 11.

Se observa que los valores de la precisión instrumental y del método obtenidos son aceptables tanto en patrones como en muestras para los carotenoides estudiados.

Cuadro n° 11. Precisión instrumental y del método en zumos de naranja y zumos mezcla de naranja-zanahoria.

Picos	Carotenoides	Precisión (RSD%)	
		Instrumental	Método
1	Valenciaxantina	3.11-5.86	3.14-8.32
2	9-cis-violaxantina + Neoxantina	1.72-4.06	2.62-4.41
3	cis-anteraxantina	2.13-4.87	2.47-5.01
4	Anteraxantina	2.52-3.01	2.59-3.68
5	Mutatoxantina	3.21-7.14	4.23-7.87
6	Luteína	1.77-4.47	3.77-5.84
7	Zeaxantina	1.69-3.31	4.31-6.53
8	$\alpha$ -criptoxantina	1.73-3.88	2.28-4.24
9	$\beta$ -criptoxantina	2.17-4.40	2.57-5.26
10	9-cis- $\alpha$ -caroteno	2.13-5.54	2.84-6.33
11	$\alpha$ -caroteno	1.08-4.64	2.78-4.85
12	Fitoeno + Fitoflueno	4.32-5.65	4.81-5.83
13	$\beta$ -caroteno	1.98-3.04	7.16-10.74
14	$\zeta$ -caroteno	1.99-2.83	4.07-8.05
15	9-cis- $\beta$ -caroteno	2.47-4.44	2.68-6.30

Desviación Relativa Estándar: RSD %, n=6

Los parámetros analíticos obtenidos son similares a los encontrados por Chen & Chen (1994), Hart & Scott (1995) y Konings & Roomans (1997), destacando que el intervalo de linealidad estudiado es más amplio en este trabajo.

En las figuras nº 12 y 13 se ven los cromatogramas de los dos tipos de muestras que hemos analizado: zumo mezcla de naranja-zanahoria y zumo de naranja, respectivamente. Se aprecian claramente las diferencias entre ambas muestras, observándose que el zumo mezcla posee mayor cantidad de carotenoides, sobretodo de  $\alpha$  y  $\beta$ -caroteno, pero en ambos zumos están presentes los carotenoides más representativos (9-cis-violaxantina, neoxantina, anteraxantina, luteína, zeaxantina,  $\alpha$  y  $\beta$ -criptoxantina, 9-cis- $\alpha$ -caroteno, fitoeno y fitoflueno), cuyos tiempos de retención y longitudes de onda se indican en el cuadro nº 8. Puede verse una ligera variación en los tiempos de retención obtenidos para la muestra de zumo mezcla de naranja-zanahoria y la muestra de zumo de naranja, porque ambas son matrices diferentes. También se debe resaltar que no todos los isómeros *cis* se encontraron en todas las muestras analizadas, y que los isómeros obtenidos dependen del tipo de matriz y de los diferentes tratamientos de conservación aplicados.

Los contenidos de los diversos carotenoides identificados de acuerdo con el método propuesto, tanto en zumo de naranja como en zumo mezcla de naranja-zanahoria, se muestran en el cuadro nº 12.

Cuadro nº 12. Cuantificación de carotenoides en zumo mezcla de naranja-zanahoria y en zumo de naranja.

Pico	Carotenoides	$\mu\text{g}/100 \text{ g} \pm \sigma$	
		naranja-zanahoria	naranja
1	Valencixantina	21.57±0.94	14.44±1.27
2	9-cis-violaxantina+ neoxantina	164.52±1.45	738.96±2.65
3	cis-Anteraxantina	-	26.88±3.40
4	Anteraxantina	61.98±0.05	236.89±1.31
5	Mutatoxantina	16.38±1.21	-
6	Luteína	38.56±1.69	53.55±4.69
7	Zeaxantina	32.44±1.98	35.09±3.39
8	$\alpha$ -Criptoxantina	30.54±2.14	42.29±2.34
9	$\beta$ -Criptoxantina	36.80±2.18	118.31±3.61
10	9-cis- $\alpha$ -Caroteno	149.68±8.59	41.45±1.93
11	$\alpha$ -Caroteno	867.62±8.65	22.41±3.25
12	Fitoeno + Fitoflueno	423.15±3.95	36.54±2.61
13	$\beta$ -Caroteno	2253.27±13.55	20.63±3.12
14	$\zeta$ -caroteno	205.50±6.25	-
15	9-cis- $\beta$ -Caroteno	-	22.72±1.74

#### **4.1.3.- CONCLUSIONES**

La utilización del detector de fotodiodo-array es muy útil para la caracterización de *cis* y *trans* carotenoides en vegetales y zumos cítricos (zumos de naranja y zumos mezcla de naranja-zanahoria). Utilizando el procedimiento rápido descrito, la mayoría de carotenoides se han caracterizado a partir de los datos espectrales y de los tiempos de retención obtenidos con estándares validados o de valores publicados. La mayoría de los carotenoides se separaron dentro de los primeros 22 min con un gradiente de elución ternario. La baja toxicidad y peligrosidad de la mayoría de los reactivos y productos usados durante la extracción y separación de los carotenoides no exigían de medidas especiales de seguridad en el laboratorio. Como muestran los parámetros analíticos, el método propuesto permite la determinación de *cis* y *trans* carotenoides en zumos

vegetales, ya que el método es sensible, fiable, exacto y reproducible. (Cortés et al, 2004)

## **4.2.- MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE VITAMINA C**

### **4.2.1.- SELECCIÓN, PUESTA A PUNTO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO**

Hemos seleccionado la determinación del ácido ascórbico por polarografía debido a su rapidez, sensibilidad y bajo coste.

#### ***4.2.1.1.- Reactivos***

Los reactivos utilizados fueron: ácido tricloroacético y sulfato sódico (Baker, Deventer, Holanda); ácido oxálico, ácido acético y acetato sódico (Panreac, Barcelona, España); y ácido ascórbico (Merck, Darmstadt, Alemania).

#### ***4.2.1.2.- Preparación de las Muestras***

El método puesto a punto es una modificación del propuesto por Aparicio et al. (1992):

Cinco mililitros de zumo se diluyen y enrasan a 25 mL con la solución extractante: ácido oxálico 1 %, p/v, ácido tricloroacético 2 %, p/v, sulfato sódico 1 %, p/v. Se agita vigorosamente y posteriormente la solución se filtra a través de un filtro plegado (Whatman nº 1). Se toman 0.5 mL del filtrado y se introducen en la cubeta polarográfica junto con 9.5 mL de ácido oxálico al 1 % (p/v) y 2 mL de la disolución amortiguadora ácido acético/acetato sódico 2M (pH= 4.8).

#### ***4.2.1.3.- Preparación de la Disolución Patrón de Ácido Ascórbico***

Se prepara una disolución patrón de ácido ascórbico de 1 µg/mL en ácido oxálico al 1% (p/v), que se guarda en refrigeración y se prepara semanalmente.

#### **4.2.1.4.- Condiciones Polarográficas**

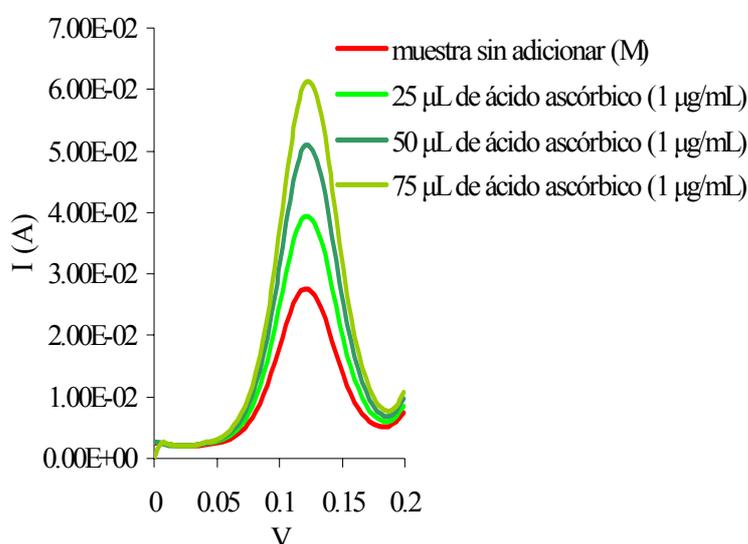
Se utiliza un polarógrafo integrado por las siguientes unidades: 746 VA Trace Analyzer  $\Omega$  Metrohm, 747 VA Stand  $\Omega$  Metrohm, PC Software 693 VA Back up  $\Omega$  Metrohm. El electrodo de trabajo es un electrodo multimodo Metrohm de mercurio, en modo de goteo continuo (DME), y se utiliza un electrodo auxiliar de hilo de platino y un electrodo de referencia de calomelanos saturados (Ag/AgCl, KCl 3M).

Para evitar posibles interferencias por la presencia de oxígeno, la muestra se purga con nitrógeno extrapuro libre de oxígeno durante 5 minutos antes del análisis. El polarograma se registra utilizando una amplitud de pulso de 50 mV, un tiempo de goteo de 1 segundo y una velocidad de barrido de 10 mV/cm. El potencial inicial es  $-0.10$  V. La cuantificación se realiza mediante el método de las adiciones, se realizan adiciones de 25  $\mu$ L de ácido ascórbico (1  $\mu$ g/mL) a la muestra y después de cada adición se registra obteniendo una curva polarográfica.

#### **4.2.2.- PARÁMETROS ANALÍTICOS**

En la figura nº 14 se muestra un polarograma de una muestra de zumo de naranja-zanahoria.

Figura nº 14. Polarograma de una muestra de zumo mezcla de naranja-zanahoria con sus respectivas adiciones.



Para evaluar la calidad del método se determinaron los parámetros analíticos que se detallan a continuación:

*Linealidad.* El zumo se reemplaza por agua y en la cubeta se realizan adiciones crecientes de patrón de ácido ascórbico (0 – 30 µg, n= 6), verificando que la respuesta es lineal en el tramo estudiado:  $y = 3.34x - 2.07$ ,  $r = 0.999$ , donde  $y$  es la intensidad de corriente en nA, y  $x$  es la concentración (µg) de ácido ascórbico en la cubeta.

Para comprobar si la matriz interfiere en la linealidad, se prepara la muestra y se realizan adiciones crecientes de ácido ascórbico (0 – 80 µg, n= 16), obteniendo que en el intervalo de concentración estudiado el método es lineal:  $y = 3.22x + 52.31$ ,  $r = 0.999$ , donde  $y$  es la intensidad de corriente en nA, y  $x$  es la concentración (µg) de ácido ascórbico en la cubeta.

*Límite de detección y de cuantificación.* El límite de detección ( $LOD = 3 \cdot S_{n-1} / m$ , siendo  $m$  la pendiente de la curva de calibrado) se calcula preparando 6 blancos de reactivos, el resultado obtenido es 0.76 µg/mL (0.076 µg en cubeta),  $S_{n-1} = 0.085$ ,  $m = 3.34$  nA/µg. El

límite de cuantificación ( $LOQ= 10 \cdot S_{n-1}/m$ , siendo  $m$  la pendiente de la curva de calibrado) siendo de  $2.5 \mu\text{g/mL}$  ( $0.25 \mu\text{g}$  en cubeta).

*Precisión.* La precisión del método se determinó preparando 6 alícuotas de un mismo zumo mezcla de naranja-zanahoria que se determinan por duplicado, y la precisión instrumental se calcula determinando 9 veces una misma alícuota de un zumo. En ambos casos, la precisión se expresa como coeficiente de variación. Los resultados fueron 2.9% ( $x= 156.67 \mu\text{g/mL}$ ,  $S_{n-1}= 4.62$ ) y 0.85% ( $x= 57.35 \text{ nA}$ ,  $S_{n-1}= 0.49$ ) para la precisión del método e instrumental, respectivamente.

*Exactitud.* Para determinar la exactitud del método se realizan ensayos de recuperación. Al zumo mezcla de naranja-zanahoria se le añade una cantidad conocida de ácido ascórbico (200, 100 y  $50 \mu\text{g/mL}$ ) y se procede a la extracción y posterior determinación polarográfica. Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro nº 13.

Cuadro nº 13. Ensayos de recuperación.

Muestra	Concentración de ácido	Patrón de ácido ascórbico	R%
	ascórbico ( $\mu\text{g/mL}$ ) (n= 3)	adicionado ( $\mu\text{g/mL}$ ) (n= 3)	
M <sub>1</sub>	61.65		
M <sub>1</sub> + A	253.70	200	96.0
M <sub>2</sub>	16.61		
M <sub>2</sub> + A <sub>1</sub>	110.51	100	93.9
M <sub>2</sub> + A <sub>2</sub>	65.03	50	96.8
M <sub>2</sub> + A <sub>3</sub>	62.98	50	92.7
M <sub>3</sub>	157.49		
M <sub>3</sub> + A	346.92	200	94.7

*\*La diferencia en la concentración de ácido ascórbico en el zumo mezcla de naranja-zanahoria se debe a que son muestras distintas de zumos.*

#### **4.2.3.- CONCLUSIONES**

Los parámetros analíticos obtenidos indican que el método permite la determinación de ácido ascórbico en el zumo mezcla de naranja-zanahoria y en el de naranja de manera rápida y precisa, pudiendo detectar cantidades muy pequeñas de ácido ascórbico en las muestras, por lo que podrá utilizarse para cuantificar variaciones en los distintos zumos así como también las diferencias que puedan deberse al tratamiento de conservación aplicado y durante el almacenamiento. La determinación de ácido ascórbico se realiza por su interés nutricional pero también porque la vitamina C se considera un parámetro de calidad que nos permitirá establecer la vida útil de un zumo tratado por distintas tecnologías de conservación.

### **4.3.- NARANJAS Y MANDARINAS**

#### **4.3.1.- DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se realiza el estudio sobre cítricos frescos y se decide seleccionar 3 variedades de naranjas (Navelina, Navel y Navel-Lane) y 3 de mandarinas (Clemenules, Clemenvilla y Fortuna) por ser las de mayor producción en la Comunidad Valenciana (véase apartado 1.2.), que han sido directa y aleatoriamente recolectadas del campo siguiendo los procedimientos de toma de muestras estadístico, dentro de su periodo de cosecha respectivo (campaña 2001-2002). Se identifican por el tipo de muestra, el tiempo de recolección y el tiempo de almacenamiento a 4°C. La temperatura elegida (4°C) es la que se utiliza para su almacenamiento hasta su distribución. En el cuadro nº 14 se describen las muestras analizadas así como las fechas de recolección y tiempos de almacenamiento.

Cuadro nº 14. Descripción de las naranjas y mandarinas.

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo de Recolección (días)</b>	<b>Tiempo de Almacenamiento (días)</b>
<b>Mandarinas</b>		
<b>Clemenules</b>	0, 14, 28	0, 15, 30
<b>Clemenvilla</b>	0, 14, 28	0, 15, 30
<b>Fortuna</b>	0, 14, 28	0, 15, 30
<b>Naranjas</b>		
<b>Navel</b>	0, 14, 28	0, 15, 30
<b>Navelina</b>	0, 14, 28	0, 15, 30
<b>Navel-Lane</b>	0, 14, 28	0, 15, 30

#### **4.3.2.- RECOLECCIÓN Y TAMAÑO DE MUESTRA**

Dada la disparidad de datos existentes en la bibliografía, surge el problema del tamaño de muestra necesario para obtener una precisión adecuada en la composición de las naranjas.

Primo et al. (1963) establecen como mínimo 21 unidades de naranja por muestra, para que el valor medio se encuentre en un intervalo de  $\pm 3$  mg, que corresponde a un 5% del error respecto del valor hallado (en relación al contenido en vitamina C). La evolución de los métodos de análisis permite reducir el tamaño de muestra y obtener resultados de igual fiabilidad a los obtenidos con una muestra de mayor tamaño, como confirman algunos estudios más recientes (Nagy, 1980; Ortuño et al., 1995).

El número de unidades tomadas en este estudio para cada tipo de muestra ha oscilado entre 9 y 12 según su rendimiento en volumen de zumo y al número de alícuotas necesario para estudiar los diferentes parámetros.

La recolección se realiza en tres fechas distintas: 0 días (inicial), a los 14 días y a los 28 días de la primera recolección.

#### **4.3.3.- ALMACENAMIENTO**

La superficie externa de las naranjas y mandarinas se limpia con papel de filtro, y las muestras se pesan y acondicionan en cajas de plástico (abiertas) numeradas y rotuladas con los códigos de identificación, a continuación se llevan a la cámara frigorífica a temperatura controlada ( $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Las muestras se mantienen en la cámara desde su llegada al laboratorio hasta su posterior análisis, ocupando siempre el mismo lugar en la cámara para evitar variaciones de temperatura.

En este estudio, de cada muestra recolectada se han hecho determinaciones a 3 tiempos de almacenamiento diferentes: 0 días (inicial), a los 15 días y a los 30 días (cuadro nº 14).

#### **4.3.4.- PARÁMETROS A ANALIZAR**

##### **4.3.4.1.- Relación Zumo/Peso**

###### *Instrumentación y Material.*

- Balanza Analítica, Ultra Mark 500, BEL.
- Exprimidor eléctrico, UFESA Mod. EX-7235.
- Probeta de 250 mL de capacidad.

###### *Descripción del Método.*

La relación zumo/peso se expresa en mL/100g, siendo el resultado del cociente entre el rendimiento en zumo de las naranjas (volumen total en mL) y el peso de estas (en gramos).

En el momento del análisis, se limpia con papel de filtro la superficie externa de las naranjas y mandarinas que se van a utilizar y posteriormente se pesan, tomando nota del número de naranjas empleadas y de su peso total (g). Tras extraer el zumo con un exprimidor eléctrico, se mide el volumen total (mL) del zumo (con una probeta), protegiendo siempre el zumo de la luz. Posteriormente tras su homogenización se separan las diferentes alícuotas para determinar los restantes parámetros.

##### **4.3.4.2.- pH**

###### *Instrumentación y Material.*

- pH-metro Crisol micro pH 2001.
- Agitador magnético, SBS<sup>®</sup>.
- Material de uso corriente en el laboratorio.

###### *Reactivos.*

- Disoluciones amortiguadoras Crisol: solución a pH 7.02 y solución a pH 4.00.
- Todos los reactivos utilizados son de calidad para análisis.

###### *Descripción del Método.*

Se toman al menos unos 25 mL de la muestra problema y se procede a la medida del pH. El pH se determina por duplicado en cada una de las muestras.

#### **4.3.4.3.- °Brix**

*Instrumentación y Material.*

- Refractómetro manual con compensación automática de T<sup>a</sup>, ATAGO (ATC-1).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

*Descripción del Método.*

Se añaden un par de gotas de la muestra homogeneizada sobre el porta cuidando de que se reparta la muestra uniformemente por toda la superficie de éste, y se determinan los °Brix directamente.

Se realiza la medida por duplicado para cada muestra.

#### **4.3.4.4.- Vitamina C**

Véase apartado 4.2.

#### **4.3.4.5.- Perfil Carotenoides**

Véase apartado 4.1.

Todos los análisis se realizan por duplicado, así como también cada una de las determinaciones.

### **4.3.5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En los cuadros n° 15-26 se muestran los resultados obtenidos para las mandarinas (clemenules, clemenvilla y fortuna) y en los cuadros n° 27-38 para las naranjas (navel, navelina, navel-lane).

**MANDARINAS**

*Clemenules*

Cuadro n° 15. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en clemenules.

<b>Recolección (días)</b>	<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>Zumo/peso (mL/100g)</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>Vitamina C (mg/100mL)</b>
0	0	47.28±0.11	3.56±0.01	11.0±0.1	36.04±0.21
0	15	55.57±0.09	3.63±0.01	11.0±0.1	38.90±0.05
0	30	55.42±0.02	3.56±0.01	11.6±0.0	44.13±0.26
14	0	42.22±0.03	3.55±0.01	11.2±0.1	46.56±1.06
14	15	44.58±0.11	3.71±0.01	11.6±0.2	47.36±0.95
14	30	45.96±0.06	3.75±0.00	11.6±0.2	47.76±1.05
28	0	46.60±0.14	3.66±0.00	11.8±0.2	46.59±0.02
28	15	49.82±0.03	3.86±0.01	11.8±0.2	51.59±0.11
28	30	49.79±0.01	3.82±0.00	11.6±0.1	47.48±0.40

La relación zumo/peso aumenta según incrementa el tiempo de almacenamiento.

Los pH, °Brix y vitamina C aumentan según varía el tiempo de recolección o el de almacenamiento.

Cuadro n° 16. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en clemenules. Tiempo de recolección: 0 días.

<b>Tiempo de Recolección: 0 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina +Neoxantina	120.19±19.55	288.69±24.56	278.25±24.66
cis-anteraxantina	9.76±0.76	26.64±1.43	26.50±1.17
Anteraxantina	65.94±2.76	178.46±2.89	120.30±2.74
Mutatoxantina	-	-	-
Luteína	12.98±1.68	29.58±3.90	19.77±4.02
Zeaxantina	23.35±2.74	54.11±2.70	52.48±1.72
$\alpha$ -criptoxantina	15.21±0.10	13.99±0.33	15.04±0.59
cis- $\beta$ -criptoxantina	9.73±0.15	12.46±0.59	10.71±0.10
$\beta$ -criptoxantina	322.92±41.99	472.98±39.43	396.29±20.75
9-cis- $\alpha$ -caroteno	37.62±0.38	19.25±0.41	28.77±0.18
$\alpha$ -caroteno	17.65±2.90	16.19±0.45	15.25±1.28
Fitoeno + Fitoflueno	44.56±0.54	43.25±0.89	32.82±1.22
$\beta$ -caroteno	86.51±0.36	84.76±2.38	44.30±3.35
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	56.54±4.32	19.91±0.64	31.64±6.55
Carotenoides Totales (real)	1538.16±21.28	1587.02±16.18	1473.96±44.26
Carotenoides Totales (450 nm)	1489.59±32.73	1514.26±21.26	1223.77±80.85
<b>Vitamina A</b>	<b>42.71±0.15</b>	<b>54.76±0.18</b>	<b>41.56±0.04</b>

Cuadro n° 17. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en clemenules. Tiempo de recolección: 14 días.

<b>Tiempo de Recolección: 14 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	181.63 $\pm$ 2.86	318.73 $\pm$ 22.55	334.50 $\pm$ 10.80
cis-anteraxantina	13.90 $\pm$ 0.22	29.55 $\pm$ 0.84	28.15 $\pm$ 0.58
Anteraxantina	107.52 $\pm$ 2.11	186.32 $\pm$ 3.70	188.58 $\pm$ 8.42
Mutatoxantina	-	-	-
Luteína	16.42 $\pm$ 0.64	25.66 $\pm$ 3.91	30.71 $\pm$ 1.27
Zeaxantina	34.40 $\pm$ 0.72	61.11 $\pm$ 4.84	64.20 $\pm$ 3.69
$\alpha$ -criptoxantina	16.35 $\pm$ 0.69	15.96 $\pm$ 0.91	15.01 $\pm$ 0.85
cis- $\beta$ -criptoxantina	10.90 $\pm$ 0.18	13.91 $\pm$ 0.95	14.28 $\pm$ 1.40
$\beta$ -criptoxantina	388.74 $\pm$ 11.21	496.64 $\pm$ 7.44	516.80 $\pm$ 16.24
9-cis- $\alpha$ -caroteno	30.67 $\pm$ 3.96	29.57 $\pm$ 0.03	17.40 $\pm$ 1.05
$\alpha$ -caroteno	20.61 $\pm$ 1.42	17.73 $\pm$ 0.76	12.38 $\pm$ 0.21
Fitoeno + Fitoflueno	56.22 $\pm$ 0.33	66.10 $\pm$ 4.63	76.19 $\pm$ 6.26
$\beta$ -caroteno	74.75 $\pm$ 4.29	54.64 $\pm$ 0.18	49.53 $\pm$ 3.45
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	47.65 $\pm$ 8.01	31.52 $\pm$ 3.14	16.22 $\pm$ 0.57
Carotenoides Totales (real)	1543.45 $\pm$ 49.48	1937.73 $\pm$ 32.99	1882.01 $\pm$ 172.15
Carotenoides Totales (450 nm)	1330.44 $\pm$ 38.50	1535.94 $\pm$ 38.39	1428.44 $\pm$ 146.13
<b>Vitamina A</b>	<b>46.46<math>\pm</math>0.10</b>	<b>51.82<math>\pm</math>0.52</b>	<b>52.19<math>\pm</math>0.01</b>

Cuadro n° 18. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en clemenules. Tiempo de recolección: 28 días.

<b>Tiempo de Recolección: 28 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	207.43 $\pm$ 7.38	238.91 $\pm$ 15.59	227.57 $\pm$ 73.55
cis-anteraxantina	26.23 $\pm$ 3.48	22.49 $\pm$ 2.88	19.20 $\pm$ 1.65
Anteraxantina	121.81 $\pm$ 3.0	157.57 $\pm$ 2.21	138.64 $\pm$ 5.77
Mutatoxantina	-	-	-
Luteína	20.70 $\pm$ 0.52	24.02 $\pm$ 1.34	21.73 $\pm$ 1.71
Zeaxantina	44.76 $\pm$ 1.37	54.43 $\pm$ 1.13	47.58 $\pm$ 7.16
$\alpha$ -criptoxantina	15.36 $\pm$ 0.50	17.39 $\pm$ 1.96	14.87 $\pm$ 1.79
cis- $\beta$ -criptoxantina	12.85 $\pm$ 0.24	12.33 $\pm$ 1.67	12.90 $\pm$ 1.39
$\beta$ -criptoxantina	469.66 $\pm$ 25.12	492.52 $\pm$ 45.59	448.99 $\pm$ 79.59
9-cis- $\alpha$ -caroteno	33.94 $\pm$ 2.67	29.36 $\pm$ 1.56	25.55 $\pm$ 15.50
$\alpha$ -caroteno	16.86 $\pm$ 2.23	22.52 $\pm$ 1.61	18.49 $\pm$ 7.65
Fitoeno + Fitoflueno	55.22 $\pm$ 2.73	66.50 $\pm$ 9.97	53.85 $\pm$ 1.51
$\beta$ -caroteno	71.22 $\pm$ 6.20	65.30 $\pm$ 7.71	70.39 $\pm$ 9.15
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	27.69 $\pm$ 4.94	36.73 $\pm$ 1.44	47.29 $\pm$ 7.13
Carotenoides Totales (real)	1712.06 $\pm$ 21.34	2030.46 $\pm$ 206.06	1715.02 $\pm$ 76.85
Carotenoides Totales (450nm)	1444.37 $\pm$ 76.85	1657.27 $\pm$ 177.27	1515.99 $\pm$ 60.01
<b>Vitamina A</b>	<b>52.27<math>\pm</math>0.02</b>	<b>53.65<math>\pm</math>0.04</b>	<b>50.56<math>\pm</math>4.45</b>

***Clemenvilla***

Cuadro n° 19. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en clemenvilla.

<b>Recolección (días)</b>	<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>Zumo/peso (mL/100g)</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>Vitamina C (mg/100mL)</b>
0	0	49.70±0.02	3.40±0.01	11.6±0.1	49.91±0.23
0	15	48.96±0.03	3.46±0.01	12.0±0.1	48.92±0.37
0	30	52.02±0.01	3.45±0.03	12.6±0.1	51.44±2.08
14	0	49.35±0.04	3.45±0.00	11.8±0.1	46.15±0.44
14	15	46.22±0.01	3.71±0.01	12.2±0.2	47.04±0.22
14	30	55.91±0.06	3.64±0.01	12.2±0.2	44.28±0.08
28	0	45.19±0.13	3.46±0.01	13.4±0.2	53.98±1.36
28	15	55.43±0.05	3.59±0.01	13.0±0.1	54.35±0.33
28	30	54.87±0.02	3.50±0.00	13.4±0.1	53.10±0.26

Los °Brix aumentan conforme incrementa el tiempo de recolección o el de almacenamiento.

Cuadro n° 20. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en clemenvilla. Tiempo de recolección: 0 días.

<b>Tiempo de Recolección: 0 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	220.19±26.75	292.99±33.18	356.40±24.32
cis-anteraxantina	10.76±0.72	17.75±0.54	19.18±0.04
Anteraxantina	74.94±1.06	124.89±18.02	156.35±6.43
Mutatoxantina	15.98±0.65	16.53±2.12	16.89±2.98
Luteína	13.65±1.86	25.44±4.38	31.47±2.62
Zeaxantina	33.05±2.03	43.25±2.50	50.18±4.89
$\alpha$ -criptoxantina	17.21±0.65	25.38±0.76	17.12±0.18
cis- $\beta$ -criptoxantina	9.98±0.26	13.15±0.71	10.92±0.50
$\beta$ -criptoxantina	335.42±21.09	451.24±9.70	389.10±4.34
9-cis- $\alpha$ -caroteno	29.65±0.43	47.26±2.79	21.27±0.32
$\alpha$ -caroteno	16.34±1.45	25.05±0.59	10.02±0.25
Fitoeno + Fitoflueno	54.51±0.62	79.49±3.82	24.53±1.87
$\beta$ -caroteno	78.45±0.63	115.84±6.48	25.54±1.41
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	46.55±2.31	41.16±17.56	3.55±0.63
Carotenoides Totales (real)	1726.31±0.20	1817.40±0.21	1342.10±0.17
Carotenoides Totales (450nm)	1498.56±0.10	1532.69±0.12	1088.66±0.36
<b>Vitamina A</b>	<b>44.06±0.01</b>	<b>58.88±0.01</b>	<b>37.39±0.01</b>

Cuadro n° 21. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en clemenvilla. Tiempo de recolección: 14 días.

Carotenoides	Tiempo de Recolección: 14 días		
	Tiempo almacenamiento		
	0 días	15 días	30 días
9-cis-violaxantina+Neoxantina	267.06 $\pm$ 20.63	265.29 $\pm$ 2.21	332.76 $\pm$ 6.24
cis-anteraxantina	17.51 $\pm$ 4.70	20.36 $\pm$ 0.16	26.30 $\pm$ 3.49
Anteraxantina	111.62 $\pm$ 7.22	124.61 $\pm$ 5.05	147.36 $\pm$ 7.97
Mutatoxantina	17.97 $\pm$ 1.21	12.97 $\pm$ 0.45	21.64 $\pm$ 4.78
Luteína	24.02 $\pm$ 2.74	22.94 $\pm$ 3.78	24.25 $\pm$ 0.13
Zeaxantina	40.50 $\pm$ 2.97	39.25 $\pm$ 1.58	47.75 $\pm$ 0.16
$\alpha$ -criptoxantina	20.36 $\pm$ 2.89	18.80 $\pm$ 0.10	12.71 $\pm$ 0.08
cis- $\beta$ -criptoxantina	13.40 $\pm$ 0.04	13.17 $\pm$ 0.47	11.09 $\pm$ 0.14
$\beta$ -criptoxantina	418.70 $\pm$ 12.11	428.31 $\pm$ 13.05	407.22 $\pm$ 1.69
9-cis- $\alpha$ -caroteno	40.20 $\pm$ 1.65	30.68 $\pm$ 1.49	18.57 $\pm$ 0.30
$\alpha$ -caroteno	17.85 $\pm$ 0.22	21.04 $\pm$ 1.31	9.62 $\pm$ 3.73
Fitoeno + Fitoflueno	100.38 $\pm$ 7.77	93.23 $\pm$ 3.53	77.47 $\pm$ 0.16
$\beta$ -caroteno	112.44 $\pm$ 15.22	94.58 $\pm$ 4.86	111.76 $\pm$ 1.39
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	40.59 $\pm$ 14.76	38.33 $\pm$ 2.81	17.81 $\pm$ 0.51
Carotenoides Totales (real)	1792.22 $\pm$ 12.36	1810.50 $\pm$ 9.24	1659.38 $\pm$ 7.65
Carotenoides Totales (450nm)	1487.17 $\pm$ 8.07	1435.29 $\pm$ 1.31	1297.70 $\pm$ 4.32
Vitamina A	55.01 $\pm$ 0.03	53.09 $\pm$ 2.01	53.26 $\pm$ 0.40

Cuadro n° 22. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en clemenvilla. Tiempo de recolección: 28 días.

<b>Tiempo de Recolección: 28 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	255.68 $\pm$ 14.20	349.25 $\pm$ 4.35	589.05 $\pm$ 43.03
cis-anteraxantina	13.49 $\pm$ 0.25	25.47 $\pm$ 0.98	32.87 $\pm$ 0.21
Anteraxantina	114.10 $\pm$ 10.56	145.33 $\pm$ 0.44	268.24 $\pm$ 30.40
Mutatoxantina	13.48 $\pm$ 1.07	11.68 $\pm$ 0.96	36.18 $\pm$ 4.52
Luteína	22.51 $\pm$ 0.44	22.38 $\pm$ 3.48	33.87 $\pm$ 4.19
Zeaxantina	45.21 $\pm$ 2.52	45.65 $\pm$ 3.66	73.49 $\pm$ 17.13
$\alpha$ -criptoxantina	21.70 $\pm$ 1.42	13.96 $\pm$ 0.98	23.48 $\pm$ 0.41
cis- $\beta$ -criptoxantina	13.61 $\pm$ 0.47	16.64 $\pm$ 0.97	22.66 $\pm$ 0.59
$\beta$ -criptoxantina	485.53 $\pm$ 16.16	439.05 $\pm$ 4.04	815.04 $\pm$ 54.26
9-cis- $\alpha$ -caroteno	36.03 $\pm$ 0.64	18.73 $\pm$ 0.93	33.16 $\pm$ 7.11
$\alpha$ -caroteno	21.06 $\pm$ 0.85	11.96 $\pm$ 0.68	15.43 $\pm$ 2.85
Fitoeno + Fitoflueno	72.59 $\pm$ 2.11	97.39 $\pm$ 1.44	105.23 $\pm$ 45.79
$\beta$ -caroteno	127.74 $\pm$ 3.74	85.02 $\pm$ 3.42	142.82 $\pm$ 11.77
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	49.21 $\pm$ 5.79	16.57 $\pm$ 1.22	20.60 $\pm$ 18.14
Carotenoides Totales (real)	1893.74 $\pm$ 6.77	1938.55 $\pm$ 10.02	2953.40 $\pm$ 6.99
Carotenoides Totales (450nm)	1682.67 $\pm$ 13.65	1398.07 $\pm$ 8.87	2248.51 $\pm$ 7.66
<b>Vitamina A</b>	<b>63.38<math>\pm</math>0.06</b>	<b>51.63<math>\pm</math>0.85</b>	<b>92.78<math>\pm</math>1.23</b>

**Fortuna**

Cuadro n° 23. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en fortuna.

<b>Recolección (días)</b>	<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>Zumo/peso (mL/100g)</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>Vitamina C (mg/100mL)</b>
0	0	62.63±0.02	3.23±0.01	13.6±0.1	27.33±2.35
0	15	62.17±0.01	3.28±0.01	14.0±0.2	28.16±1.24
0	30	61.21±0.01	3.36±0.00	14.0±0.1	30.56±1.27
14	0	58.73±0.01	3.32±0.00	13.8±0.1	29.17±0.21
14	15	63.07±0.05	3.45±0.01	14.2±0.2	26.34±0.11
14	30	61.35±0.04	3.42±0.01	14.0±0.2	27.26±0.42
28	0	59.94±0.04	3.38±0.01	14.6±0.2	27.17±0.06
28	15	60.99±0.01	3.50±0.00	14.2±0.1	25.98±0.06
28	30	54.36±0.01	3.73±0.01	15.2±0.2	23.95±0.22

Se observa que el pH y los °Brix aumentan ligeramente con la fecha de recolección y el almacenamiento.

Cuadro n° 24. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en fortuna. Tiempo de recolección: 0 días.

<b>Tiempo de Recolección: 0 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	200.71 $\pm$ 3.11	238.78 $\pm$ 8.37	130.51 $\pm$ 15.85
cis-anteraxantina	20.96 $\pm$ 0.59	25.01 $\pm$ 0.67	16.88 $\pm$ 0.68
Anteraxantina	145.40 $\pm$ 1.51	163.08 $\pm$ 9.62	69.36 $\pm$ 10.13
Mutatoxantina	11.48 $\pm$ 0.24	14.15 $\pm$ 0.21	10.55 $\pm$ 0.35
Luteína	28.08 $\pm$ 0.09	25.75 $\pm$ 0.80	14.94 $\pm$ 1.26
Zeaxantina	44.14 $\pm$ 0.45	42.73 $\pm$ 6.01	7.83 $\pm$ 0.54
$\alpha$ -criptoxantina	15.29 $\pm$ 0.37	17.50 $\pm$ 0.01	6.25 $\pm$ 0.41
cis- $\beta$ -criptoxantina	9.60 $\pm$ 0.31	11.31 $\pm$ 0.06	4.26 $\pm$ 0.15
$\beta$ -criptoxantina	401.33 $\pm$ 9.36	454.20 $\pm$ 21.34	88.65 $\pm$ 13.31
9-cis- $\alpha$ -caroteno	-	18.38 $\pm$ 0.67	31.75 $\pm$ 4.33
$\alpha$ -caroteno	21.17 $\pm$ 0.93	15.17 $\pm$ 0.67	11.46 $\pm$ 1.03
Fitoeno + Fitoflueno	54.55 $\pm$ 0.76	37.37 $\pm$ 0.47	18.71 $\pm$ 0.23
$\beta$ -caroteno	85.86 $\pm$ 2.62	60.54 $\pm$ 0.20	46.66 $\pm$ 6.60
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	14.72 $\pm$ 1.08	11.62 $\pm$ 0.09	4.30 $\pm$ 0.88
9-cis- $\beta$ -caroteno	12.44	10.01 $\pm$ 0.49	11.08 $\pm$ 1.36
Carotenoides Totales (real)	1411.39 $\pm$ 0.65	1461.01 $\pm$ 0.76	866.07 $\pm$ 7.93
Carotenoides Totales (450nm)	1086.48 $\pm$ 0.13	732.00 $\pm$ 4.03	553.11 $\pm$ 13.68
<b>Vitamina A</b>	<b>50.63<math>\pm</math>1.39</b>	<b>50.03<math>\pm</math>0.92</b>	<b>16.46<math>\pm</math>1.03</b>

Cuadro n° 25. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en fortuna. Tiempo de recolección: 14 días.

<b>Tiempo de Recolección: 14 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	245.51 $\pm$ 15.39	256.01 $\pm$ 5.02	212.31 $\pm$ 54.67
cis-anteraxantina	25.65 $\pm$ 0.23	22.75 $\pm$ 0.63	22.62 $\pm$ 2.91
Anteraxantina	133.30 $\pm$ 7.94	168.65 $\pm$ 0.75	138.01 $\pm$ 32.34
Mutatoxantina	13.14 $\pm$ 2.86	12.37 $\pm$ 0.71	8.27 $\pm$ 0.31
Luteína	23.18 $\pm$ 2.51	23.60 $\pm$ 2.48	16.77 $\pm$ 3.46
Zeaxantina	35.90 $\pm$ 2.54	17.23 $\pm$ 2.05	34.66 $\pm$ 9.00
$\alpha$ -criptoxantina	12.55 $\pm$ 1.87	4.78 $\pm$ 0.11	25.87 $\pm$ 1.14
cis- $\beta$ -criptoxantina	10.00 $\pm$ 0.16	4.59 $\pm$ 0.50	13.23 $\pm$ 2.69
$\beta$ -criptoxantina	354.30 $\pm$ 20.27	145.33 $\pm$ 28.14	380.95 $\pm$ 62.85
9-cis- $\alpha$ -caroteno	18.60 $\pm$ 3.45	13.17 $\pm$ 0.32	23.38 $\pm$ 1.56
$\alpha$ -caroteno	15.46 $\pm$ 2.84	10.62 $\pm$ 0.89	19.57 $\pm$ 0.93
Fitoeno + Fitoflueno	34.74 $\pm$ 0.18	18.19 $\pm$ 4.69	28.39 $\pm$ 5.47
$\beta$ -caroteno	47.81 $\pm$ 0.61	33.60 $\pm$ 7.42	49.67 $\pm$ 12.66
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	7.50 $\pm$ 0.99	7.10 $\pm$ 1.46	6.83 $\pm$ 1.78
9-cis- $\beta$ -caroteno	8.39 $\pm$ 2.06	4.18 $\pm$ 0.28	10.76 $\pm$ 0.05
Carotenoides Totales (real)	1286.67 $\pm$ 1.09	1026.71 $\pm$ 2.34	1335.94 $\pm$ 1.66
Carotenoides Totales (450nm)	615.42 $\pm$ 16.28	625.04 $\pm$ 54.94	660.88 $\pm$ 16.43
<b>Vitamina A</b>	<b>39.30<math>\pm</math>0.49</b>	<b>19.14<math>\pm</math>0.91</b>	<b>42.10<math>\pm</math>3.03</b>

Cuadro n° 26. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en fortuna. Tiempo de recolección: 28 días.

<b>Tiempo de Recolección: 28 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	320.18 $\pm$ 9.67	265.16 $\pm$ 17.97	334.12 $\pm$ 0.52
cis-anteraxantina	22.69 $\pm$ 2.22	26.05 $\pm$ 1.39	27.11 $\pm$ 0.18
Anteraxantina	190.48 $\pm$ 4.98	184.45 $\pm$ 10.26	209.32 $\pm$ 2.03
Mutatoxantina	13.65 $\pm$ 2.37	9.00 $\pm$ 1.07	17.58 $\pm$ 1.92
Luteína	22.26 $\pm$ 2.75	25.19 $\pm$ 0.76	23.80 $\pm$ 0.52
Zeaxantina	18.11 $\pm$ 2.14	26.07 $\pm$ 3.64	56.36 $\pm$ 1.61
$\alpha$ -criptoxantina	5.02 $\pm$ 0.23	16.00 $\pm$ 0.62	14.45 $\pm$ 0.80
cis- $\beta$ -criptoxantina	3.36 $\pm$ 1.07	18.13 $\pm$ 0.65	11.59 $\pm$ 0.08
$\beta$ -criptoxantina	157.17 $\pm$ 24.20	452.76 $\pm$ 31.64	380.80 $\pm$ 2.93
9-cis- $\alpha$ -caroteno	16.02 $\pm$ 2.11	21.53 $\pm$ 0.37	16.82 $\pm$ 2.16
$\alpha$ -caroteno	12.77 $\pm$ 1.23	17.87 $\pm$ 1.03	13.74 $\pm$ 2.14
Fitoeno + Fitoflueno	30.20 $\pm$ 6.27	38.02 $\pm$ 2.52	24.71 $\pm$ 2.76
$\beta$ -caroteno	51.39 $\pm$ 4.54	59.72 $\pm$ 9.79	48.03 $\pm$ 4.09
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	3.73 $\pm$ 1.16	14.20 $\pm$ 0.47	6.59 $\pm$ 2.07
9-cis- $\beta$ -caroteno	4.99 $\pm$ 1.19	27.71 $\pm$ 1.71	4.99 $\pm$ 1.48
Carotenoides Totales (real)	1163.67 $\pm$ 10.78	1352.83 $\pm$ 74.83	1405.28 $\pm$ 34.07
Carotenoides Totales (450nm)	708.69 $\pm$ 74.83	638.56 $\pm$ 0.18	597.35 $\pm$ 8.65
<b>Vitamina A</b>	<b>23.00<math>\pm</math>6.76</b>	<b>50.21<math>\pm</math>0.98</b>	<b>41.32<math>\pm</math>1.12</b>

## NARANJAS

### *Navelina*

Cuadro n° 27. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en navelina.

<b>Recolección (días)</b>	<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>Zumo/peso (mL/100g)</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>Vitamina C (mg/100mL)</b>
0	0	50.04±0.03	3.41±0.01	11.2±0.1	46.99±0.88
0	15	51.44±0.03	3.48±0.01	12.2±0.0	50.31±0.43
0	30	51.08±0.06	3.75±0.02	12.2±0.2	54.89±1.02
14	0	46.30±0.01	3.31±0.01	10.8±0.1	57.75±0.70
14	15	48.22±0.03	3.58±0.01	11.4±0.0	57.79±0.05
14	30	53.46±0.05	3.78±0.01	11.0±0.1	51.81±0.21
28	0	49.39±0.08	3.49±0.01	11.2±0.1	55.85±0.01
28	15	57.81±0.01	3.52±0.01	11.4±0.2	51.66±1.51
28	30	56.44±0.04	3.56±0.01	11.8±0.1	50.23±0.76

El pH aumenta con el tiempo de almacenamiento.

Cuadro n° 28. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navelina. Tiempo de recolección: 0 días.

<b>Tiempo de Recolección: 0 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	94.92 $\pm$ 12.70	578.61 $\pm$ 64.88	356.34 $\pm$ 83.86
cis-anteraxantina	-	15.66 $\pm$ 2.60	14.52 $\pm$ 2.79
Anteraxantina	21.86 $\pm$ 1.70	144.91 $\pm$ 18.42	95.80 $\pm$ 29.70
Mutatoxantina	5.44 $\pm$ 0.08	6.27 $\pm$ 0.12	12.36 $\pm$ 1.21
Luteína	14.19 $\pm$ 0.25	50.15 $\pm$ 8.62	31.75 $\pm$ 11.13
Zeaxantina	10.32 $\pm$ 0.13	23.41 $\pm$ 1.03	23.38 $\pm$ 4.53
$\alpha$ -criptoxantina	13.29 $\pm$ 0.74	19.25 $\pm$ 0.98	15.60 $\pm$ 0.93
cis- $\beta$ -criptoxantina	-	7.55 $\pm$ 0.49	7.11 $\pm$ 0.72
$\beta$ -criptoxantina	29.70 $\pm$ 0.94	70.86 $\pm$ 5.53	100.00 $\pm$ 28.05
9-cis- $\alpha$ -caroteno	28.04 $\pm$ 2.46	36.86 $\pm$ 1.85	37.24 $\pm$ 0.27
$\alpha$ -caroteno	10.37 $\pm$ 1.00	8.96 $\pm$ 0.89	15.11 $\pm$ 1.74
Fitoeno + Fitoflueno	9.93 $\pm$ 0.21	8.07 $\pm$ 1.77	19.88 $\pm$ 0.07
$\beta$ -caroteno	15.20 $\pm$ 1.00	6.92 $\pm$ 0.99	19.01 $\pm$ 4.89
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	19.17 $\pm$ 0.23	8.24 $\pm$ 0.18	24.56 $\pm$ 3.55
Carotenoides Totales (real)	569.33 $\pm$ 2.50	1100.37 $\pm$ 9.87	1191.47 $\pm$ 11.21
Carotenoides Totales (450nm)	477.26 $\pm$ 12.50	844.00 $\pm$ 9.93	936.81 $\pm$ 8.38
<b>Vitamina A</b>	<b>5.86<math>\pm</math>0.33</b>	<b>7.78<math>\pm</math>0.11</b>	<b>12.73<math>\pm</math>3.29</b>

Cuadro n° 29. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navelina. Tiempo de recolección: 14 días.

<b>Tiempo de Recolección: 14 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	412.65±25.94	517.01±12.20	621.50±38.34
cis-anteraxantina	11.20±0.62	16.34±1.01	16.67±0.51
Anteraxantina	95.94±3.56	181.42±1.41	186.29±17.80
Mutatoxantina	8.84±0.50	9.19±0.75	-
Luteína	36.48±0.26	47.36±8.91	66.14±6.22
Zeaxantina	20.06±0.41	31.96±4.47	38.04±4.14
$\alpha$ -criptoxantina	22.63±0.01	26.45±2.03	22.62±0.52
cis- $\beta$ -criptoxantina	-	5.04±0.96	3.41±0.46
$\beta$ -criptoxantina	45.09±4.37	101.71±9.26	93.34±3.36
9-cis- $\alpha$ -caroteno	35.12±1.15	24.26±1.62	20.70±1.74
$\alpha$ -caroteno	9.32±0.83	14.54±2.32	10.78±1.03
Fitoeno + Fitoflueno	5.82±0.38	28.11±1.69	20.96±1.69
$\beta$ -caroteno	5.21±0.34	18.24±0.96	16.63±2.96
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	8.91±0.91	10.01±0.87	8.77±0.21
Carotenoides Totales (real)	1096.28±53.86	1171.64±5.15	1406.02±15.26
Carotenoides Totales (450nm)	801.09±0.23	998.86±1.52	1173.91±0.89
<b>Vitamina A</b>	<b>5.39±0.13</b>	<b>12.73±0.11</b>	<b>11.41±0.69</b>

Cuadro n° 30. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navelina. Tiempo de recolección: 28 días.

<b>Tiempo de Recolección: 28 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	485.31 $\pm$ 31.20	608.61 $\pm$ 20.20	408.49 $\pm$ 14.44
cis-anteraxantina	13.91 $\pm$ 0.36	16.28 $\pm$ 1.17	13.98 $\pm$ 1.77
Anteraxantina	145.15 $\pm$ 7.40	183.23 $\pm$ 0.21	121.61 $\pm$ 43.08
Mutatoxantina	7.12 $\pm$ 0.94	9.79 $\pm$ 0.85	-
Luteína	45.66 $\pm$ 1.76	48.54 $\pm$ 10.89	30.87 $\pm$ 7.80
Zeaxantina	29.49 $\pm$ 1.75	31.96 $\pm$ 4.47	24.94 $\pm$ 3.36
$\alpha$ -criptoxantina	21.04 $\pm$ 1.51	36.58 $\pm$ 7.74	28.69 $\pm$ 2.66
cis- $\beta$ -criptoxantina	5.33 $\pm$ 0.71	5.94 $\pm$ 1.94	-
$\beta$ -criptoxantina	64.75 $\pm$ 2.26	111.27 $\pm$ 29.34	70.85 $\pm$ 3.10
9-cis- $\alpha$ -caroteno	35.18 $\pm$ 2.66	24.23 $\pm$ 4.42	40.52 $\pm$ 13.88
$\alpha$ -caroteno	18.98 $\pm$ 0.23	19.11 $\pm$ 4.60	17.33 $\pm$ 1.32
Fitoeno + Fitoflueno	23.50 $\pm$ 0.55	31.14 $\pm$ 7.62	20.01 $\pm$ 5.35
$\beta$ -caroteno	19.41 $\pm$ 0.13	23.97 $\pm$ 5.64	22.25 $\pm$ 2.62
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	21.44 $\pm$ 2.39	14.19 $\pm$ 3.39	29.06 $\pm$ 9.22
Carotenoides Totales (real)	1204.58 $\pm$ 8.78	1340.19 $\pm$ 3.36	1298.60 $\pm$ 0.14
Carotenoides Totales (450nm)	914.85 $\pm$ 44.82	1002.74 $\pm$ 6.20	985.19 $\pm$ 3.76
<b>Vitamina A</b>	<b>10.19<math>\pm</math>0.14</b>	<b>14.82<math>\pm</math>4.83</b>	<b>11.03<math>\pm</math>1.09</b>

*Navel*

Cuadro n° 31. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en navel.

<b>Recolección (días)</b>	<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>Zumo/peso (mL/100g)</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>Vitamina C (mg/100mL)</b>
0	0	56.08±0.01	3.48±0.01	11.8±0.1	52.31±0.71
0	15	55.86±0.03	3.59±0.01	12.4±0.2	51.61±0.33
0	30	55.70±0.02	3.63±0.01	12.2±0.2	52.04±0.13
14	0	56.98±0.01	3.64±0.02	11.6±0.2	53.34±0.33
14	15	56.95±0.04	3.56±0.01	11.6±0.2	52.53±1.71
14	30	56.56±0.03	3.76±0.01	11.6±0.1	50.36±0.47
28	0	50.97±0.02	3.72±0.03	10.8±0.1	47.77±0.19
28	15	53.63±0.03	3.64±0.01	11.6±0.2	48.97±0.08
28	30	53.89±0.01	4.01±0.01	11.6±0.2	48.63±0.81

Los °Brix disminuyen y el pH aumenta con el tiempo de recolección.

Cuadro n° 32. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navel. Tiempo de recolección: 0 días.

<b>Tiempo de Recolección: 0 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	754.01 $\pm$ 47.18	817.23 $\pm$ 12.76	742.36 $\pm$ 11.34
cis-anteraxantina	24.29 $\pm$ 1.58	32.86 $\pm$ 1.90	26.06 $\pm$ 0.48
Anteraxantina	224.80 $\pm$ 9.26	312.47 $\pm$ 9.15	240.79 $\pm$ 17.64
Mutatoxantina	14.05 $\pm$ 1.28	13.42 $\pm$ 5.12	29.37 $\pm$ 1.64
Luteína	53.56 $\pm$ 4.69	60.20 $\pm$ 6.39	54.44 $\pm$ 4.21
Zeaxantina	36.88 $\pm$ 1.99	43.34 $\pm$ 3.40	51.47 $\pm$ 6.31
$\alpha$ -criptoxantina	43.53 $\pm$ 1.34	40.60 $\pm$ 1.79	52.30 $\pm$ 11.15
cis- $\beta$ -criptoxantina	-	-	-
$\beta$ -criptoxantina	120.09 $\pm$ 2.67	120.35 $\pm$ 2.51	153.05 $\pm$ 14.88
9-cis- $\alpha$ -caroteno	35.39 $\pm$ 1.59	28.27 $\pm$ 0.66	68.28 $\pm$ 1.93
$\alpha$ -caroteno	20.53 $\pm$ 0.08	35.30 $\pm$ 3.87	13.35 $\pm$ 1.34
Fitoeno + Fitoflueno	35.04 $\pm$ 0.06	14.29 $\pm$ 0.36	53.66 $\pm$ 9.96
$\beta$ -caroteno	33.21 $\pm$ 1.13	9.67 $\pm$ 2.11	57.36 $\pm$ 3.54
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	22.04 $\pm$ 1.56	11.76 $\pm$ 2.02	39.14 $\pm$ 6.75
Carotenoides Totales (real)	1878.97 $\pm$ 12.01	1896.01 $\pm$ 7.66	2203.59 $\pm$ 9.87
Carotenoides Totales (450nm)	1404.80 $\pm$ 6.76	1579.50 $\pm$ 8.28	1916.89 $\pm$ 6.41
<b>Vitamina A</b>	<b>17.22<math>\pm</math>2.24</b>	<b>14.53<math>\pm</math>0.54</b>	<b>23.39<math>\pm</math>0.43</b>

Cuadro n° 33. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navel. Tiempo de recolección: 14 días.

<b>Tiempo de Recolección: 14 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	621.26 $\pm$ 6.00	723.06 $\pm$ 14.72	582.09 $\pm$ 9.37
cis-anteraxantina	24.50 $\pm$ 0.32	29.11 $\pm$ 2.50	25.16 $\pm$ 0.72
Anteraxantina	229.06 $\pm$ 4.49	271.14 $\pm$ 11.71	217.88 $\pm$ 11.31
Mutatoxantina	11.67 $\pm$ 2.65	15.93 $\pm$ 1.05	4.99 $\pm$ 0.92
Luteína	43.56 $\pm$ 1.20	41.44 $\pm$ 7.82	44.59 $\pm$ 4.04
Zeaxantina	36.56 $\pm$ 0.01	43.73 $\pm$ 8.97	29.65 $\pm$ 1.30
$\alpha$ -criptoxantina	41.64 $\pm$ 0.56	21.61 $\pm$ 0.76	48.03 $\pm$ 2.38
cis- $\beta$ -criptoxantina	-	-	-
$\beta$ -criptoxantina	86.04 $\pm$ 96	55.10 $\pm$ 1.00	115.34 $\pm$ 0.38
9-cis- $\alpha$ -caroteno	42.62 $\pm$ 3.20	23.60 $\pm$ 0.62	63.91 $\pm$ 5.23
$\alpha$ -caroteno	20.49 $\pm$ 5.51	2.53 $\pm$ 0.80	50.22 $\pm$ 6.02
Fitoeno + Fitoflueno	17.54 $\pm$ 7.08	10.54 $\pm$ 3.59	34.72 $\pm$ 1.01
$\beta$ -caroteno	18.83 $\pm$ 7.42	17.64 $\pm$ 2.15	48.20 $\pm$ 0.28
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	25.59 $\pm$ 5.86	16.12 $\pm$ 0.06	36.16 $\pm$ 5.53
Carotenoides Totales (real)	1519.88 $\pm$ 5.67	1550.60 $\pm$ 9.89	1692.77 $\pm$ 8.02
Carotenoides Totales (450nm)	1252.19 $\pm$ 7.66	1325.29 $\pm$ 3.76	1284.43 $\pm$ 2.98
<b>Vitamina A</b>	<b>11.99<math>\pm</math>0.51</b>	<b>7.73<math>\pm</math>1.44</b>	<b>21.79<math>\pm</math>1.41</b>

Cuadro n° 34. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navel. Tiempo de recolección: 28 días.

<b>Tiempo de Recolección: 28 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	895.22 $\pm$ 96.36	642.76 $\pm$ 7.96	645.29 $\pm$ 35.75
cis-anteraxantina	33.49 $\pm$ 5.56	28.35 $\pm$ 1.84	30.05 $\pm$ 1.85
Anteraxantina	294.00 $\pm$ 30.61	233.47 $\pm$ 12.13	350.89 $\pm$ 47.82
Mutatoxantina	25.44 $\pm$ 4.85	9.48 $\pm$ 0.58	17.90 $\pm$ 1.04
Luteína	60.93 $\pm$ 3.23	57.94 $\pm$ 5.14	65.29 $\pm$ 4.83
Zeaxantina	53.88 $\pm$ 1.50	37.78 $\pm$ 0.38	56.30 $\pm$ 1.87
$\alpha$ -criptoxantina	50.14 $\pm$ 1.29	57.05 $\pm$ 1.50	56.30 $\pm$ 2.84
cis- $\beta$ -criptoxantina	-	-	-
$\beta$ -criptoxantina	103.07 $\pm$ 18.38	113.93 $\pm$ 5.22	149.16 $\pm$ 15.66
9-cis- $\alpha$ -caroteno	52.05 $\pm$ 1.73	78.95 $\pm$ 5.35	22.09 $\pm$ 13.32
$\alpha$ -caroteno	34.75 $\pm$ 2.21	58.23 $\pm$ 1.80	35.80 $\pm$ 0.89
Fitoeno + Fitoflueno	44.13 $\pm$ 4.07	52.14 $\pm$ 0.34	25.53 $\pm$ 0.26
$\beta$ -caroteno	61.07 $\pm$ 1.15	50.22 $\pm$ 5.28	29.26 $\pm$ 0.18
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	20.85 $\pm$ 4.96	35.51 $\pm$ 1.26	18.84 $\pm$ 0.51
Carotenoides Totales (real)	2349.75 $\pm$ 3.76	1855.20 $\pm$ 17.02	2000.12 $\pm$ 14.86
Carotenoides Totales (450nm)	1954.53 $\pm$ 4.67	1432.20 $\pm$ 5.63	901.29 $\pm$ 7.98
<b>Vitamina A</b>	<b>21.64<math>\pm</math>1.05</b>	<b>22.68<math>\pm</math>1.02</b>	<b>20.24<math>\pm</math>1.89</b>

*Navel-Lane*

Cuadro n° 35. Valores de relación zumo/peso, pH, °Brix y vitamina C en navel-lane.

<b>Recolección (días)</b>	<b>Almacenamiento (días)</b>	<b>Zumo/peso (mL/100g)</b>	<b>pH</b>	<b>°Brix</b>	<b>Vitamina C (mg/100mL)</b>
0	0	55.47±0.02	3.43±0.02	10.8±0.1	51.80±0.69
0	15	57.35±0.04	3.46±0.01	10.8±0.1	53.88±0.74
0	30	58.11±0.01	3.50±0.02	10.6±0.2	53.23±0.82
14	0	55.89±0.01	3.63±0.02	11.0±0.1	49.80±0.06
14	15	56.84±0.04	3.79±0.01	11.6±0.1	51.18±0.40
14	30	56.94±0.04	3.69±0.01	12.5±0.2	56.19±1.00
28	0	56.82±0.01	3.59±0.01	11.8±0.1	45.58±1.64
28	15	55.18±0.01	3.52±0.02	11.6±0.1	45.90±0.76
28	30	55.09±0.06	3.68±0.01	11.6±0.1	45.64±1.71

Los °Brix aumentan y el contenido de vitamina C disminuye con el tiempo de recolección.

Cuadro n° 36. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navel-lane. Tiempo de recolección: 0 días.

<b>Tiempo de Recolección: 0 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	693.83±96.96	532.88±61.10	806.39±60.76
cis-anteraxantina	22.77±2.13	18.81±1.13	26.62±3.66
Anteraxantina	206.23±25.68	148.35±18.65	246.68±37.38
Mutatoxantina	9.99±5.70	16.83±2.89	10.59±4.29
Luteína	44.20±2.37	39.99±11.70	48.62±7.71
Zeaxantina	32.57±0.22	29.31±4.13	33.11±1.95
$\alpha$ -criptoxantina	29.17±0.08	40.00±2.99	34.60±4.93
cis- $\beta$ -criptoxantina	-	-	-
$\beta$ -criptoxantina	91.38±1.14	79.29±16.20	95.63±13.36
9-cis- $\alpha$ -caroteno	34.45±3.48	20.33±1.02	50.48±5.44
$\alpha$ -caroteno	8.98±2.72	14.60±4.07	37.91±2.96
Fitoeno + Fitoflueno	24.33±5.73	31.55±4.16	43.67±0.91
$\beta$ -caroteno	24.58±8.00	18.56±2.79	43.10±3.26
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	7.57±1.62	6.25±1.77	14.26±0.82
Carotenoides Totales (real)	1596.72±5.63	1469.78±6.65	1565.00±9.06
Carotenoides Totales (450nm)	1176.79±3.32	1052.41±1.23	1187.46±3.24
<b>Vitamina A</b>	<b>12.44±1.01</b>	<b>10.89±0.54</b>	<b>18.28±1.41</b>

Cuadro n° 37. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navel-lane. Tiempo de recolección: 14 días.

<b>Tiempo de Recolección: 14 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	736.47 $\pm$ 18.35	815.97 $\pm$ 5.34	554.71 $\pm$ 18.75
cis-anteraxantina	27.32 $\pm$ 2.61	30.31 $\pm$ 3.49	21.10 $\pm$ 2.43
Anteraxantina	266.30 $\pm$ 0.22	268.81 $\pm$ 11.46	185.24 $\pm$ 24.07
Mutatoxantina	16.47 $\pm$ 3.80	18.83 $\pm$ 3.72	15.70 $\pm$ 0.62
Luteína	51.60 $\pm$ 0.70	44.42 $\pm$ 3.78	37.27 $\pm$ 4.69
Zeaxantina	45.27 $\pm$ 0.98	45.55 $\pm$ 2.86	33.97 $\pm$ 2.48
$\alpha$ -criptoxantina	33.42 $\pm$ 2.50	46.01 $\pm$ 2.93	41.17 $\pm$ 0.03
cis- $\beta$ -criptoxantina	-	-	-
$\beta$ -criptoxantina	131.20 $\pm$ 26.36	174.22 $\pm$ 2.81	138.30 $\pm$ 1.92
9-cis- $\alpha$ -caroteno	23.59 $\pm$ 3.83	38.79 $\pm$ 6.55	77.10 $\pm$ 2.39
$\alpha$ -caroteno	13.11 $\pm$ 2.97	44.13 $\pm$ 6.92	49.66 $\pm$ 7.51
Fitoeno + Fitoflueno	36.79 $\pm$ 10.90	61.96 $\pm$ 0.02	37.08 $\pm$ 1.71
$\beta$ -caroteno	23.28 $\pm$ 8.01	62.71 $\pm$ 1.56	44.68 $\pm$ 2.72
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	11.08 $\pm$ 2.56	23.28 $\pm$ 5.10	18.90 $\pm$ 2.60
Carotenoides Totales (real)	1704.20 $\pm$ 6.65	2088.79 $\pm$ 11.21	1658.78 $\pm$ 5.26
Carotenoides Totales (450nm)	1433.72 $\pm$ 7.01	1661.07 $\pm$ 2.92	1174.46 $\pm$ 1.66
<b>Vitamina A</b>	<b>15.86<math>\pm</math>3.77</b>	<b>28.60<math>\pm</math>0.60</b>	<b>23.06<math>\pm</math>0.92</b>

Cuadro n° 38. Contenido de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en navel-lane. Tiempo de recolección: 28 días.

<b>Tiempo de Recolección: 28 días</b>			
<b>Carotenoides</b>	<b>Tiempo almacenamiento</b>		
	<b>0 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>
9-cis-violaxantina+Neoxantina	663.04 $\pm$ 1.05	711.33 $\pm$ 19.78	787.74 $\pm$ 34.90
cis-anteraxantina	14.39 $\pm$ 1.11	26.56 $\pm$ 1.56	30.93 $\pm$ 2.60
Anteraxantina	193.73 $\pm$ 3.46	229.58 $\pm$ 14.42	310.38 $\pm$ 19.68
Mutatoxantina	25.60 $\pm$ 0.89	25.21 $\pm$ 3.25	16.88 $\pm$ 2.15
Luteína	41.04 $\pm$ 1.14	38.86 $\pm$ 3.59	49.14 $\pm$ 1.47
Zeaxantina	41.71 $\pm$ 2.95	39.02 $\pm$ 7.11	44.71 $\pm$ 0.30
$\alpha$ -criptoxantina	62.99 $\pm$ 6.48	40.71 $\pm$ 15.11	47.99 $\pm$ 1.40
cis- $\beta$ -criptoxantina	-	-	-
$\beta$ -criptoxantina	134.41 $\pm$ 4.02	97.08 $\pm$ 4.76	126.12 $\pm$ 0.75
9-cis- $\alpha$ -caroteno	104.63 $\pm$ 5.48	33.64 $\pm$ 5.28	26.10 $\pm$ 4.68
$\alpha$ -caroteno	75.49 $\pm$ 4.04	41.46 $\pm$ 2.68	33.29 $\pm$ 2.13
Fitoeno + Fitoflueno	72.08 $\pm$ 2.05	31.40 $\pm$ 6.99	18.09 $\pm$ 3.25
$\beta$ -caroteno	71.11 $\pm$ 1.05	37.91 $\pm$ 2.04	19.94 $\pm$ 4.33
13-cis- $\beta$ -caroteno	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	-	-	-
9-cis- $\beta$ -caroteno	30.57 $\pm$ 3.94	19.85 $\pm$ 1.48	10.00 $\pm$ 0.30
Carotenoides Totales (real)	2020.55 $\pm$ 14.21	1851.75 $\pm$ 4.36	1741.91 $\pm$ 8.43
Carotenoides Totales (450nm)	1566.49 $\pm$ 6.66	1290.38 $\pm$ 1.21	753.87 $\pm$ 3.27
<b>Vitamina A</b>	<b>29.30<math>\pm</math>0.18</b>	<b>17.83<math>\pm</math>1.29</b>	<b>16.56<math>\pm</math>0.41</b>

**Evolución del contenido de vitaminas C y A, pH, °Brix y relación zumo/peso durante la recolección y el almacenamiento de distintas variedades de naranjas y mandarinas.**

Se aplica un análisis de la varianza (ANOVA) multifactorial a los resultados obtenidos, para las muestras analizadas, para comprobar si existen diferencias significativas en los parámetros estudiados en función de la variedad, la recolección y el almacenamiento.

**Vitamina C**

Al aplicar el análisis de la varianza a los resultados obtenidos, se hallan diferencias significativas en el contenido de vitamina C entre las distintas variedades de cítricos ( $p < 0.01$ ) siendo mayor el contenido de vitamina C en las naranjas (51.2 mg/100mL) que en las mandarinas (40.3 mg/100mL). En la figura nº 15 se muestra gráficamente la media de cada una de las variedades. No existen diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) según la fecha de recolección (figura nº 16), ni tampoco existen diferencias ( $p > 0.05$ ) en la concentración de vitamina C en los distintos periodos de almacenamiento.

El análisis de la varianza de más de un factor (cuadro nº 39) permite poner de manifiesto la existencia de interacciones entre los efectos de los factores estudiados (variedad, recolección y almacenamiento):

Factor A: recolección (0, 14 y 28 días).

Factor B: almacenamiento (0, 15 y 30 días).

Factor C: variedad (clemenules, clemenvilla, fortuna, navelina, navel y navel-lane).

Figura n° 15. Concentración media de vitamina C (mg/100mL) para cada variedad estudiada.

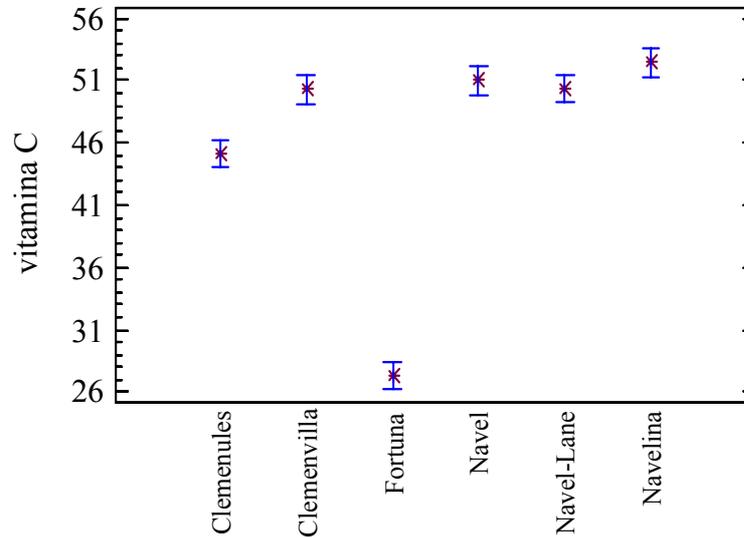
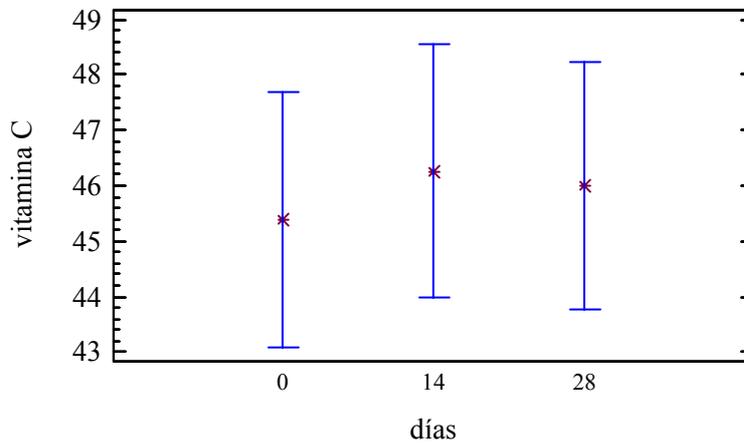


Figura n° 16. Concentración media de vitamina C (mg/100mL) según la fecha de recolección.



Se llevan a cabo comparaciones entre cada variedad de naranja y mandarina con los tres tiempos de recolección, y con los tres tiempos de almacenamiento. En el cuadro n° 39 se muestran los resultados obtenidos, se constata una interacción significativa en las tres comparaciones realizadas.

Se detecta una interacción significativa entre el tiempo de recolección (0, 14 y 28 días) y el de almacenamiento (0, 15 y 30 días). La concentración de vitamina C aumenta durante el almacenamiento en la primera recolección, mientras que en la segunda (14 días) y tercera (28 días) disminuye, de forma más acusada en esta última (figura n° 17).

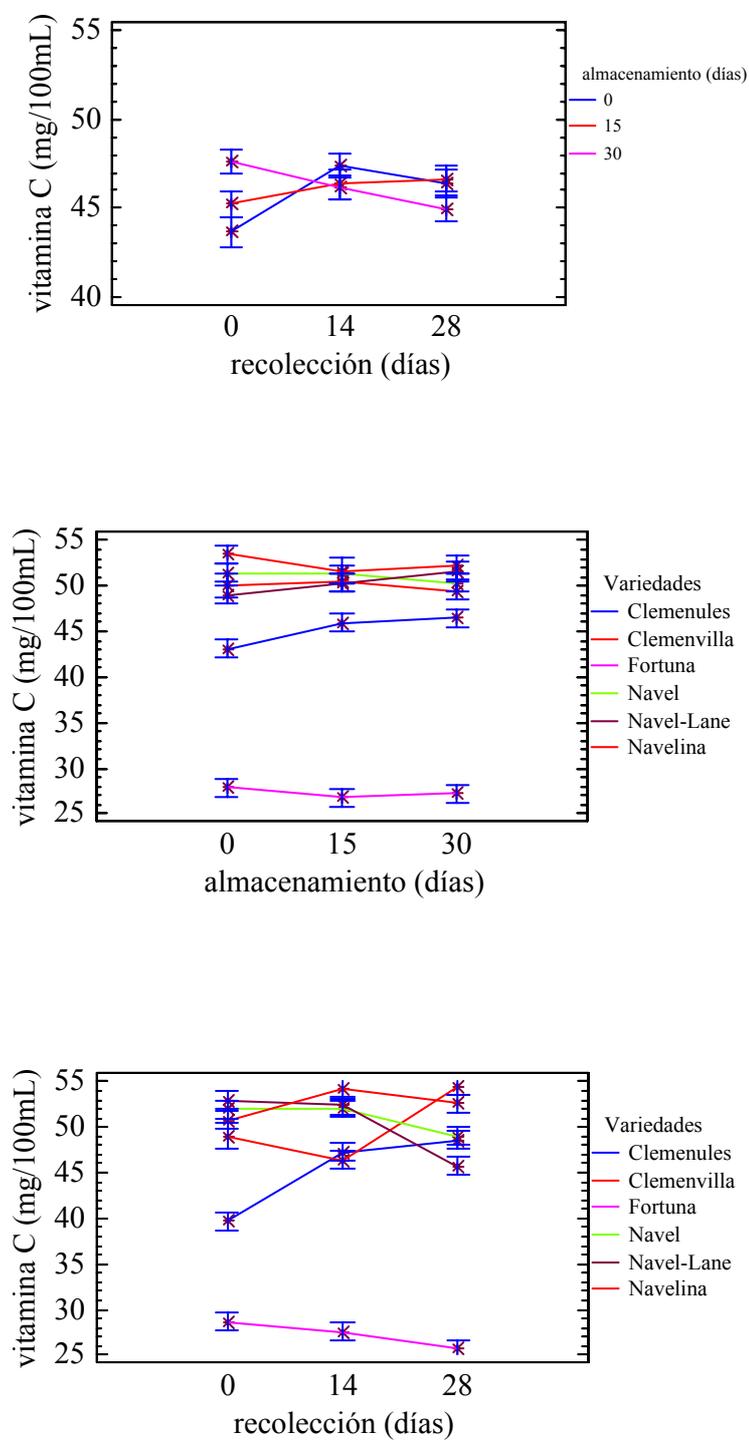
La concentración de vitamina C varía en las diferentes variedades estudiadas durante la recolección, así en clemenules, clemenvilla y navelina dependiendo de la fecha de recolección la concentración de vitamina C aumenta en distinto grado, mientras que en las otras tres variedades disminuye. Durante el almacenamiento el comportamiento también es distinto, observándose un descenso en la concentración con el tiempo de almacenamiento en todas las variedades excepto en clemenules y navelane (véanse figuras n° 18-29).

En el cuadro n° 40 se muestran los modelos obtenidos (estadísticamente significativos) al realizar un análisis de regresión múltiple, para cada una de las variedades estudiadas, que nos indican la influencia de las fechas de recolección y del tiempo de almacenamiento.

Cuadro n° 39. Vitamina C. Análisis multifactorial de los resultados.

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<i>A: recolección</i>	20.2035	2	10.1018	3.49	0.0360
<i>B: almacenamiento</i>	2.6577	2	1.3289	0.46	0.6339
<i>C: variedad</i>	7866.95	5	1573.39	543.33	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
<i>AB</i>	114.331	4	28.5829	9.87	0.0000
<i>AC</i>	750.137	10	75.0137	25.90	0.0000
<i>BC</i>	76.3846	10	7.6385	2.64	0.0087
Residual	202.706	70	2.8958		
Total (corregido)	9217.11	103			

Figura nº 17. Vitamina C. Interacciones entre los factores: variedad, recolección y almacenamiento.



Cuadro nº 40. Vitamina C. Modelos obtenidos.

Variedad	Modelo	R <sup>2</sup>	Error
Clemenules	VitC= 39.0278 + 0.316726 R + 0.113056 A	70.6	2.7
Clemenvilla	VitC= 47.1142 + 0.201081 R	32.1	3.4
Fortuna	VitC= 28.8125 - 0.106607 R	40.1	1.6
Navelina	-	-	-
Navel	VitC= 52.515 - 0.1075 R	50.6	1.3
Navel-lane	VitC= 52.6739 - 0.259464 R + 0.0875 A	70.4	1.6

*R: fecha de recolección (0, 14 y 28 días)*

*A: tiempo de almacenamiento (0, 15 y 30 días)*

### Evolución de la vitamina C en mandarinas

Figura nº 18. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en clemenules.

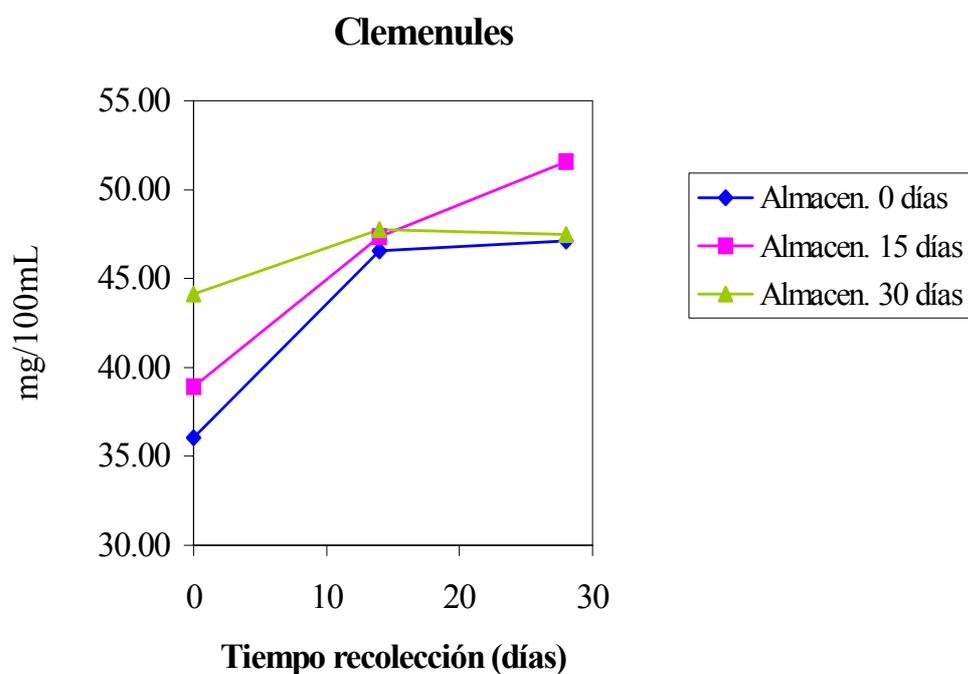


Figura nº 19. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en clemenules.

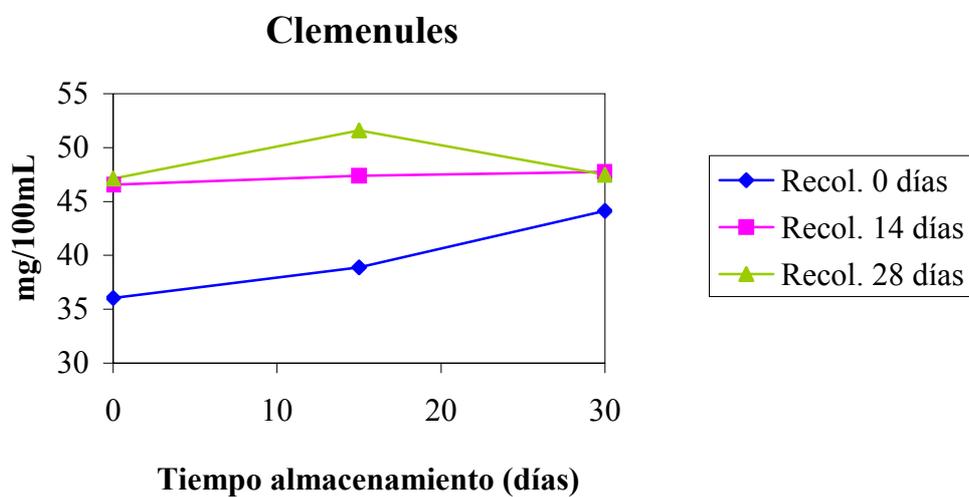


Figura nº 20. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en clemenvilla.

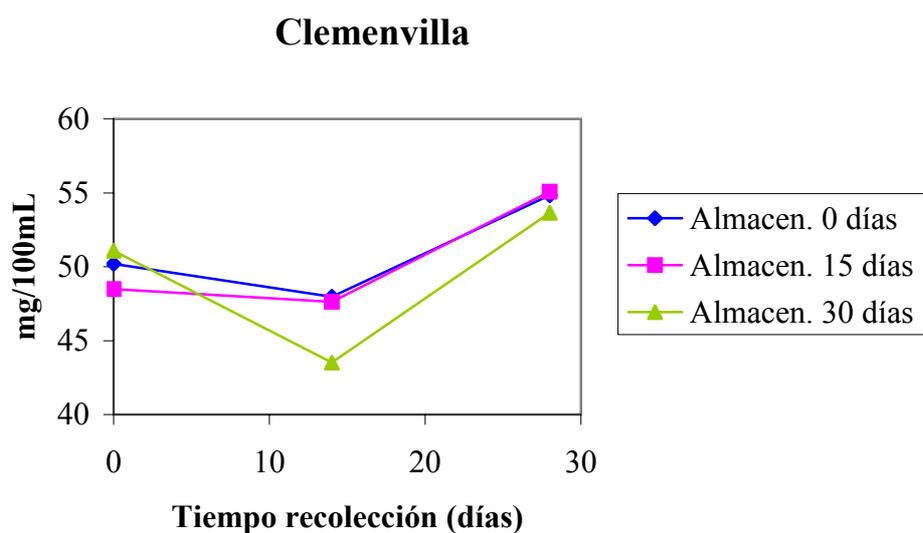


Figura nº 21. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en clemenvilla.

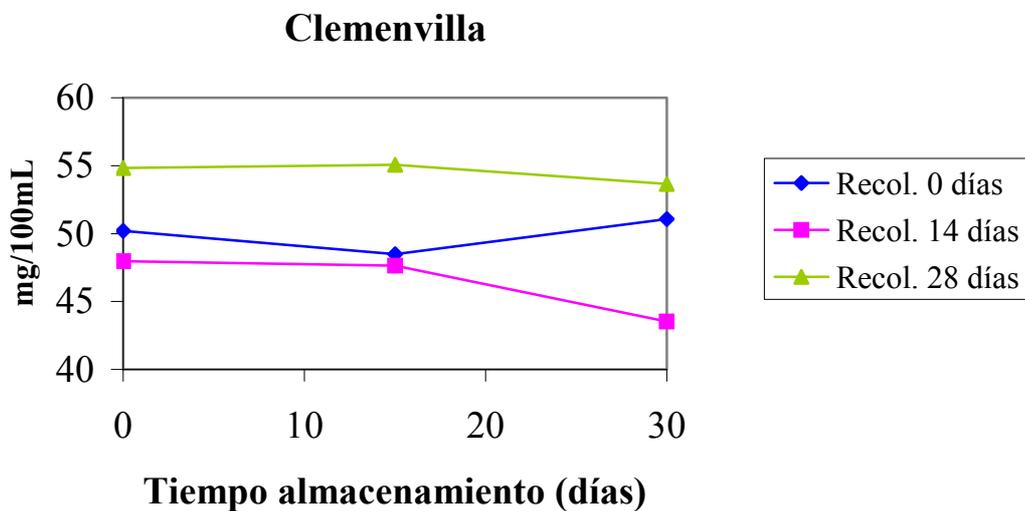


Figura nº 22. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en fortuna.

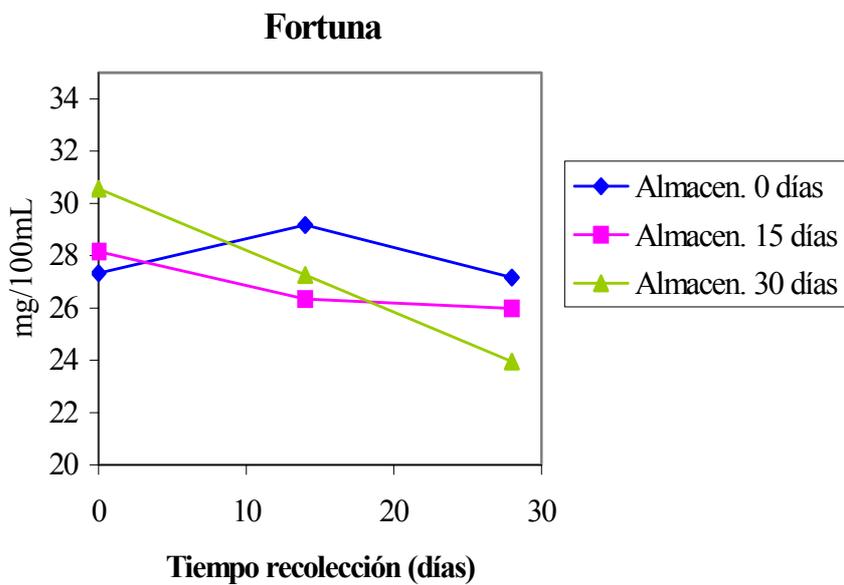
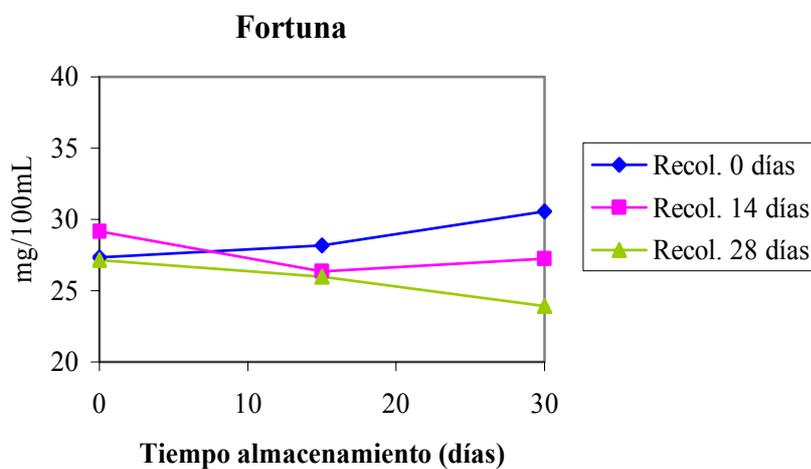


Figura nº 23. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en fortuna.



### Evolución de la vitamina C en naranjas

Figura nº 24. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en navelina.

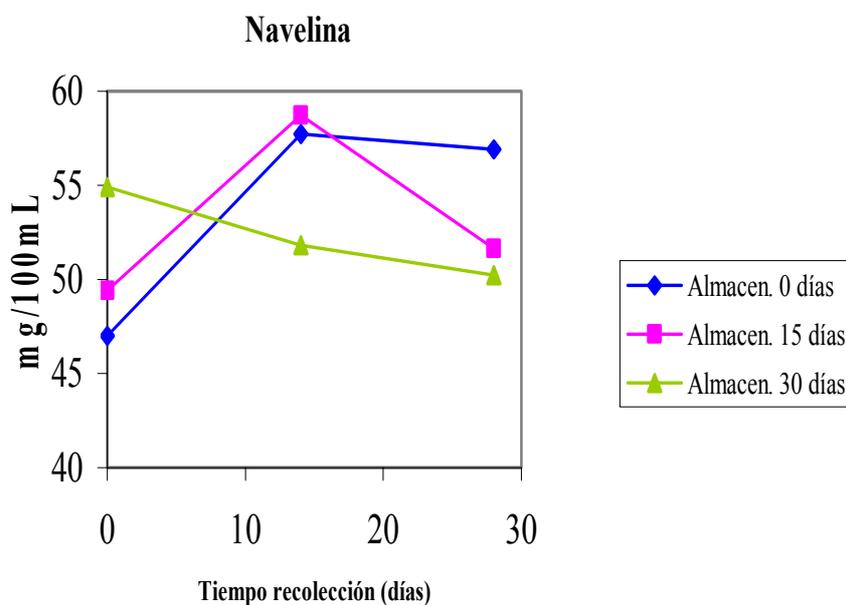


Figura nº 25. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en navelina.

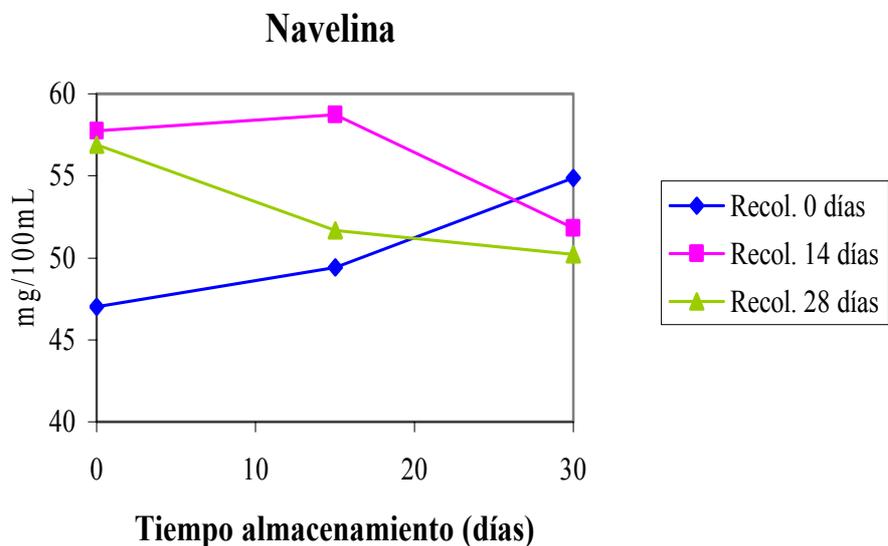


Figura nº 26. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en navel.

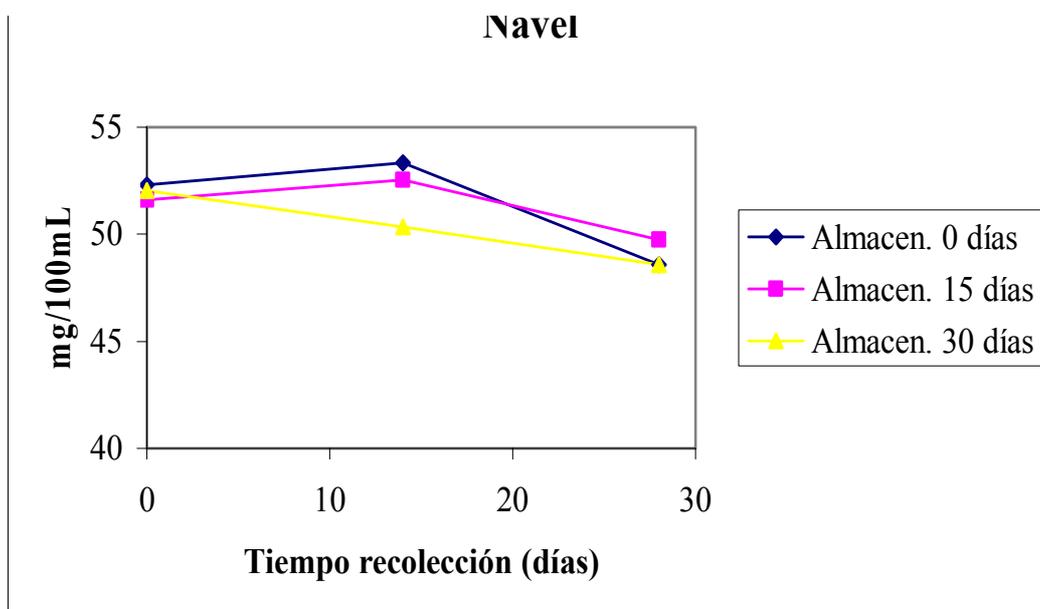


Figura nº 27. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en navel.

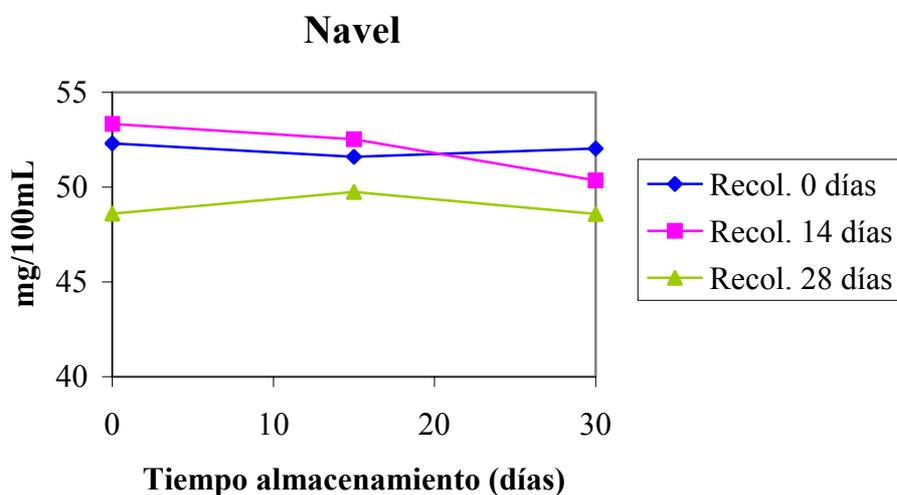


Figura nº 28. Evolución de la vitamina C con el tiempo de recolección en navel-lane.

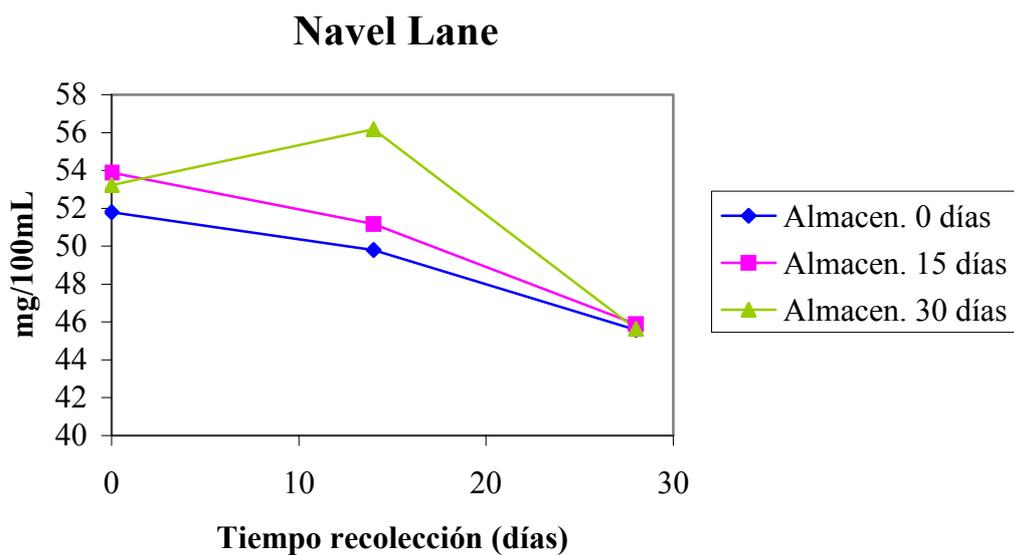
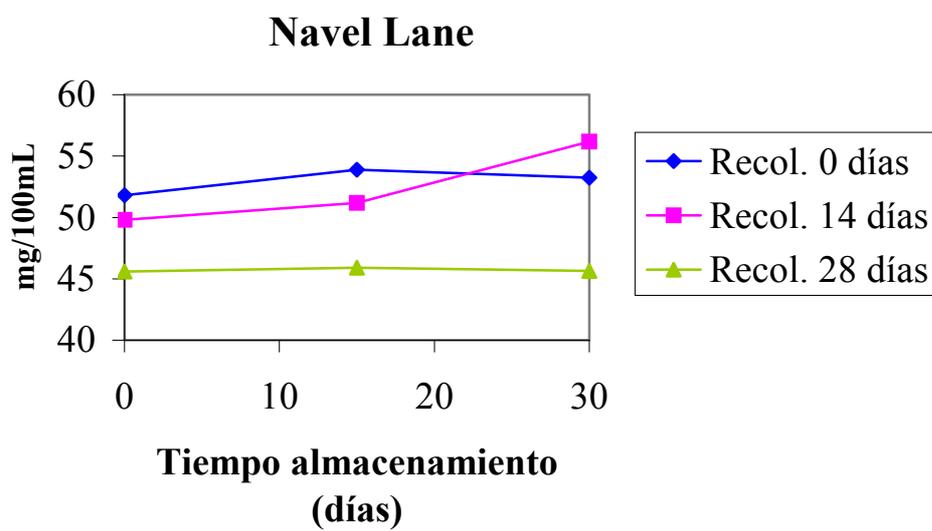


Figura nº 29. Evolución de la vitamina C con el tiempo de almacenamiento en navel-lane.



### Vitamina A

Al aplicar el análisis de la varianza a los resultados obtenidos, se hallan diferencias significativas en el contenido de vitamina A entre las distintas variedades de cítricos ( $p < 0.01$ ), siendo mayor en las mandarinas ( $46.6 \pm 2.4$  equivalentes de retinol) que en las naranjas ( $14.4 \pm 2.3$  equivalentes de retinol). En la figura nº 30 se muestra gráficamente la media de cada una de las variedades. Existen diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) según la fecha de recolección (figura nº 31), sin embargo no existen estas diferencias ( $p > 0.05$ ) durante el almacenamiento.

El análisis de la varianza de más de un factor realizado (cuadro nº 41) nos indica que no existen interacciones significativas ( $p > 0.05$ ) entre ninguno de los tres factores estudiados (recolección 0, 14 y 28 días; almacenamiento 0, 15 y 30 días; variedad clemenules, clemenvilla, fortuna, navelina, navel y navel-lane) (véase figura nº 32).

Al realizar un análisis de regresión múltiple para cada una de las variedades de naranjas y mandarinas estudiadas, sólo clemenules, clemenvilla y navelina se ajustan significativamente ( $p < 0.05$ ) a un modelo lineal, observándose que tanto la fecha de recolección como el almacenamiento incrementan la concentración de vitamina A (cuadro nº 42).

Figura nº 30. Concentración media de vitamina A ( $\mu\text{g RE}/100\text{g}$ ) para cada variedad estudiada.

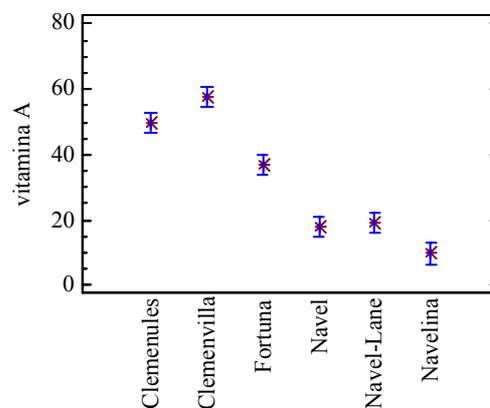
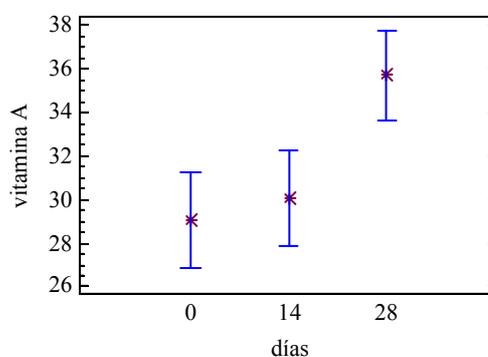


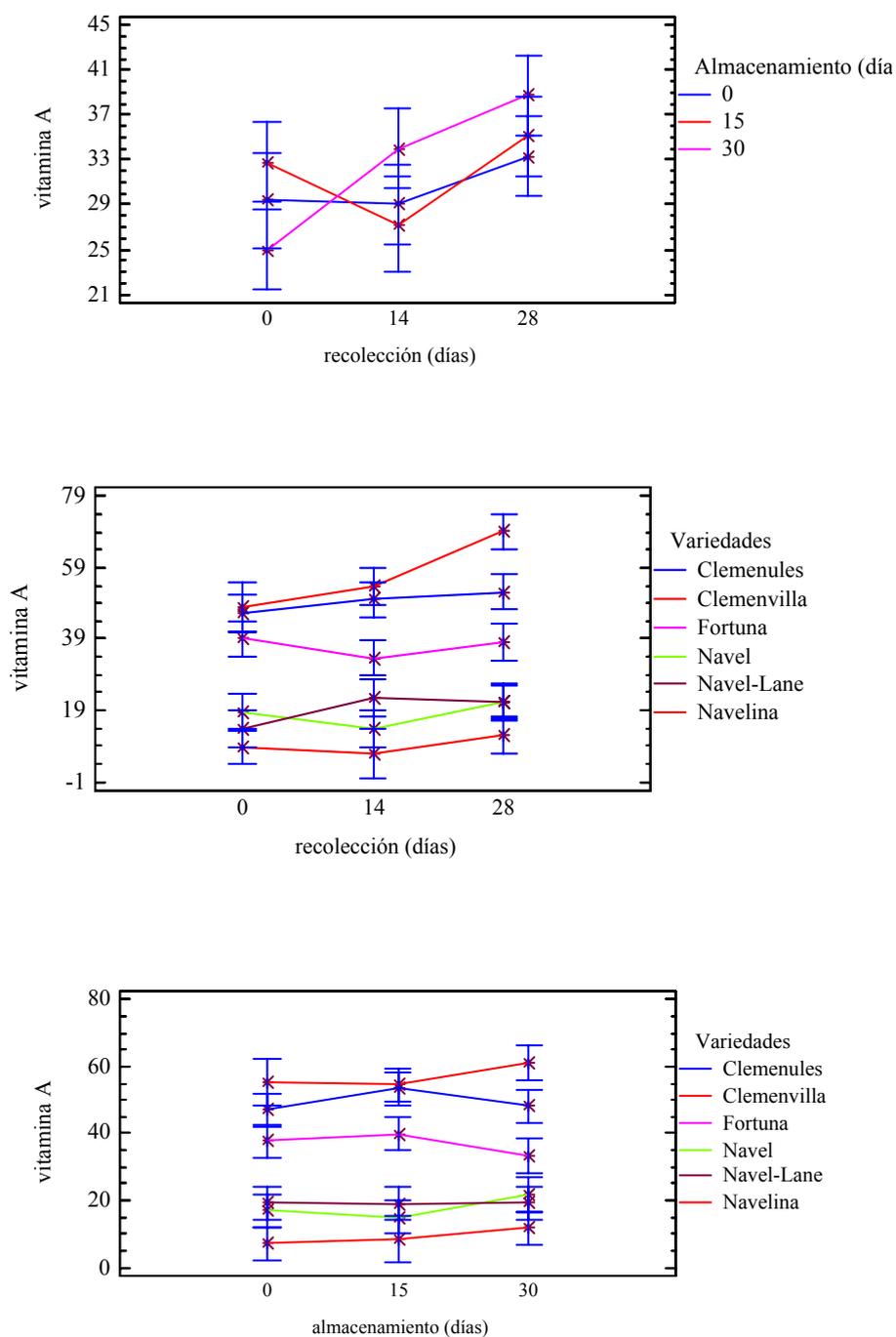
Figura n° 31. Concentración media de vitamina A ( $\mu\text{g RE}/100\text{g}$ ) según la fecha de recolección.



Cuadro n° 41. Vitamina A. Análisis multifactorial de los resultados.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p
<i>A: recolección</i>	877.429	2	438.715	5.79	0.0047
<i>B: almacenamiento</i>	65.2399	2	32.6199	0.43	0.6521
<i>C: variedad</i>	28534.5	5	76.27	75.27	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
<i>AB</i>	726.735	4	181.684	2.40	0.0584
<i>AC</i>	1105.34	10	110.534	1.46	0.1740
<i>BC</i>	28534.5	10	56.3188	0.74	0.6820
Residual	5307.35	70	75.8193		
Total (corregido)	39887.3	103			

Figura n° 32. Vitamina A. Interacciones entre los factores: variedad, recolección y almacenamiento.



Cuadro n° 42. Vitamina A. Modelos obtenidos.

Variedad	Modelo	R <sup>2</sup>	Error
Clemenules	VitA = 46.0844 + 0.210714 R + 0.0325556 A	27.5	17.8
Clemenvilla	VitA = 45.8758 + 0.780824 R	31.3	13.5
Fortuna	-	-	-
Navelina	VitA = 7.61417 + 0.152556 A	29.0	3.3
Navel	-	-	-
Navel-lane	-	-	-

*R: fecha de recolección (0, 14 y 28 días)*

*A: tiempo de almacenamiento (0, 15 y 30 días)*

## pH

Al realizar el ANOVA multifactorial de los valores de pH para cada una de las muestras estudiadas se obtiene que existen diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre las distintas variedades analizadas, no encontrándose diferencias significativas entre las mandarinas ( $3.45 \pm 0.03$ ) y las naranjas ( $3.52 \pm 0.03$ ). En la figura n° 33 se muestran gráficamente los resultados obtenidos para cada una de las variedades. También existen diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) según la fecha de recolección (figura n° 34) y el tiempo de almacenamiento (figura n° 35).

En el cuadro n° 43 se muestra el análisis de la varianza de más de un factor realizado, observándose que existe una interacción significativa entre la variedad y la fecha de recolección ( $p < 0.01$ ) y entre la variedad y el tiempo de almacenamiento ( $p < 0.01$ ). Al final de la recolección el pH disminuye en navelina, mientras que en navel, fortuna y clemenules aumenta (figura n° 36). Tal como puede verse en la figura n° 36, el pH aumenta durante el almacenamiento en todas las variedades, aunque clemenules y clemenvilla tienen un comportamiento distinto.

Si analizamos la influencia de la fecha de recolección y el tiempo de almacenamiento mediante un análisis de regresión múltiple para cada una de las variedades obtenemos que las variaciones del pH siguen un modelo lineal (cuadro n° 44).

Figura n° 33. Valor del pH para cada variedad estudiada.

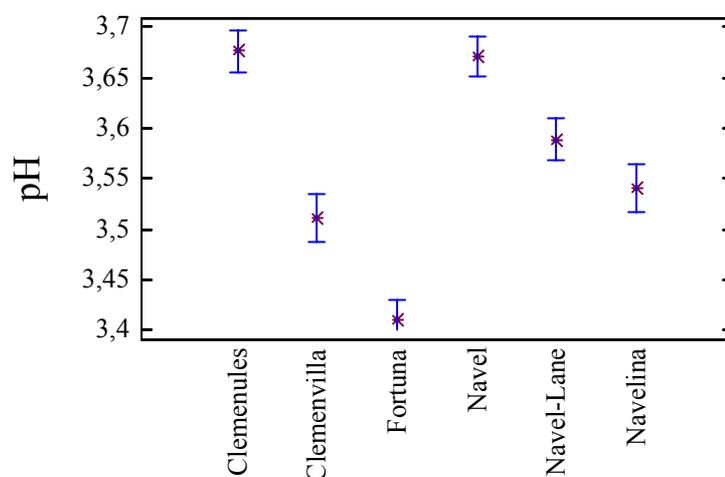


Figura n° 34. Valor del pH según la fecha de recolección.

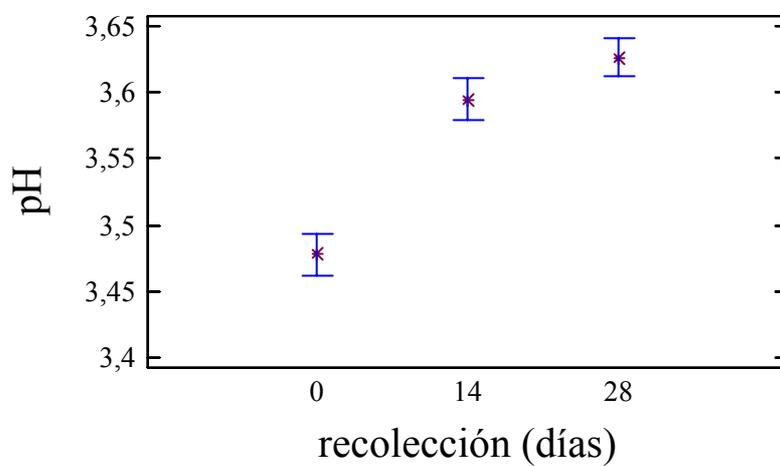
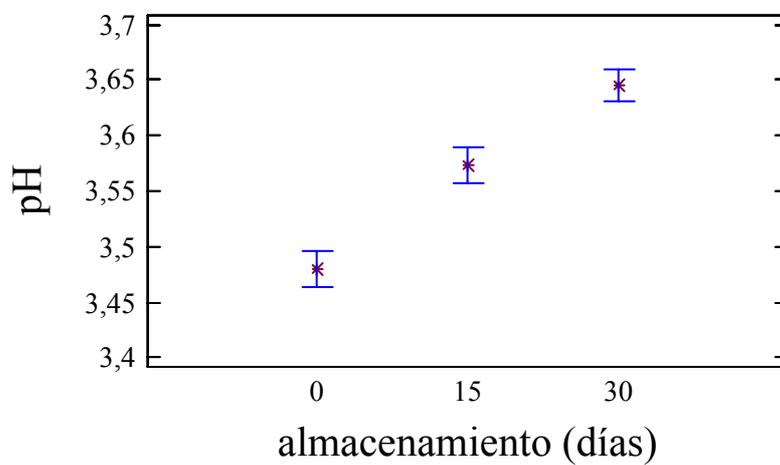


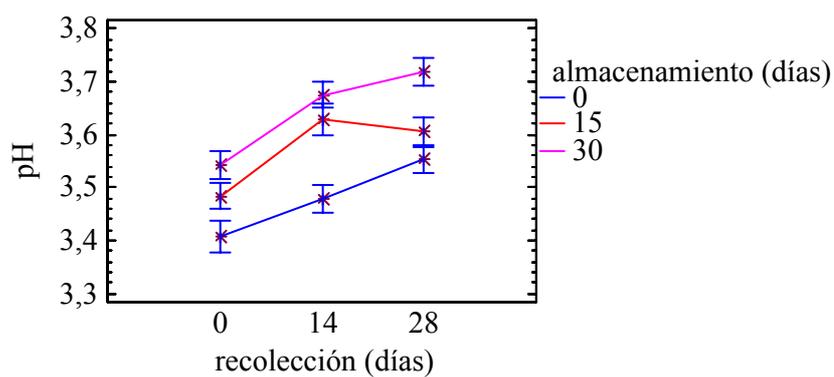
Figura n° 35. Valor del pH según el tiempo de almacenamiento.

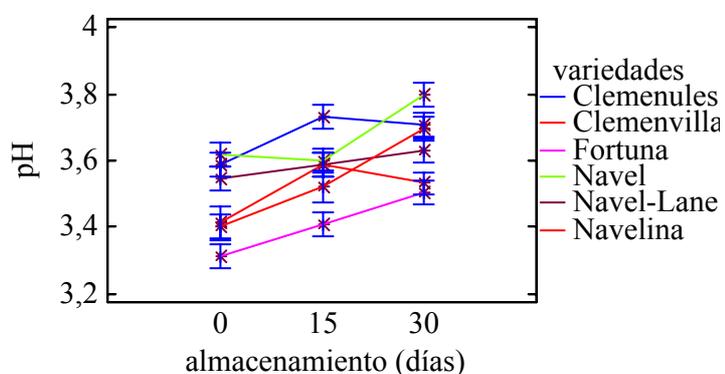
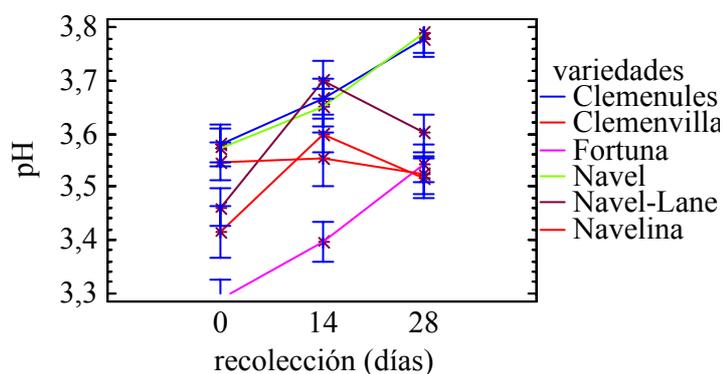


Cuadro n° 43. pH. Análisis multifactorial de los resultados.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p
<i>A: recolección</i>	0.3957	2	0.1978	51.44	0.0000
<i>B: almacenamiento</i>	0.4602	2	0.2301	59.82	0.0000
<i>C: variedad</i>	0.9137	5	0.1827	47.50	0.0000
INTERACCIONES					
<i>AB</i>	0.0327	4	0.0082	2.12	0.0869
<i>AC</i>	0.3020	10	0.3020	7.85	0.0000
<i>BC</i>	0.2118	10	0.0211	5.51	0.0000
Residual	0.2693	70	0.0038		0.0000
Total (corregido)	2.5763	103			

Figura n° 36. pH. Interacciones entre los factores: variedad, recolección y almacenamiento.





Cuadro n° 44. pH. Modelos obtenidos.

Variedad	Modelo	R <sup>2</sup>	Error
Clemenules	pH = 3.51611 + 0.00708333 R + 0.00405556 A	75.0	0.06
Clemenvilla	-	-	-
Fortuna	pH = 3.18667 + 0.00904762 R + 0.00644444 A	85.0	0.06
Navelina	pH = 3.40292 + 0.00988889 A	71.7	0.09
Navel	pH = 3.47194 + 0.0077381 R + 0.00605556 A	68.1	0.01
Navel-lane	pH = 3.4775 + 0.005 R	32.6	0.10

R: fecha de recolección (0, 14 y 28 días)

A: tiempo de almacenamiento (0, 15 y 30 días)

**°Brix**

Al aplicar el análisis de la varianza a los resultados obtenidos se obtiene que los °Brix de las distintas variedades presentan diferencias significativas, siendo mayor ( $p < 0.01$ ) en las mandarinas ( $12.7 \pm 0.2$ ) que en las naranjas ( $11.2 \pm 0.2$ ). Los °Brix de clemenvilla y fortuna son superiores ( $p < 0.01$ ) que el resto (véase figura nº 37). Se observan unas diferencias significativas a lo largo de la campaña de recolección, siendo significativamente mayor al final de la recolección (28 días) (figura nº 38). También se observa un incremento significativo a los 15 días de almacenamiento, volviendo a aumentar a los 30 días (figura nº 39).

El análisis de la varianza multifactorial permite poner de manifiesto la existencia de interacciones entre los factores estudiados. En el cuadro nº 45 se muestran los resultados obtenidos, observando que existen interacciones ( $p < 0.01$ ) entre las distintas variedades y la fecha de recolección (figura nº 40), observándose que a lo largo de la campaña de recolección los °Brix de navelina y navel disminuyen, no comportándose del mismo modo el resto de variedades.

Al realizar un análisis de regresión múltiple para poder predecir los °Brix dependiendo de la fecha de recolección y del almacenamiento y según la variedad, obtenemos unos modelos lineales que se muestran en el cuadro nº 46.

Figura nº 37. °Brix para cada variedad estudiada.

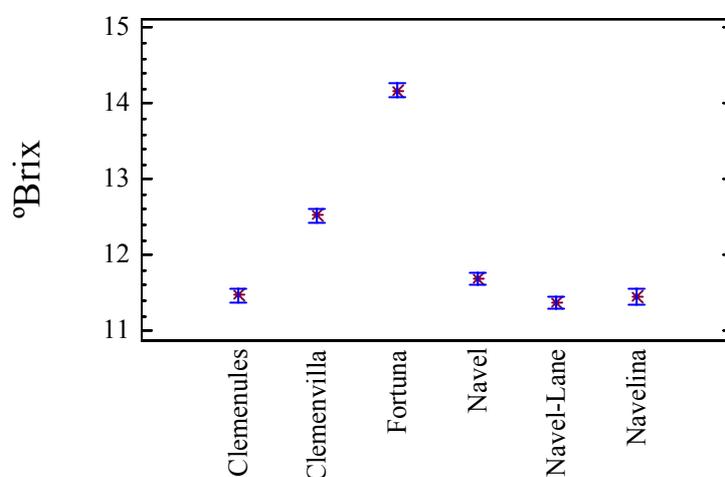


Figura nº 38. °Brix según la fecha de recolección.

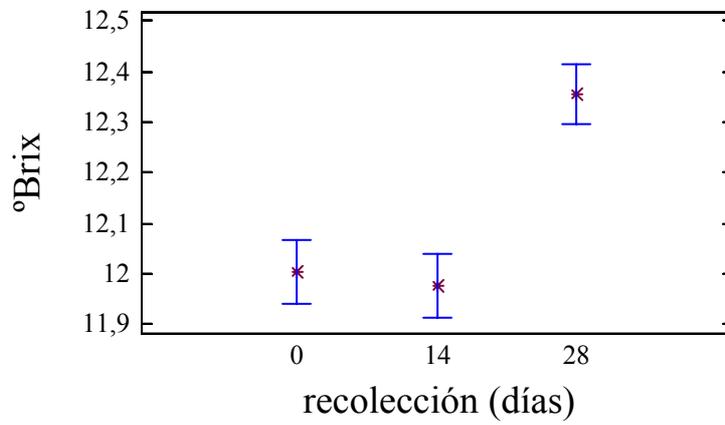
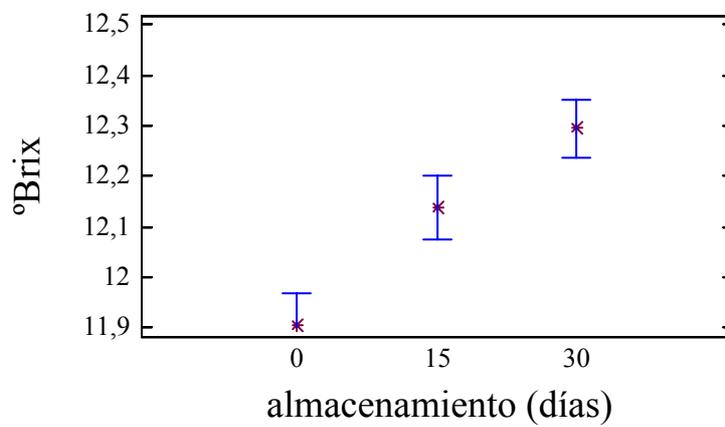


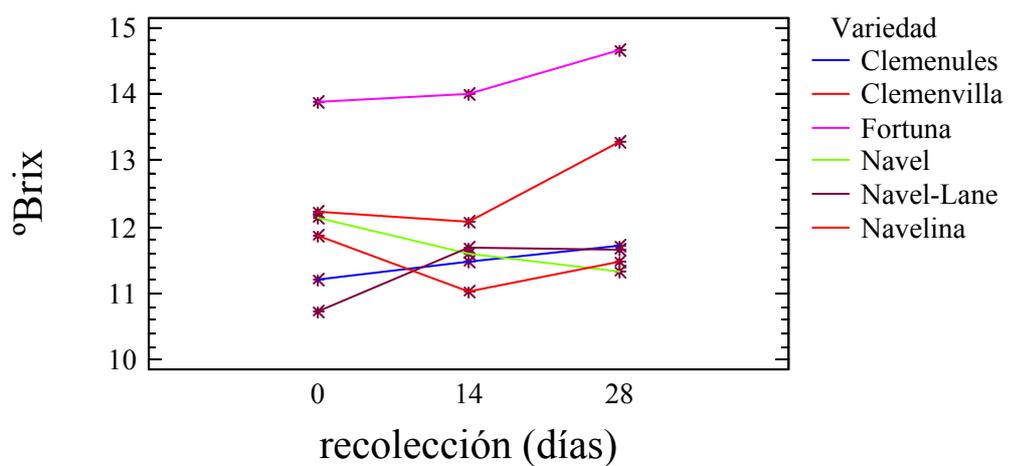
Figura nº 39. ° Brix según el tiempo de almacenamiento.



Cuadro n° 45. °Brix. Análisis multifactorial de los resultados.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p
<i>A: recolección</i>	3.0489	2	1.5245	24.36	0.0000
<i>B: almacenamiento</i>	2.554	2	1.277	20.41	0.0000
<i>C: variedad</i>	105.936	5	21.1872	338.59	0.0000
INTERACCIONES					
<i>AB</i>	0.4643	4	0.1161	1.85	0.1281
<i>AC</i>	12.2349	10	1.2235	19.55	0.0000
<i>BC</i>	0.7526	10	0.0752	1.20	0.3045
Residual	4.3802	70	0.0626		
Total (corregido)	131.333	103			

Figura n° 40. °Brix. Interacciones entre los factores: variedad y recolección.



Cuadro nº 46. °Brix. Modelos obtenidos.

Variedad	Modelo	R <sup>2</sup>	Error
Clemenules	°Brix = 11.0667 + 0.0190476 R + 0.0088889 A	66.7	0.19
Clemenvilla	°Brix = 11.66 + 0.0421429 R	59.7	0.41
Fortuna	°Brix = 13.5778 + 0.0285714 R + 0.0133333 A	66.8	0.28
Navelina	°Brix = 11.375 + 0.02 A	39.1	0.43
Navel	°Brix = 11.8889 - 0.0285714 R + 0.0133333 A	74.6	0.23
Navel-lane	°Brix = 10.7167 + 0.0333333 R + 0.0122222 A	50.3	0.45

*R: fecha de recolección (0, 14 y 28 días)*

*A: tiempo de almacenamiento (0, 15 y 30 días)*

### **Relación zumo/peso (v/p)**

Al aplicar el análisis de la varianza a los resultados obtenidos no se hallan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), en la relación zumo/peso (v/p) entre las mandarinas ( $51.5 \pm 1.5$ ) y las naranjas ( $53.1 \pm 1.4$ ), sin embargo sí que existen diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre cada una de las variedades. En la figura nº 41 se muestran los resultados obtenidos. Tal como puede observarse en el análisis realizado (cuadro nº 47) existen diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) en cuanto a la relación zumo/peso dependiendo de la fecha de recolección y también a lo largo del almacenamiento (figuras nº 42 y 43).

El análisis de la varianza multifactorial realizado permite poner de manifiesto la existencia de interacciones estadísticamente significativas entre el tiempo de recolección y el tiempo de almacenamiento ( $p < 0.05$ ), entre las variedades y el tiempo de recolección ( $p < 0.01$ ) y entre las variedades y el tiempo de almacenamiento ( $p < 0.01$ ).

Con la fecha de recolección disminuye la relación zumo/peso, aumentando en distinta proporción con el almacenamiento (figura nº 44).

Con el fin de poder predecir los cambios en la relación zumo/peso, de las distintas variedades de cítricos con la fecha de recolección y el tiempo de

almacenamiento, se realiza un análisis de regresión múltiple. En el cuadro nº 48 se muestran los modelos estadísticamente significativos obtenidos.

Figura nº 41. Relación zumo/peso (v/p) para cada variedad estudiada.

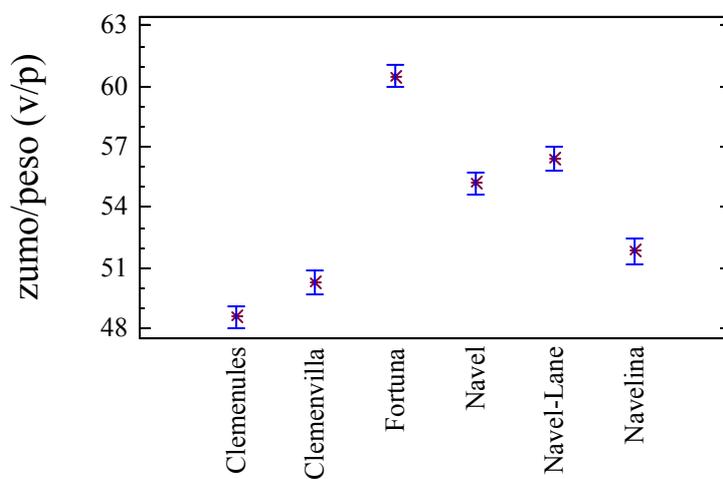


Figura nº 42. Relación zumo/peso (v/p) según la fecha de recolección.

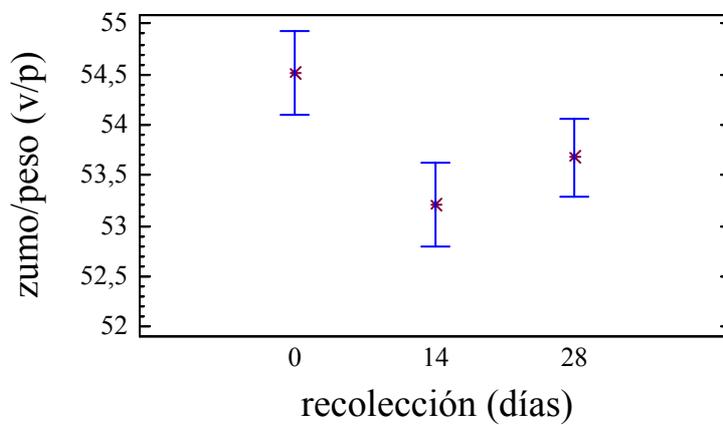
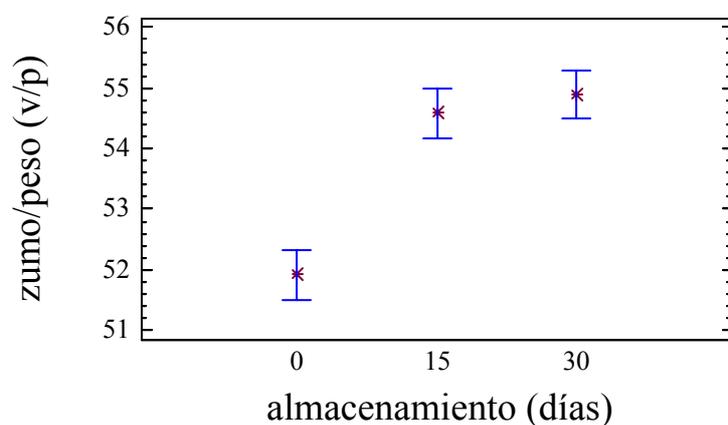


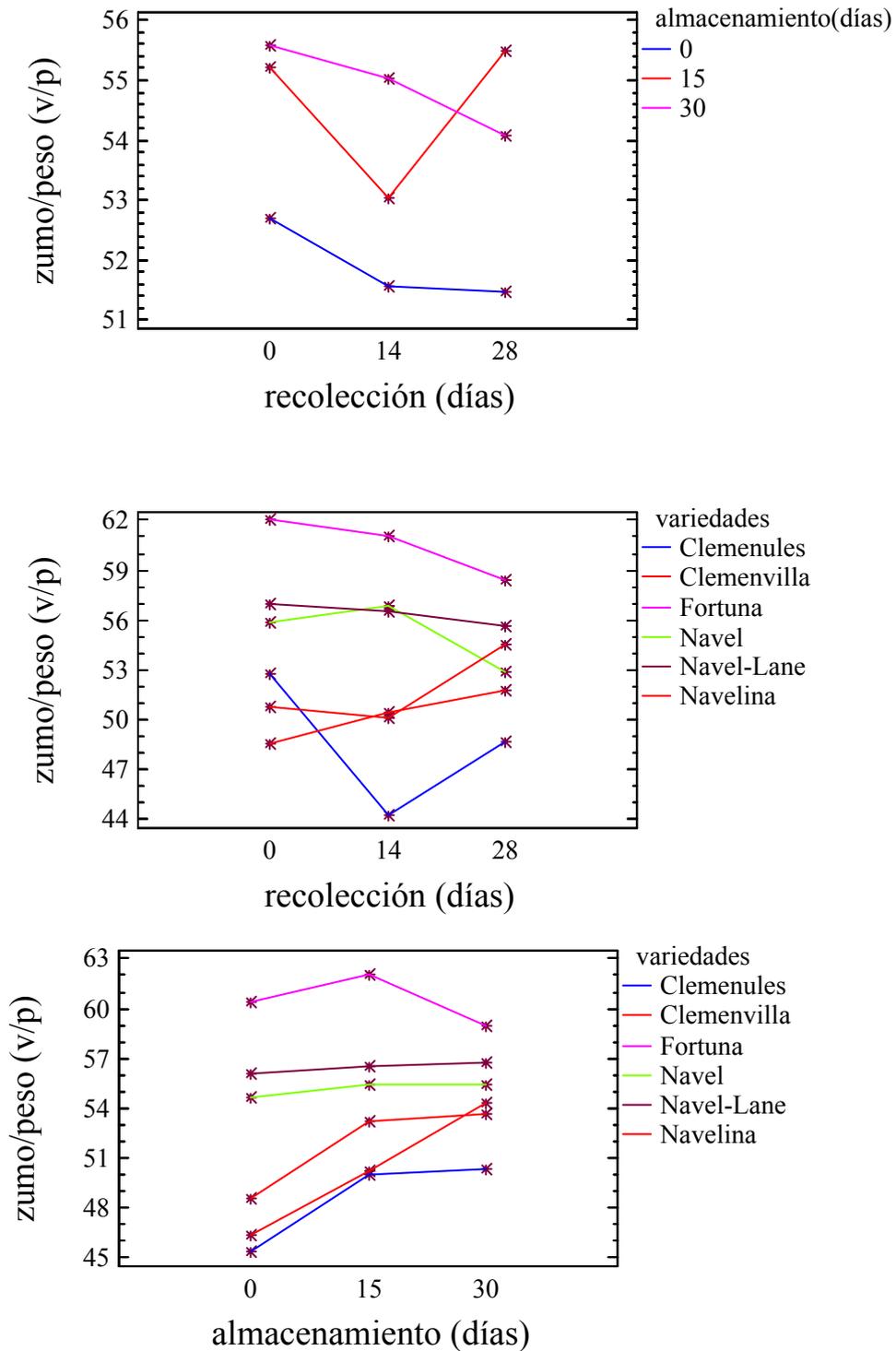
Figura n° 43. Relación zumo/peso (v/p) según el tiempo de almacenamiento.



Cuadro n° 47. Relación zumo/peso (v/p). Análisis multifactorial de los resultados.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p
<i>A: recolección</i>	26.8336	2	13.4168	4.95	0.0097
<i>B: almacenamiento</i>	173.135	2	86.5675	31.95	0.0000
<i>C: variedad</i>	1668.29	5	333.658	123.14	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
<i>AB</i>	33.8006	4	8.4501	3.12	0.0202
<i>AC</i>	359.521	10	35.9521	13.27	0.0000
<i>BC</i>	199.793	10	19.9793	7.37	0.0000
Residual	189.667	70	2.7095		
Total (corregido)	2605.02	103			

Figura nº 44. Relación zumo/peso (v/p). Interacciones entre los factores: variedad, recolección y almacenamiento.



Cuadro nº 48. Relación zumo/peso (v/p). Modelos obtenidos.

<b>Variedad</b>	<b>Modelo</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Error</b>
<b>Clemenules</b>	Zumo/peso = 48.0769 + 0.167444 A	37.0	3.7
<b>Clemenvilla</b>	Zumo/peso = 44.7195 + 0.26345 A	59.5	2.8
<b>Fortuna</b>	Zumo/peso = 63.0056 - 0.126905 R	39.5	2.1
<b>Navelina</b>	Zumo/peso= 47.5867 + 0.13381 R + 0.169167 A	59.6	2.5
<b>Navel</b>	Zumo/peso = 56.3619 - 0.109226 R	46.8	1.5
<b>Navel-lane</b>	Zumo/peso = 56.7478 - 0.0466667 R	35.5	0.9

*R: fecha de recolección (0, 14 y 28 días)*

*A: tiempo de almacenamiento (0, 15 y 30 días)*

### **Influencia de la variedad sobre cada uno de los parámetros analizados:**

Para estudiar la influencia de cada una de las variedades, y compararlas entre sí, en cada uno de los parámetros, se realiza un análisis de regresión múltiple en el que la variable independiente será la variedad, y dentro de estas se considera como referencia la variedad clemenules.

#### **Vitamina C**

Las variedades clemenvilla, navelina, navel y navel-lane tienen contenidos de vitamina C significativamente mayores que la variedad clemenules y similares entre si, mientras que la variedad fortuna tiene una concentración de vitamina C mucho menor, ( $R^2 = 87.2\%$ ,  $p < 0.01$ ).

<b>Variedad</b>	<b>Coefficiente estimado</b>	<b>Error</b>
<b>Clemenvilla</b>	5.12	1.19
<b>Fortuna</b>	-17.84	1.15
<b>Navelina</b>	7.28	1.19
<b>Navel</b>	5.85	1.16
<b>Navel-lane</b>	5.20	1.16

### **Vitamina A**

Las variedades clemenules y clemenvilla presentan mayor contenido de vitamina A que las fortuna, navelina, navel y navel-lane, siendo el contenido en estas tres últimas variedades inferior a la vitamina A de las fortuna ( $R^2= 78.4\%$ ,  $p< 0.01$ ).

<b>Variedad</b>	<b>Coefficiente estimado</b>	<b>Error</b>
<b>Clemenvilla</b>	8.65	3.22
<b>Fortuna</b>	-12.57	3.13
<b>Navelina</b>	-39.62	3.22
<b>Navel</b>	-31.61	3.13
<b>Navel-lane</b>	-30.32	3.13

### **pH**

El pH de la variedad clemenules es ligeramente superior al del resto, aunque no es significativa la diferencia con la variedad navel ( $R^2= 34.6\%$ ,  $p<0.01$ ).

<b>Variedad</b>	<b>Coefficiente estimado</b>	<b>Error</b>
<b>Clemenvilla</b>	-0.14	0.04
<b>Fortuna</b>	-0.26	0.04
<b>Navelina</b>	-0.13	0.04
<b>Navel</b>	-0.01	0.04
<b>Navel-lane</b>	-0.09	0.04

### **°Brix**

Los °Brix de fortuna y clemenvilla son significativamente superiores a los de clemenules, y aunque las diferencias no son significativas también presentan mayor °Brix las variedades: navelina y navel, mientras que la variedad navel-lane tiene menor °Brix ( $R^2 = 81.8\%$ ,  $p < 0.01$ ).

<b>Variedad</b>	<b>Coefficiente estimado</b>	<b>Error</b>
<b>Clemenvilla</b>	1.11	0.17
<b>Fortuna</b>	2.71	0.16
<b>Navelina</b>	0.01	0.17
<b>Navel</b>	0.22	0.16
<b>Navel-lane</b>	-0.10	0.16

### **Relación zumo/peso (v/p)**

La variedad que mayor relación zumo/peso presenta es la fortuna, mientras que navel-lane, navel, navelina, clemenvilla y clemenules tienen menor relación de zumo en orden decreciente.

<b>Variedad</b>	<b>Coefficiente estimado</b>	<b>Error</b>
<b>Clemenvilla</b>	2.41	1.09
<b>Fortuna</b>	11.91	1.05
<b>Navelina</b>	3.42	1.09
<b>Navel</b>	6.60	1.05
<b>Navel-lane</b>	7.84	1.05

**Clasificación de las distintas variedades según los parámetros analizados:**

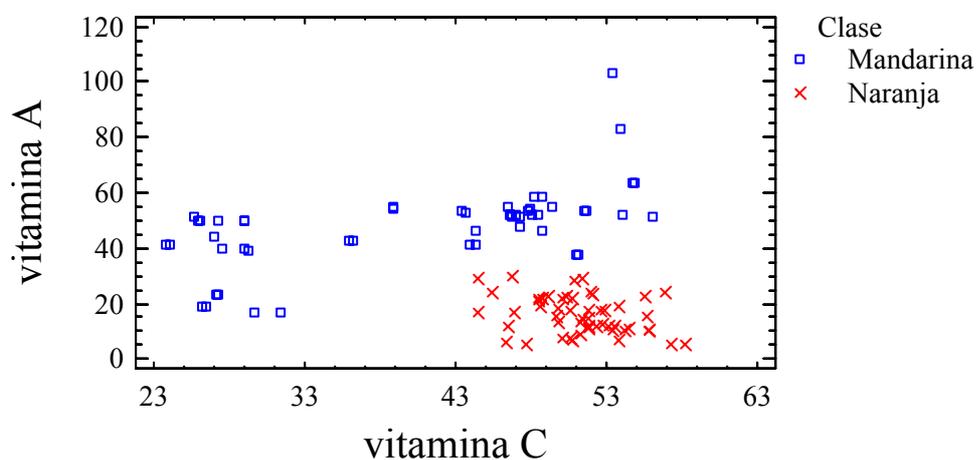
Para estudiar los datos y agruparlos de forma natural según sus características (vitamina C, vitamina A, pH, °Brix y relación zumo/peso), realizamos un análisis de los componentes principales y un análisis discriminante de los resultados. A continuación se comentan los resultados obtenidos.

El análisis discriminante realizado indica que de los parámetros analizados son la concentración de vitamina A y en menor medida la de vitamina C las que van a permitir diferenciar entre naranjas y mandarinas (cuadro nº 49 y figura nº 45).

Cuadro nº 49. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar entre naranjas y mandarinas.

<b>Función discriminante</b>	
<b>1</b>	
<b>Vitamina A</b>	-1.0118
<b>pH</b>	0.2804
<b>°Brix</b>	-0.3127
<b>Vitamina C</b>	0.9745
<b>Zumo/peso (v/p)</b>	0.7310

Figura n° 45. Mandarinas y naranjas. Funciones discriminantes: representación gráfica.



En el cuadro n° 50 se muestra la tabla de clasificación de naranjas y mandarinas, y el porcentaje de aciertos en la predicción. El porcentaje de los casos correctamente clasificados es del 100%.

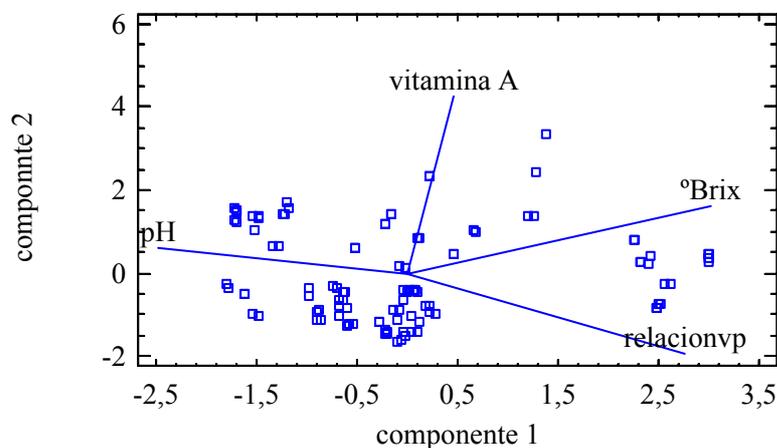
Cuadro n° 50. Clasificación de naranjas y mandarinas, y el porcentaje de aciertos en la predicción.

	Tamaño grupo	PREDICCIÓN: CLASE	
		Mandarinas	Naranjas
<b>Mandarinas</b>	52	52 (100.00%)	0 (0.00%)
<b>Naranjas</b>	52	0 (0.00%)	52 (100.00%)

La pH, °Brix, vitamina C, relación zumo/peso (v/p) y vitamina A son los parámetros que más varían en las distintas variedades de naranjas y mandarinas y que nos permitirán diferenciarlas (cuadro nº 51 y figura nº 46). Si se observa la figura nº 47, se ve como la variedad fortuna es claramente diferente al resto, sobre todo por las diferencias en °Brix (presenta mayor °Brix que el resto) y menor concentración de vitamina C. Las otras cinco variedades podemos clasificarlas en dos grandes grupos, por una parte clemenules y clemenvilla (que tienen mayor contenido de vitamina A) y por otro navel, navel-lane y navelina que son difíciles de separar.

En el cuadro nº 52 se muestra la tabla de clasificación de variedades de naranja y mandarina, y el porcentaje de aciertos en la predicción. El porcentaje de los casos correctamente clasificados es del 81.7%.

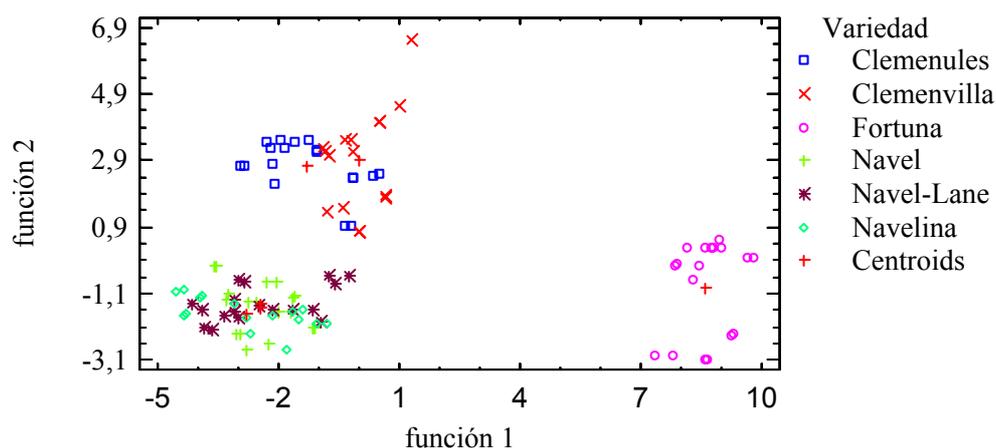
Figura nº 46. Naranjas y mandarinas. Análisis de los principales componentes.



Cuadro nº 51. pH, °Brix, vitamina C, relación zumo/peso (v/p), vitamina A: coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar las variedades.

	Funciones discriminantes				
	1	2	3	4	5
<b>pH</b>	-0.4975	-0.0617	-0.4855	0.3694	0.7491
<b>°Brix</b>	0.8172	-0.1507	0.5606	0.5606	0.4437
<b>Vitamina C</b>	-0.8213	-0.0184	0.6314	0.6314	0.0798
<b>Relación zumo/peso (v/p)</b>	0.0833	-0.4681	0.1360	0.1360	0.1983
<b>Vitamina A</b>	0.0896	0.9316	0.0709	0.0709	0.1712

Figura nº 47. Variedades de naranjas y mandarinas. pH, °Brix, vitamina C, relación zumo/peso (v/p), vitamina A: funciones discriminantes: representación gráfica.



Cuadro nº 52. pH, °Brix, vitamina C, relación zumo/peso (v/p), vitamina A:  
Clasificación de las variedades y el porcentaje de aciertos en la predicción.

<b>PREDICCIÓN: VARIEDADES</b>							
	<b>Tamaño grupo</b>	<b>Clemenules</b>	<b>Clemenvilla</b>	<b>Fortuna</b>	<b>Navel</b>	<b>Navelina</b>	<b>Navel-Lane</b>
<b>Clemenules</b>	18	18 <i>(100.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>
<b>Clemenvilla</b>	16	2 <i>(12.50%)</i>	14 <i>(87.50%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>
<b>Fortuna</b>	18	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	18 <i>(100.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>
<b>Navel</b>	18	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	13 <i>(72.22%)</i>	4 <i>(22.22%)</i>	1 <i>(5.56%)</i>
<b>Navelina</b>	18	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	6 <i>(33.33%)</i>	12 <i>(66.67%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>
<b>Navel-Lane</b>	16	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	0 <i>(0.00%)</i>	4 <i>(25.00%)</i>	2 <i>(12.50%)</i>	10 <i>(62.50%)</i>

**Clasificación de las distintas variedades según su perfil carotenoide:**

Los parámetros analizados anteriormente nos permiten diferenciar algunas de las variedades, pero a continuación vamos a ver si el perfil carotenoideo puede definir cada una de ellas, y en caso de ser así que carotenoides tendrían más importancia.

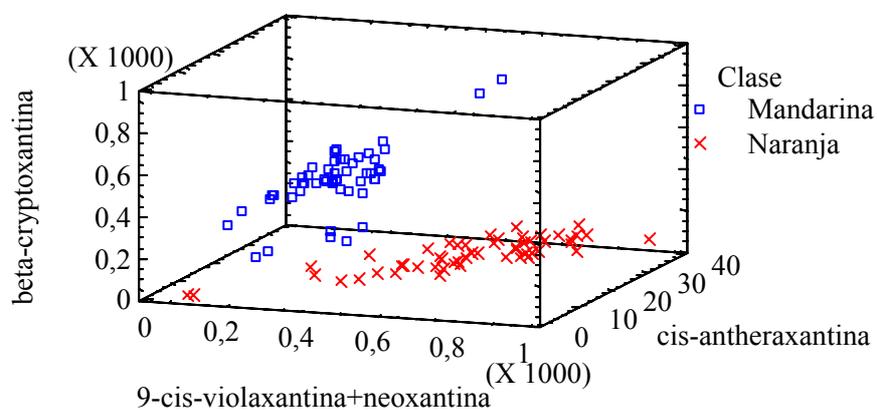
Los coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar las naranjas de las mandarinas se muestran en el cuadro n° 53.

Para desarrollar un modelo discriminante de las clases de cítricos (naranjas y mandarinas) se utilizan 104 casos, determinando que 6 variables permiten hacer predicciones significativas sobre las dos clases de cítricos (naranjas y mandarinas) (véase figura n° 48). El porcentaje de los casos correctamente clasificados es del 100%.

Cuadro n° 53. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar entre naranjas y mandarinas. Carotenoides.

<b>Función discriminante</b>	
	<b>1</b>
<b>9-cis-violaxantina+Neoxantina</b>	-1.4634
<b>cis-anteraxantina</b>	1.0862
<b>Mutatoxantina</b>	0.3707
<b>α-criptoxantina</b>	-0.6246
<b>β-criptoxantina</b>	0.6133
<b>β-caroteno</b>	0.3835

Figura nº 48. Carotenoides. Mandarinas y naranjas. Funciones discriminantes: representación gráfica.



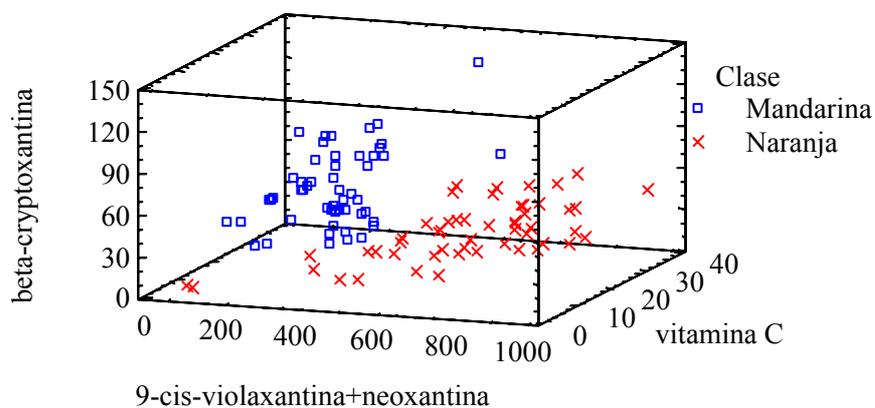
Si además se tienen en cuenta todos los parámetros analizados, son la vitamina C y la 9-cis-violaxantina + neoxantina, principalmente, los que permitirían diferenciar las naranjas de las mandarinas (cuadro nº 54 y figura nº 49).

De las 104 observaciones utilizadas para establecer el modelo predictivo, se clasificaron correctamente el 100%.

Cuadro n° 54. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar entre naranjas y mandarinas.

<b>Función discriminante</b>	
	<b>1</b>
<b>9-cis-violaxantina+Neoxantina</b>	-1.1426
<b>cis-anteraxantina</b>	0.7944
<b>α-criptoxantina</b>	-0.6003
<b>β-criptoxantina</b>	1.0023
<b>Fitoeno+Fitoflueno</b>	0.5879
<b>ζ-caroteno</b>	-0.9563
<b>pH</b>	-0.3554
<b>°Brix</b>	0.3235
<b>Vitamina C</b>	-1.2227

Figura n° 49. Mandarinas y naranjas. Funciones discriminantes: representación gráfica.



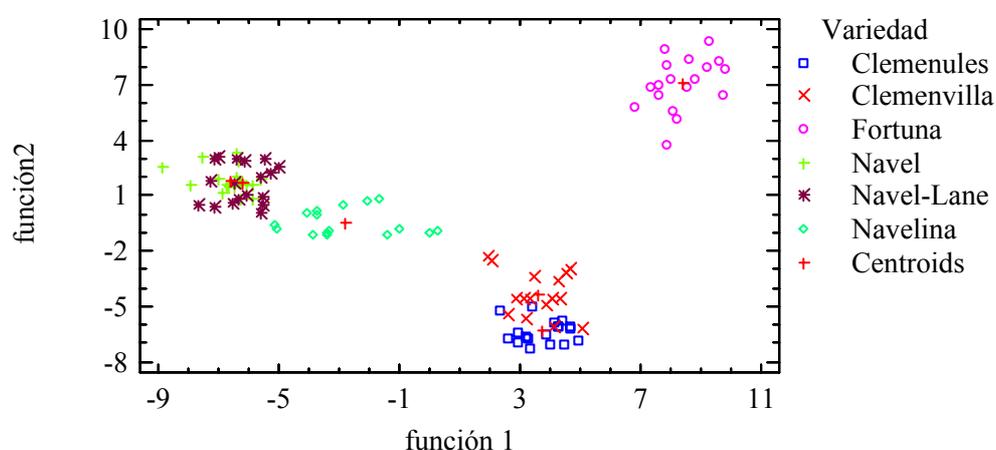
Para poder diferenciar las distintas variedades, además de la concentración de vitamina C y de 9-cis-violaxantina + neoxantina, participaría principalmente también la  $\alpha$ -criptoxantina. Excepto para navel y navel-lane, las diferentes variedades presentan un perfil característico, que permite diferenciarlas perfectamente (cuadro n° 55 y figura n° 50).

De las 104 observaciones utilizadas, se clasificaron correctamente el 98.1%. En el cuadro n° 56 se muestra la clasificación de las variedades estudiadas y el porcentaje de aciertos en la predicción.

Cuadro n° 55. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar entre las variedades.

	<b>Función discriminante</b>				
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>9-cis-violaxantina+Neoxantina</b>	-0.8482	0.3555	0.1783	-0.1915	-1.3545
<b>cis-anteraxantina</b>	-0.0602	0.0682	-1.2040	0.1783	0.8492
<b>Mutatoxantina</b>	-0.0511	0.1774	0.1477	0.7865	0.4502
<b>Luteína</b>	0.3066	-0.1784	0.3078	-0.0891	1.3814
<b><math>\alpha</math>-criptoxantina</b>	-0.7799	0.3658	-0.1933	-0.0054	-0.1972
<b>cis-<math>\beta</math>-criptoxantina</b>	0.2718	-0.2081	0.9265	0.0777	0.3460
<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	0.4945	-1.0569	-0.8194	-0.2125	-0.5765
<b>Fitoeno+Fitoflueno</b>	0.3816	0.0403	0.2242	0.5113	-0.4761
<b><math>\zeta</math>-caroteno</b>	-0.0825	1.0648	0.0788	-0.0272	-0.1076
<b>9-cis-<math>\beta</math>-caroteno</b>	-0.1790	-0.4253	-0.5984	-0.1237	0.9769
<b>°Brix</b>	0.4323	0.7150	0.1547	0.2219	0.3220
<b>Vitamina C</b>	-0.7177	-0.2203	0.2739	0.2641	0.2667

Figura n° 50. Variedades. Funciones discriminantes: representación gráfica.



Cuadro n° 56. Carotenoides, °Brix y vitamina C: Clasificación de las variedades y el porcentaje de aciertos en la predicción.

PREDICCIÓN: VARIEDADES							
	Tamaño grupo	Clemenules	Clemenvilla	Fortuna	Navel	Navelina	Navel-Lane
<b>Clemenules</b>	18	18 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
<b>Clemenvilla</b>	16	0 (0.00%)	16 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
<b>Fortuna</b>	18	0 (0.00%)	0 (0.00%)	18 (100.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)
<b>Navel</b>	18	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	16 (88.89%)	2 (11.11%)	0 (0.00%)
<b>Navelina</b>	18	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	18 (100.00%)	0 (0.00%)
<b>Navel-Lane</b>	16	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	0 (0.00%)	16 (100.00%)

#### **4.3.6.- CONCLUSIONES**

- a) Se pueden clasificar los cítricos agrupándolos en naranjas y mandarinas, con el 100% de aciertos en la predicción, determinando los parámetros:
1. Vitaminas A y C.
  2. Seis carotenoides: 9-cis-violaxantina + neoxantina, cis-anteraxantina, mutatoxantina,  $\alpha$  y  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -caroteno.
  3. Vitamina C y 9-cis-violaxantina + neoxantina.
- b) Se pueden clasificar correctamente las 6 variedades de cítricos estudiados (clemenules, clemenvilla, fortuna, navel, navelina y navel-lane):
1. Con un 81.7% de aciertos en la predicción con la determinación de los parámetros: pH, °Brix, relación zumo/peso, vitamina A y vitamina C.
  2. Con un 98.1% de aciertos en la predicción con la determinación de los parámetros vitamina C, 9-cis-violaxantina + neoxantina y  $\alpha$ -criptoxantina.

## **4.4.- ZUMOS COMERCIALES**

### **4.4.1.- DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS**

Se hizo un estudio de mercado de las diferentes marcas comerciales de zumos y néctares de naranja de mayor consumo en nuestro país. Las muestras analizadas fueron once zumos y tres néctares de naranja adquiridos del comercio. Entre estos, se seleccionaron zumos de naranja que se conservasen en refrigeración (a base de concentrado o no) y a Tª ambiente (sólo a base de concentrado). Como puede verse en el cuadro nº 57, todos los néctares analizados no necesitaban de refrigeración y se habían obtenido a base de zumo concentrado.

Todos los zumos y néctares comerciales se encontraban dentro de su periodo de vida útil. Tres envases del mismo lote de cada muestra se analizaron por triplicado.

Cuadro nº 57. Descripción de zumos y néctares de naranja comercializados.

<b>Tipos de zumos</b>			<b>Código</b>
<b>ZUMOS DE NARANJA</b>	<b>Refrigerado</b>	<b>No a base de concentrado</b>	2B
			3B
			4B
	<b>No Refrigerado</b>	<b>A base de concentrado</b>	1A
			5C
			6C
			7C
			8C
			9C
<b>NÉCTAR DE NARANJA</b>			10C
			11C
			12D
			13D
			14D

#### 4.4.2.- PARÁMETROS A ANALIZAR

Se determinan: pH, °Brix, contenido de carotenoides y de vitamina C.

Instrumentación, material, reactivos y descripción del método (véase el apartado 4.3.4.).

#### 4.4.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de pH, °Brix y el contenido de vitamina C encontrados para los néctares y zumos de naranja comercializados pueden verse en el cuadro nº 58. En todos los casos, los contenidos de vitamina C hallados en las muestras son superiores a los indicados en las etiquetas de los zumos y néctares de naranja correspondientes.

Cuadro nº 58. Valores de pH, °Brix y vitamina C en zumos y néctares de naranja comercializados.

Tipos de zumos			Código	pH	° Brix	Vit C (mg/100mL)	
ZUMOS DE NARANJA	Refrigerado	No a base de concentrado	2B	3.48	11.0	59.74±2.08	
			3B	3.65	11.6	38.17±1.71	
			4B	3.52	12.4	38.81±0.46	
	No Refrigerado	A base de concentrado	1A	3.75	11.6	35.30±1.85	
			5C	3.80	11.6	80.12±0.37	
			6C	3.55	11.2	38.98±0.28	
			7C	3.64	11.2	74.75±2.84	
			8C	3.75	11.4	87.66±0.93	
			9C	3.76	11.2	27.76±0.73	
			10C	3.65	10.8	27.44±0.60	
			11C	3.55	11.8	61.79±0.25	
NÉCTAR DE NARANJA				12D	3.43	10.8	21.52±0.06
				13D	3.64	5.8	67.00±0.60
	14D	3.25		5.6	34.58±0.29		

Se puede ver que los contenidos de vitamina C varían mucho de unas muestras a otras, llegando a ser cuatro veces superiores en algunos productos.

A continuación se presentan los contenidos de carotenoides de los néctares y zumos de naranja comercializados (cuadros nº 59-61 y figuras nº 51-52, 54-57 y 59-66).

NÉCTARES:

El contenido de carotenoides en los tres néctares de naranja analizados puede verse en el cuadro nº 59 y en las figuras nº 51-52 y 54.

Figura nº 51. Contenido de carotenoides en néctar de naranja comercial: 12D.

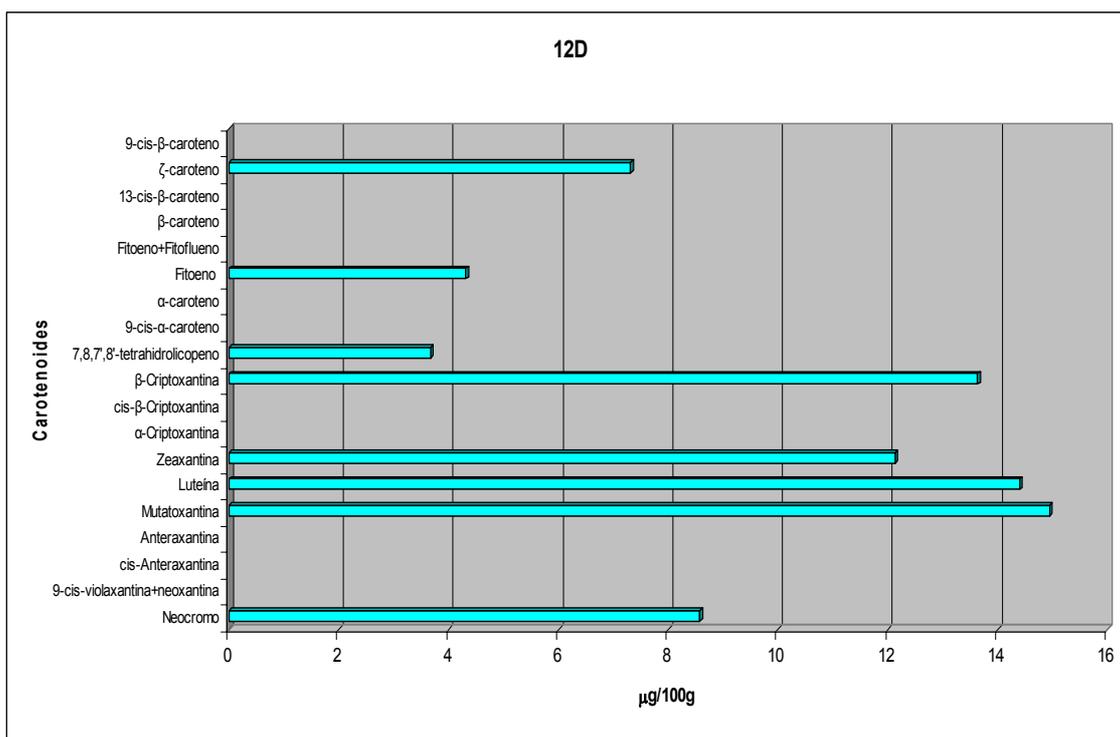
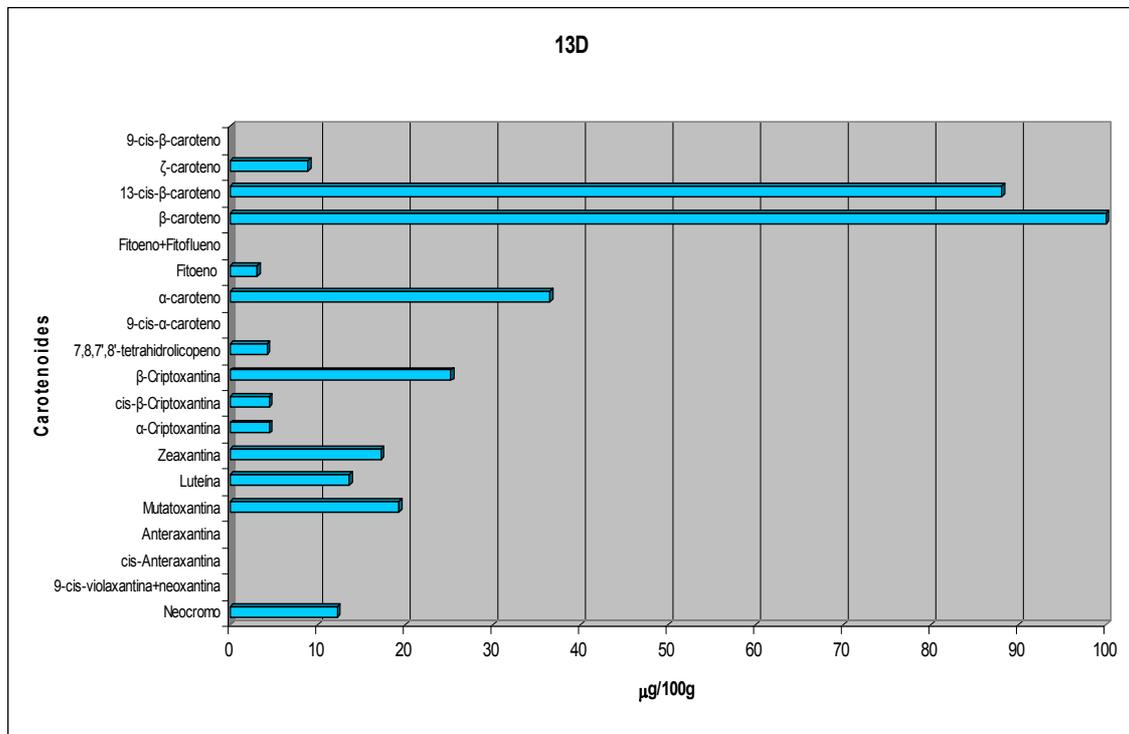


Figura nº 52. Contenido de carotenoides en néctar de naranja comercial: 13D.



Se observa que en los néctares 12D y 14D no se ha detectado el β-caroteno, sin embargo en el cromatograma del néctar 13D (figura nº 53) es el carotenoide mayoritario (cuadro nº 59 y figuras nº 51-54). El espectro del β-caroteno (correspondiente al pico cromatográfico con tiempo de retención 13.05 min) en el néctar 13D es similar al espectro del estándar comercial y, al tener gran cantidad de éste (577.26 µg/100g), incrementa mucho el contenido en vitamina A de este néctar, siendo de todos los productos analizados (néctares y zumos) el que mayor contenido de vitamina A presenta.

Figura nº 53. Cromatograma del néctar de naranja 13D.

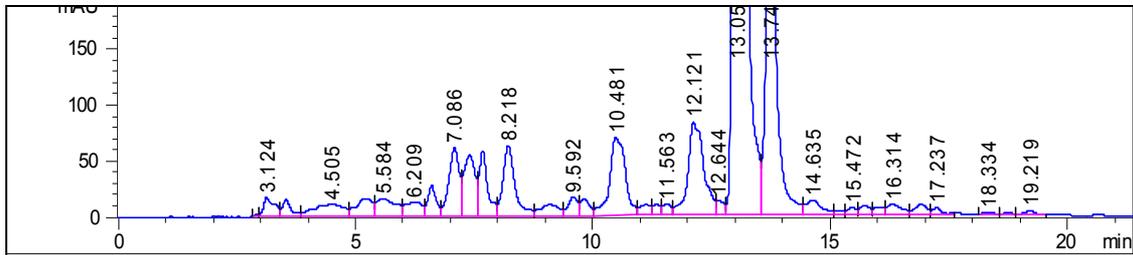
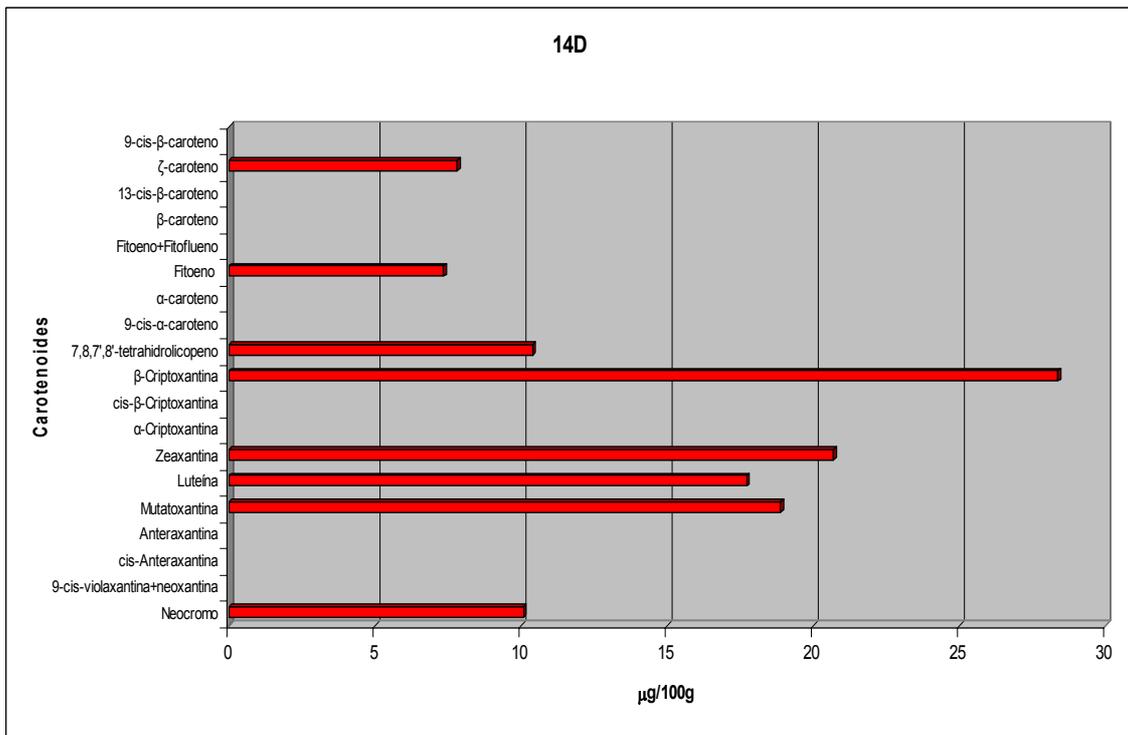


Figura nº 54. Contenido de carotenoides en néctar de naranja comercial: 14D.



Cuadro nº 59. Contenido de carotenoides en néctares de naranja comercializados.

Carotenoides	Muestra		
	12D	13D	14D
Neocromo	8.57±0.02	12.22±2.24	10.08±0.12
9-cis-violaxantina+Neoxantina	-	-	-
cis-anteraxantina	-	-	-
Anteraxantina	-	-	-
Mutatoxantina	14.95±1.09	19.26±1.80	18.88±0.12
Luteína	14.40±1.68	13.61±0.17	17.72±1.51
Zeaxantina	12.14±1.01	17.21±0.08	20.69±1.51
α-criptoxantina	-	4.47±0.24	-
cis-β-criptoxantina	-	4.47±0.25	-
β-criptoxantina	13.64±0.94	25.18±0.56	28.37±0.89
7,8,7',8'-tetrahidrolicopeno	3.67±1.04	4.22±0.31	10.40±2.22
9-cis-α-caroteno	-	-	-
α-caroteno	-	36.53±0.56	-
Fitoeno	4.31±0.08	3.11±0.03	7.35±1.42
Fitoeno+Fitoflueno	-	-	-
β-caroteno	-	577.26±7.34	-
13-cis-β-caroteno	-	88.05±2.83	-
ζ-caroteno	7.32±0.04	8.88±0.09	7.81±2.36
9-cis-β-caroteno	-	-	-
Carotenoides Totales (real):	205.18±4.46	939.77±10.18	293.53±18.66
Carotenoides Totales (450 nm):	165.16±9.33	868.39±5.04	215.10±13.43
Vitamina A	1.74±0.18	102.26±0.18	3.00±0.02

### ZUMOS REFRIGERADOS

Las muestras 2B, 3B y 4B corresponden a zumos de naranja exprimidos (no a base de concentrado), y la muestra 1A es un zumo a base de concentrado. El contenido de carotenoides de éstas muestras puede verse en el cuadro nº 60 y en las figuras nº 55-57 y 59.

Figura nº 55. Contenido de carotenoides en zumo refrigerado de naranja exprimida: 2B.

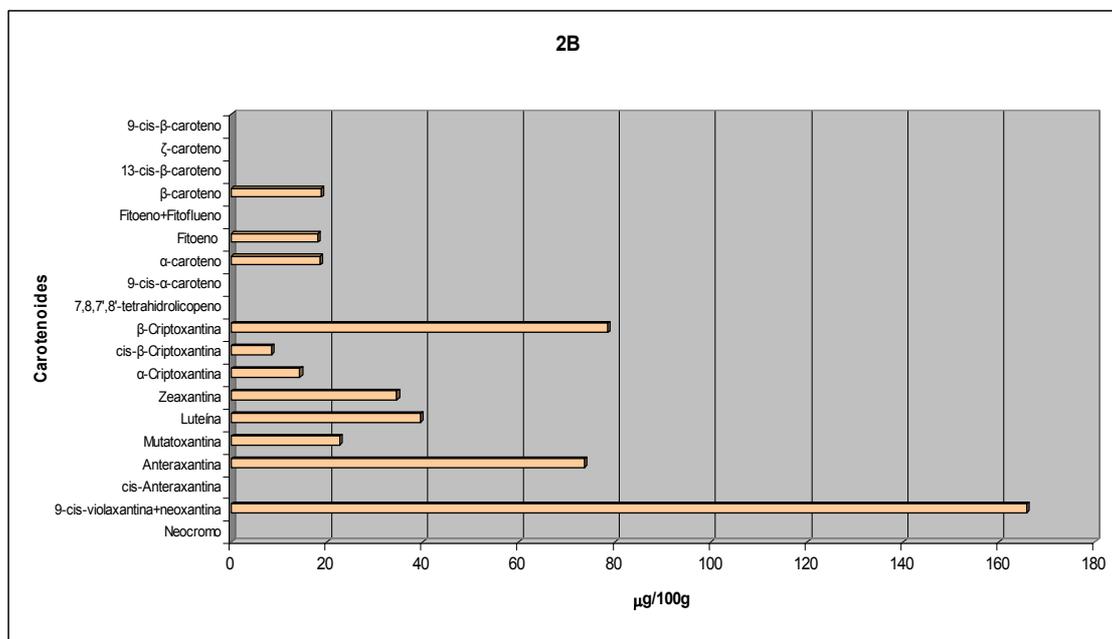


Figura nº 56. Contenido de carotenoides en zumo refrigerado de naranja exprimida: 3B.

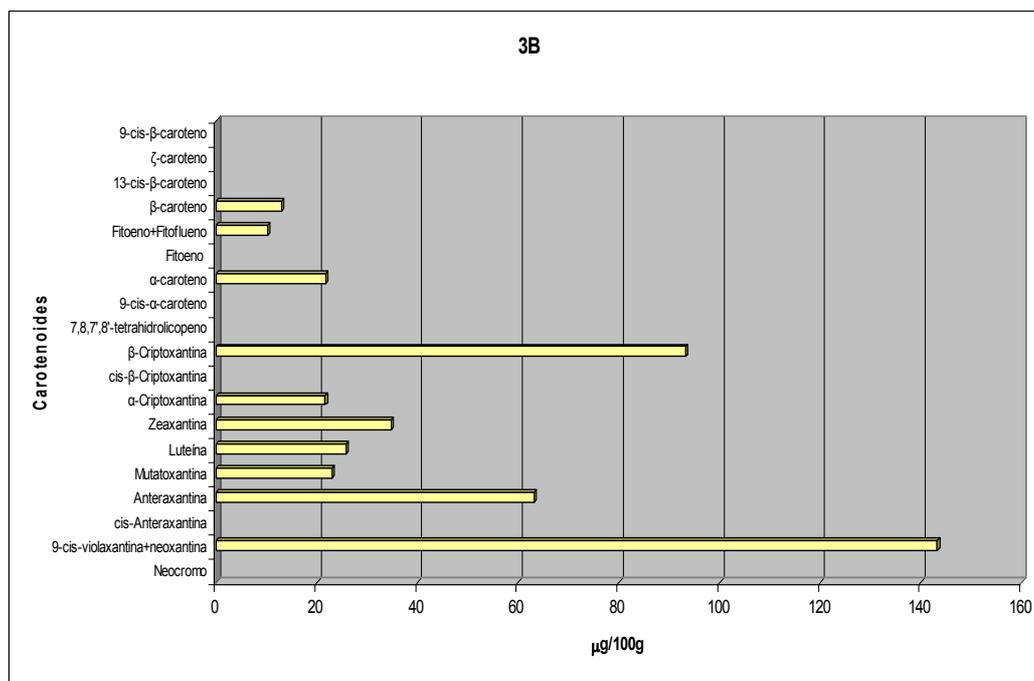
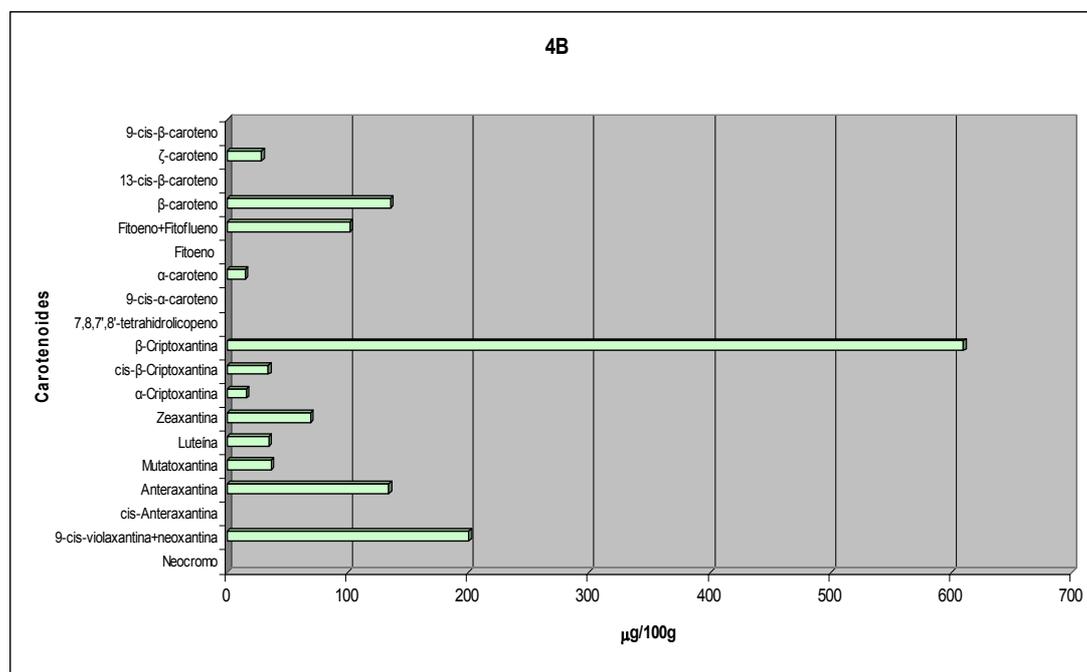


Figura nº 57. Contenido de carotenoides en zumo refrigerado de naranja exprimida: 4B.



En el cromatograma correspondiente al zumo de naranja 4B (figura nº 58), el espectro de la β-criptoxantina (correspondiente al pico cromatográfico con tiempo de retención 10.485 min) es similar al espectro del estándar comercial y, al tener una gran cantidad (609.84 µg/100g), incrementa el contenido de vitamina A de este zumo.

Figura nº 58. Cromatograma del zumo de naranja 4B.

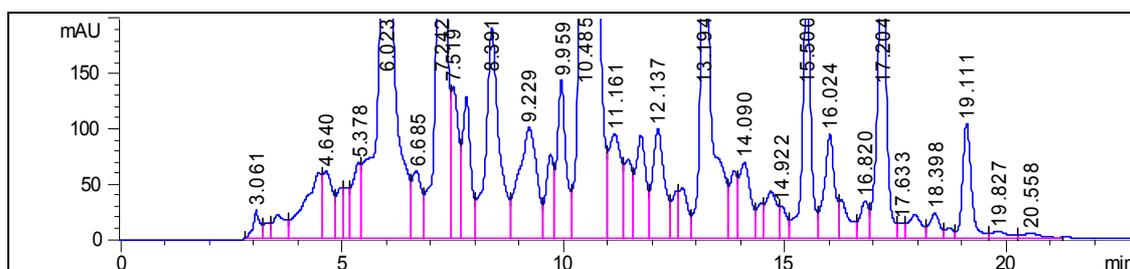
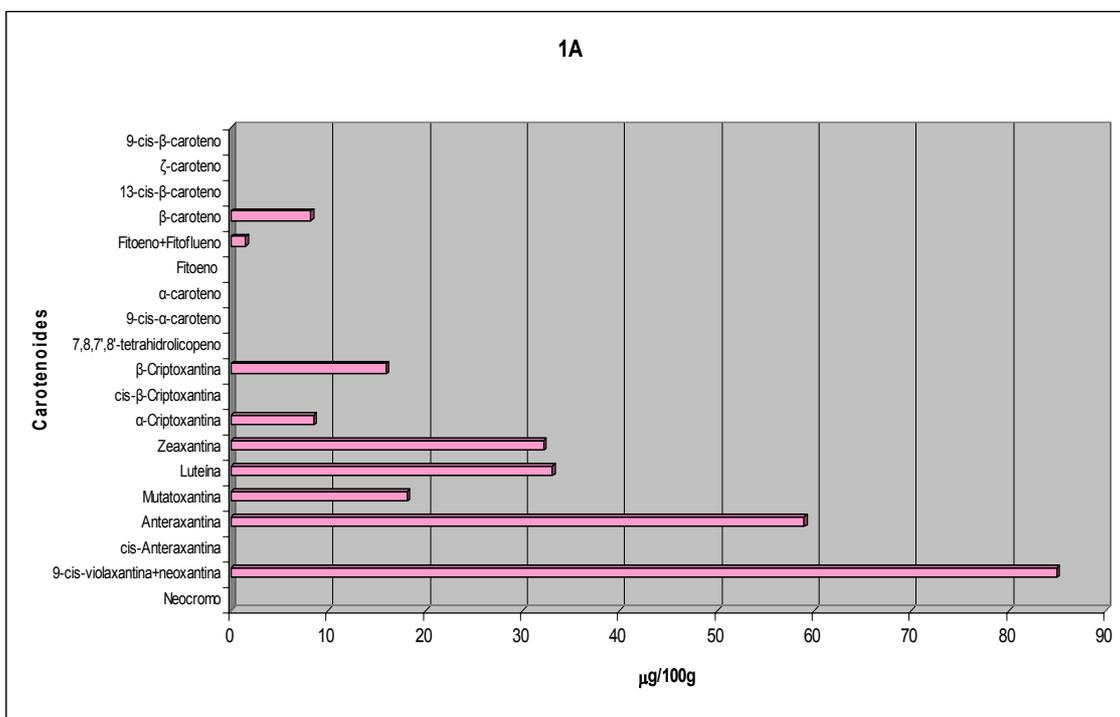


Figura nº 59. Contenido de carotenoides en zumo refrigerado de naranja a base de concentrado: 1A.



El contenido de β-criptoxantina es muy bajo en la muestra 1A, siendo también menor el contenido de α-criptoxantina y β-caroteno, y no detectándose α y ζ-caroteno. Por este motivo el contenido en vitamina A de este zumo es muy inferior al resto de zumos de naranja refrigerados. Esta muestra es el único zumo de naranja refrigerado proveniente de concentrado.

Cuadro nº 60. Contenido de carotenoides en zumos de naranja comerciales refrigerados.

Carotenoides	Muestra			
	2B	3B	4B	1A
Neocromo	-	-	-	-
9-cis-violaxantina+Neoxantina	165.75±7.02	143.28±19.07	200.15±9.76	84.99±3.36
cis-anteraxantina	-	-	-	-
Anteraxantina	73.69±5.86	63.20±9.07	133.91±9.76	58.98±0.02
Mutatoxantina	22.68±1.46	23.00±0.14	36.25±2.32	18.16±0.09
Luteína	39.51±6.41	25.86±2.48	34.87±1.96	33.08±3.15
Zeaxantina	34.54±2.56	34.76±1.10	69.16±1.66	32.15±2.76
α-criptoxantina	14.36±0.60	21.68±1.26	16.21±0.02	8.55±0.93
cis-β-criptoxantina	8.50±0.32	-	34.08±0.65	-
β-criptoxantina	78.40±2.87	93.23±8.56	609.84±26.20	15.98±4.36
7,8,7',8'-tetrahidrolicopeno	-	-	-	-
9-cis-α-caroteno	-	-	-	-
α-caroteno	18.59±3.38	21.83±1.4	15.17±4.01	-
Fitoeno	18.10±1.20	-	-	-
Fitoeno+Fitoflueno	-	10.21±6.13	101.53±1.92	1.52±0.53
β-caroteno	18.84±3.38	13.02±1.94	135.42±1.56	8.21±1.17
13-cis-β-caroteno	-	-	-	-
ζ-caroteno	-	-	28.53±3.28	-
9-cis-β-caroteno	-	-	-	-
Carotenoides Totales (real)	856.11±10.26	806.49±133.06	2065.73±37.68	467.93±22.37
Carotenoides Totales (450nm)	771.65±0.49	408.54±114.03	1966.37±16.33	217.82±15.98
<b>Vitamina A</b>	<b>11.20±1.05</b>	<b>11.72±4.02</b>	<b>76.86±0.60</b>	<b>2.70±0.50</b>

ZUMOS NO REFRIGERADOS A BASE DE CONCENTRADO

El contenido en carotenoides de los zumos de naranja no refrigerados a base de concentrado puede verse en el cuadro nº 61 y en las figuras nº 60-66.

Figura nº 60. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 5C.

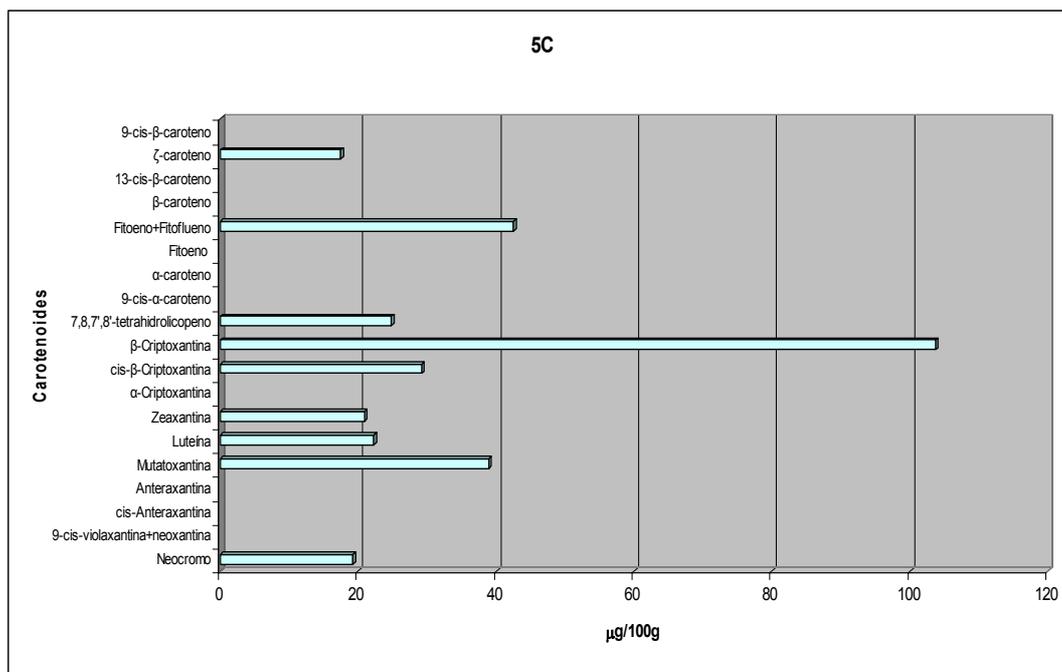


Figura nº 61. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 6C.

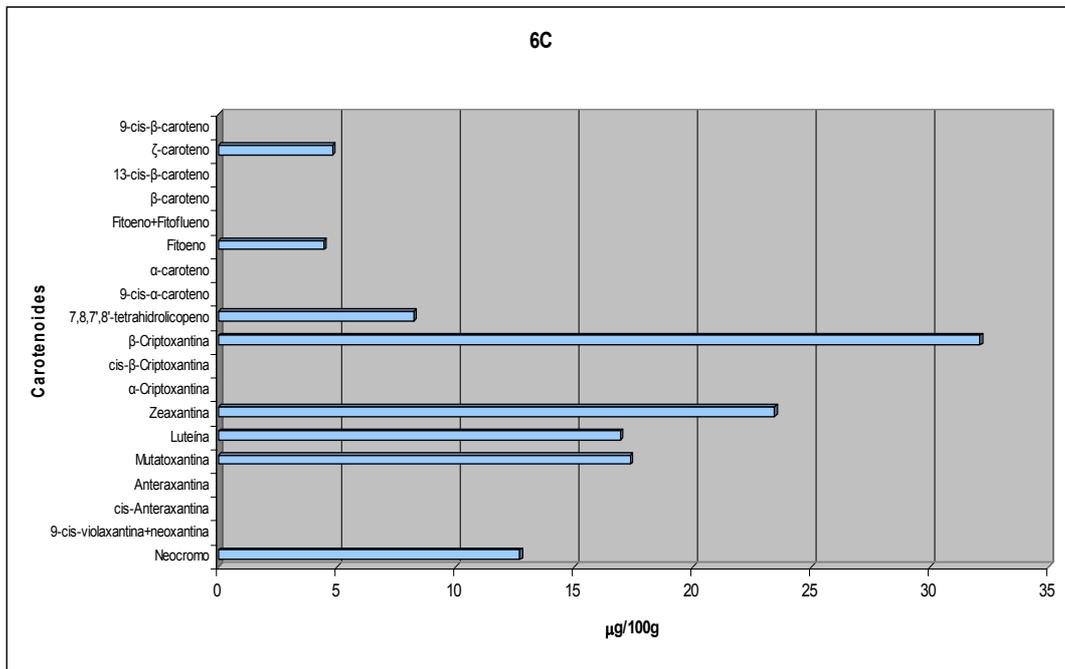


Figura nº 62. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 7C.

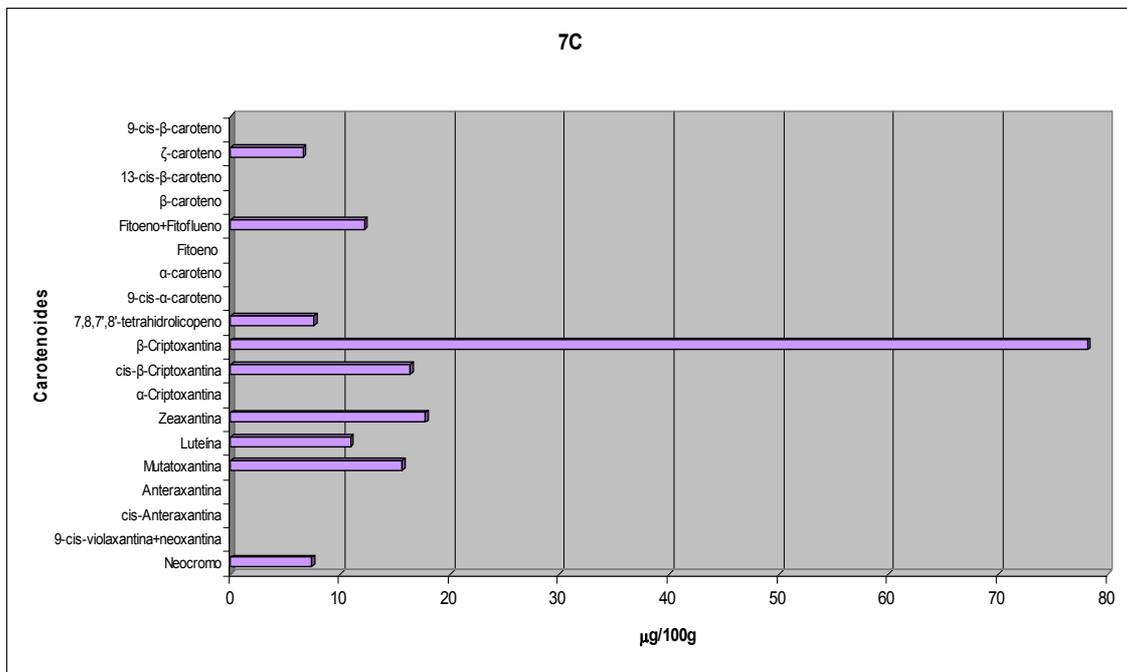


Figura nº 63. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 8C.

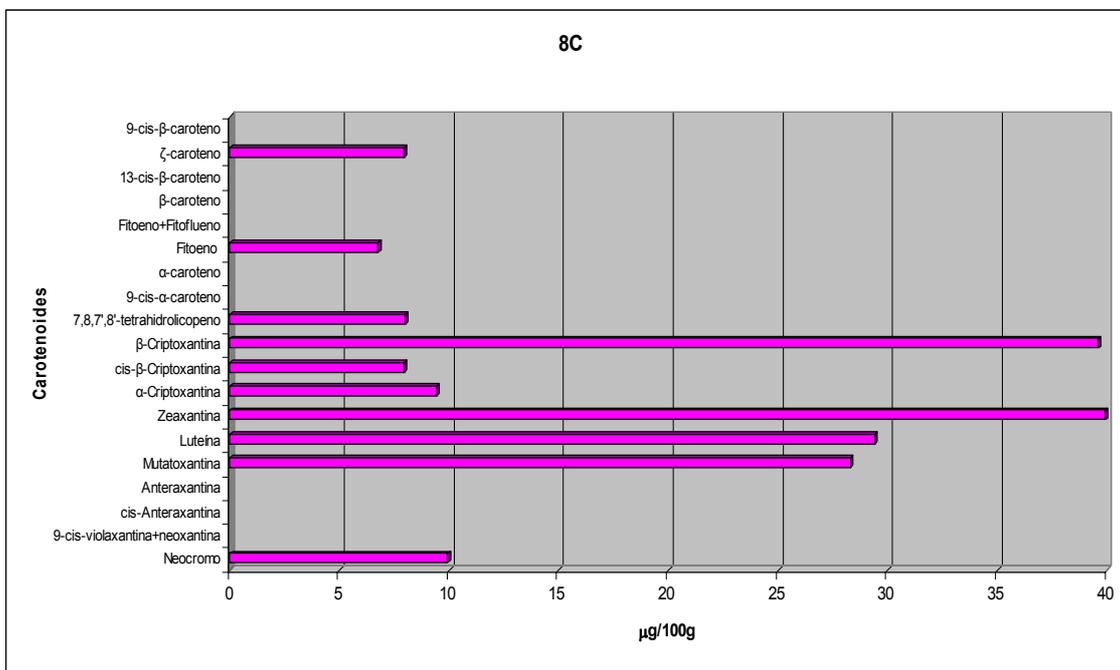


Figura nº 64. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 9C.

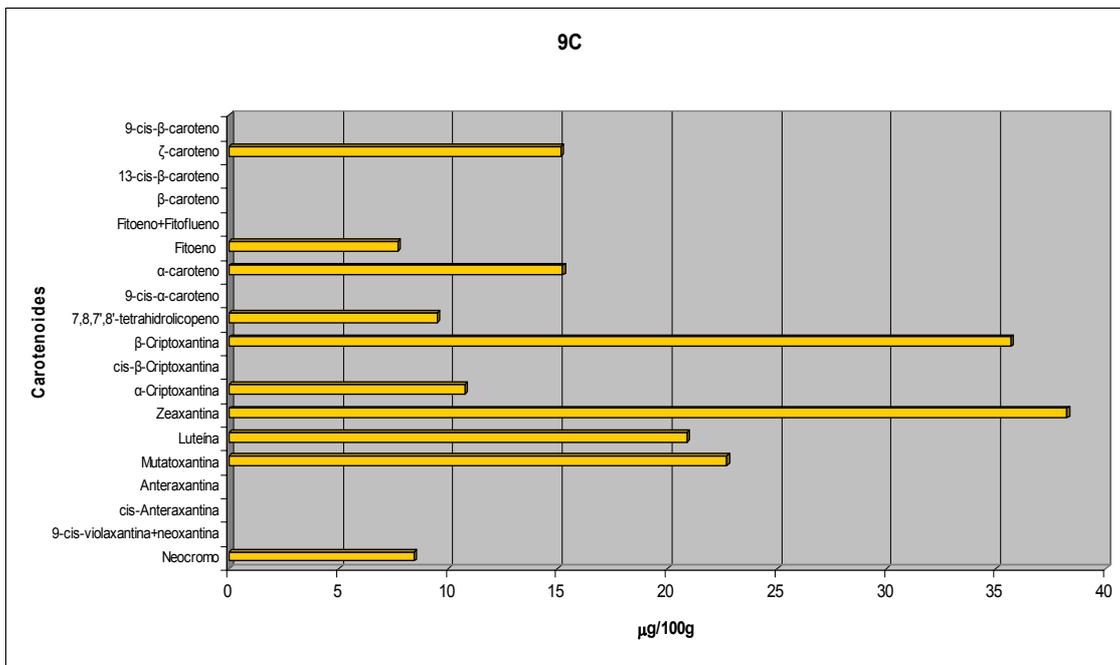


Figura nº 65. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 10C.

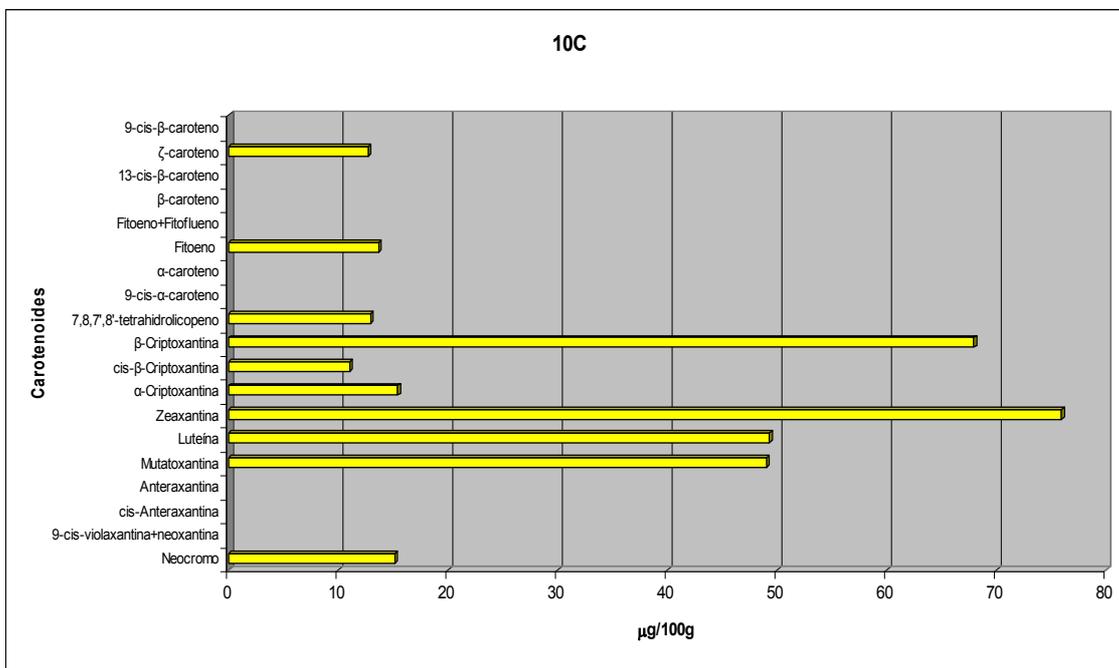
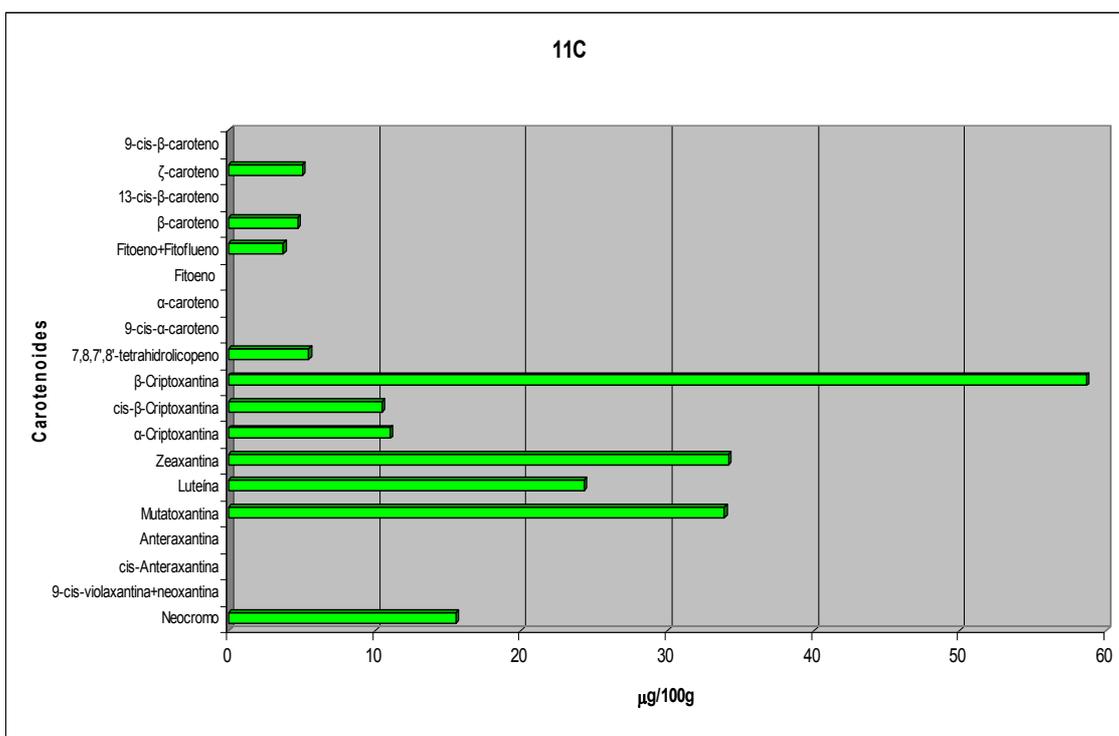


Figura nº 66. Contenido de carotenoides en zumo de naranja no refrigerado a base de concentrado: 11C.



Cuadro nº 61. Contenido de carotenoides en zumos de naranja no refrigerados a base de concentrado.

Carotenoides	5C	6C	7C	8C
Neocromo	19.25±3.72	12.71±1.75	7.40±0.60	9.94±0.27
9-cis-violaxantina+Neoxantina	-	-	-	-
cis-anteraxantina	-	-	-	-
Anteraxantina	-	-	-	-
Mutatoxantina	38.97±12.09	17.37±2.37	15.65±0.07	28.30±0.49
Luteína	22.30±6.41	16.94±2.48	10.94±0.36	29.41±1.98
Zeaxantina	20.86±5.17	23.45±2.91	17.74±0.28	39.93±1.02
α-criptoxantina	-	-	-	9.44±0.65
cis-β-criptoxantina	29.18±3.95	-	16.38±0.18	7.96±1.3
β-criptoxantina	103.67±26.20	32.11±1.38	78.12±3.05	39.61±6.23
7,8,7',8'-tetrahidrolicopeno	24.82±2.04	8.25±1.23	7.60±0.28	8.00±0.89
9-cis-α-caroteno	-	-	-	-
α-caroteno	-	-	-	-
Fitoeno	-	4.44±1.89	-	6.77±1.89
Fitoeno+Fitoflueno	42.52±2.56		12.22±0.25	-
β-caroteno	-	-	-	-
13-cis-β-caroteno	-	-	-	-
ζ-caroteno	17.46±1.62	4.82±0.76	6.58±0.18	7.94±1.51
9-cis-β-caroteno	-	-	-	-
Carotenoides Totales (real):	729.45±14.21	341.84±7.04	358.04±12.13	439.14±26.53
Carotenoides Totales (450 nm):	569.36±0.19	288.44±0.25	298.95±16.24	346.41±15.35
<b>Vitamina A:</b>	<b>10.05±0.04</b>	<b>3.07±0.05</b>	<b>7.03±0.02</b>	<b>3.95±0.23</b>

Cuadro nº 61. Contenido de carotenoides en zumos de naranja no refrigerados a base de concentrado. *Continuación.*

<b>Carotenoides</b>	<b>9C</b>	<b>10C</b>	<b>11C</b>
Neocromo	8.44±2.49	15.19±0.29	15.54±5.70
9-cis-violaxantina+Neoxantina	-	-	-
cis-anteraxantina	-	-	-
Anteraxantina	-	-	-
Mutatoxantina	22.72±8.94	49.07±0.31	33.92±8.73
Luteína	20.89±0.16	49.33±0.53	24.32±5.95
Zeaxantina	38.23±3.72	75.95±3.76	34.21±2.18
α-criptoxantina	10.78±1.70	15.41±0.51	11.07±0.05
cis-β-criptoxantina	-	11.03±1.68	10.50±0.24
β-criptoxantina	35.66±5.23	67.94±9.04	58.64±2.01
7,8,7',8'-tetrahidrolicopeno	9.51±0.45	12.92±1.75	5.47±1.29
9-cis-α-caroteno	-	-	-
α-caroteno	15.22±0.25	-	-
Fitoeno	7.71±1.58	13.67±5.70	-
Fitoeno+Fitoflueno	-	-	3.74±1.43
β-caroteno	-	-	4.74±1.45
13-cis-β-caroteno	-	-	-
ζ-caroteno	15.15±0.54	12.74±3.67	5.05±1.06
9-cis-β-caroteno	-	-	-
Carotenoides Totales (real):	468.03±35.21	808.06±156.75	547.33±33.69
Carotenoides Totales (450 nm):	353.26±6.30	615.10±100.41	260.69±43.63
<b>Vitamina A:</b>	<b>5.48±0.46</b>	<b>6.70±0.49</b>	<b>6.08±0.06</b>

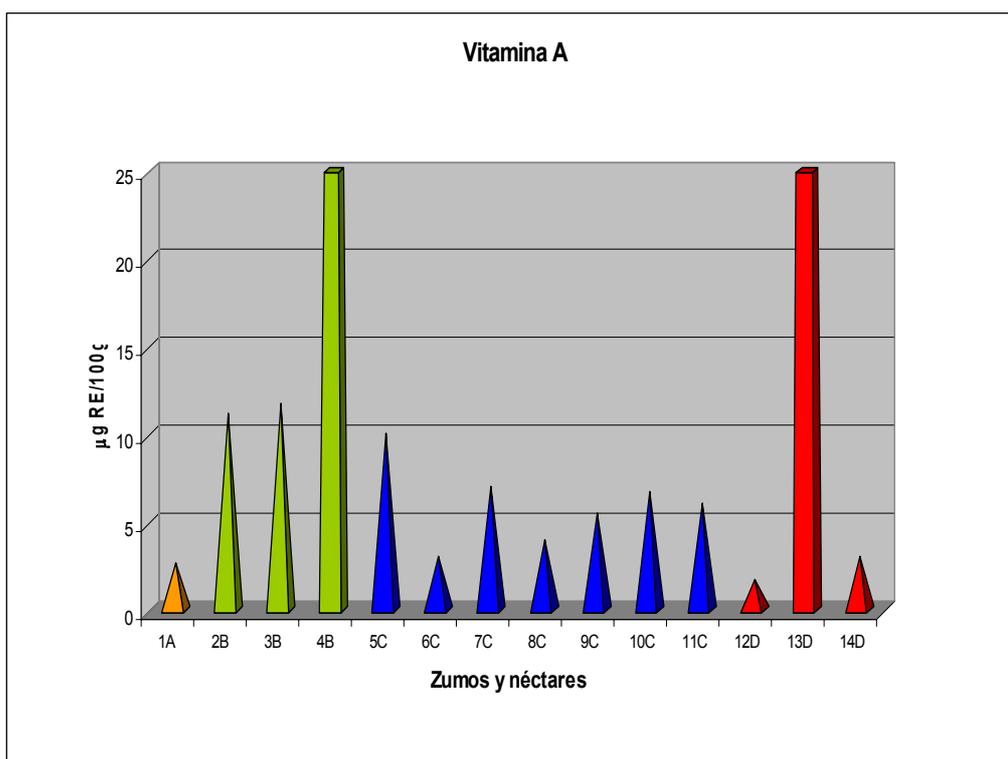
El α-caroteno sólo está presente en la muestra 9C y el β-caroteno solamente en la 11C, en el resto de muestras no se han detectado.

El ζ-caroteno y la β-criptoxantina se encuentran en todos los zumos de este grupo, siendo la muestra 5C la de mayores contenidos y la 6C la de menores. Como puede observarse en el cuadro nº 61 la concentración de vitamina A es mayor en el zumo 5C y ello es debido, en gran parte, a que la cantidad de β-criptoxantina en esta muestra es superior a las demás y, en algunos casos es incluso tres veces mayor.

## VITAMINA A

Como se ha indicado anteriormente, el zumo 4B y el néctar 13D tienen un marcado contenido en vitamina A debido a la enorme cantidad de  $\beta$ -criptoxantina en el primero y de  $\beta$ -caroteno en el segundo, ambos con espectros similares a los carotenoides comerciales. Se observa que, excluyendo las anteriores muestras, los zumos tienen mayor concentración de vitamina A que los néctares, excepto la muestra 1A (figura nº 67).

Figura nº 67. Contenido de vitamina A en zumos y néctares comerciales de naranja.



- Zumo de Naranja Refrigerado a Base de Concentrado.
- Zumo de Naranja Refrigerado Exprimido.
- Zumo de Naranja No Refrigerado a Base de Concentrado.
- Néctar de Naranja No Refrigerado a Base de Concentrado.

#### **4.4.4.- CONCLUSIONES**

La importancia del consumo de zumos de fruta se debe a su elevado contenido de vitaminas. Los zumos y néctares de naranja son los de mayor producción a nivel mundial. En este trabajo se ha comprobado que la calidad nutricional, vitaminas A y C, es muy distinta de unas muestras a otras.

En todos los productos estudiados, néctares y zumos, el contenido de vitamina C encontrado es superior al indicado en la etiqueta, pero existe gran variabilidad en los resultados llegando a ser en algunos productos el contenido de vitamina C cuatro veces superior al de otros.

El análisis cromatográfico realizado, generalmente, no diferencia la vitamina A natural de la comercial, si ésta se añade antes del tratamiento térmico, sin embargo sí se conoce su procedencia si su adición es posterior, como ocurre en el caso del néctar 13D y del zumo 4B, donde se ve como algunos carotenoides tienen un espectro cromatográfico igual al de los patrones de que dispone la industria. El contenido de vitamina A en el néctar 13D es cincuenta veces superior al de otras muestras.

Diecisiete carotenoides diferentes (*cis* y *trans*) se cuantificaron en los zumos y néctares analizados. Generalmente se obtienen concentraciones de vitamina A más pequeñas en los néctares que en los zumos de naranja a base de concentrado, siendo las concentraciones de vitamina A mayores en zumos exprimidos que en zumos a base de concentrado. Hay diferencias importantes en los carotenoides cuantificados para cada tipo de muestra, la 9-*cis*-violaxantina + neoxantina aparece sólo en los zumos refrigerados, siendo en este grupo la mezcla 9-*cis*-violaxantina + neoxantina los carotenoides mayoritarios. Por otro lado, tanto en zumos como en néctares, a base de concentrado y no refrigerados, los carotenoides neocromo y 7,8,7',8'-tetrahidrolicopeno han sido identificados, sin embargo no se han encontrado en las otras muestras.

El pH y los °Brix de estos productos es muy homogéneo exceptuando el néctar 14D, que tiene valores muy bajos para ambos parámetros y el néctar 13D, cuyos °Brix son aproximadamente la mitad de la media, como en el anterior.

## **4.5.- ZUMO MEZCLA DE NARANJA-ZANAHORIA**

### **4.5.1.- ELECCIÓN DE LA MUESTRA**

Como ya se ha comentado en la introducción, el zumo mezcla de naranja-zanahoria tiene una gran aceptación por parte de los consumidores, debido a sus excelentes y particulares características sensoriales y nutritivas, proporcionando un aumento en la calidad del producto (carotenoides, vitamina C, color, etc.), siendo el factor que más contribuye en la aceptación por parte del consumidor y que aumenta el valor añadido del producto (Bureau & Bushway, 1986; Stern, 1998).

### **4.5.2.- DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA**

Una industria elaboradora de zumos fabricó el zumo mezcla de naranja-zanahoria (80:20, v/v), el cual fue envasado asépticamente y congelado a -40°C hasta el momento de su análisis. También se preparó otro zumo mezcla (con la misma proporción de ambos zumos) para comprobar la vida útil, en la planta piloto del IATA, siguiendo el mismo método de obtención.

### **4.5.3.- PREPARACIÓN**

El procedimiento para obtener el zumo mezcla de naranja-zanahoria fue: después de un apropiado lavado e higienización de las naranjas, se extrajo el zumo (extractores de zumo FMC con un tamiz de 2 mm Ø) y se introdujo en un tanque. El zumo de zanahoria se obtuvo después de lavar la hortaliza primero con una disolución diluida de hidróxido sódico y después con agua potable. A continuación se tritura y el zumo se tamiza y mezcla con naranja (80% naranja y 20% zanahoria, v/v). El zumo mezcla se almacena en envases Elopak en congelación (-40°C) durante 132 días. Periódicamente se analizaron las muestras por triplicado.

En el momento de su análisis, el zumo se filtra con un filtro con diámetro de poro de 0.23 mm (protegiéndolo de la luz), y a continuación se utiliza la muestra como blanco o se trata por pasteurización o por pulsos eléctricos de alta intensidad.

#### **4.5.4.- PARÁMETROS A ANALIZAR**

Se determinan el contenido de carotenoides y de vitamina C.

Instrumentación, material, reactivos y descripción del método (véase los expuestos en el apartado 4.3.4.).

#### **4.5.5.- TRATAMIENTO POR CALOR**

La intensidad del tratamiento térmico dado a las muestras de estudio (98 °C, 21 s) es similar al que aplican las industrias que elaboran zumo refrigerado. Para tratar las muestras se usó un equipo ARMFIELD FT74P con una placa intercambiadora. El zumo guardado en un tanque de alimentación es impulsado por una bomba hacia el intercambiador de calor, donde se alcanzan las condiciones de tratamiento (98 °C, 21 s). Después del tratamiento, el zumo es enfriado con agua proveniente de un sistema refrigerador (ARMFIELD FT61), se empaqueta y se almacena hasta el momento del análisis.

El zumo de naranja calentado a 90-99 °C durante 15-30 s es el que normalmente se elabora en la práctica comercial (Braddock, 1999).

#### **4.5.6.- TRATAMIENTO POR PEAI**

El objetivo de este estudio es evaluar los efectos de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad al aplicar campos eléctricos de diferente intensidad (25, 30, 35 y 40 kV/cm) y diferentes tiempos de tratamiento (30-340  $\mu$ s), a zumos mezcla de naranja-zanahoria (80:20, v/v) preparados por una industria y envasados asépticamente. Todo ello para comprobar el mejor tratamiento que se pueda aplicar a nuestro producto, con una buena inactivación de microorganismos y enzimas, y que al mismo tiempo tenga contenidos en

vitamina A y C lo más parecidos al zumo fresco. Paralelamente se le aplica también, al mismo zumo mezcla de naranja-zanahoria, un tratamiento de pasteurización convencional y se utiliza una alícuota sin tratar como blanco.

Para tratar las muestras se usó un sistema continuo de PEAI OSU-4D, diseñado por la Universidad Estatal de Ohio. Se conectaron en serie seis cámaras de tratamiento co-field con un diámetro de 0.23 cm y una distancia de abertura de 0.293 cm. Dos serpentines enfriados se conectan antes y después de cada par de cámaras, y se sumergen en un baño refrigerado para mantener la temperatura de tratamiento dentro del rango designado. La temperatura se monitoriza con un termopar. La forma del pulso, el voltaje y la intensidad en las cámaras de tratamiento se registran con un osciloscopio digital (Tektronix TDS 210, Tektronix Inc., OR EE.UU.). El flujo se fija en 60 mL/min con una bomba peristáltica. Se selecciona un tiempo de duración del pulso bipolar de onda cuadrada de 2.5  $\mu$ s. Para decidir sobre las condiciones más apropiadas para los PEAI, se probaron un número variable de condiciones de tratamiento. El intervalo del tiempo de tratamiento varió entre 30 y 340  $\mu$ s y el campo eléctrico se ajustó a 25, 30, 35 y 40 kV/cm. Las muestras se recogieron después de cada tratamiento y se analizaron por duplicado. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

### **4.5.7.- VIDA ÚTIL (2 Y 10°C)**

El objeto de estudiar la cinética de degradación del ácido ascórbico y de los carotenoides de un zumo mezcla de naranja-zanahoria tratado por PEAI o por calor es obtener un método de conservación con la mínima pérdida de calidad y valor nutritivo, y establecer la vida útil en refrigeración, según las condiciones de PEAI y de calor aplicadas, además de observar las variaciones del pH y de los °Brix. Para ello, una vez seleccionado el mejor tratamiento por PEAI se estudia la evolución de los distintos parámetros en el zumo tratado y almacenado a 2 y 10°C, y se comparan los resultados con los del blanco o con los tratados por calor.

Se eligieron las condiciones de PEAI con los siguientes parámetros seleccionados: campo=25 kV/cm; tiempo de tratamiento= 280  $\mu$ s; amplitud de pulso=

2  $\mu$ s; temperatura del baño= 35°C. Alcanzando las muestras, en los distintos tratamientos, unas temperaturas máximas de 68 y 65°C, respectivamente.

Por otro lado, el segundo zumo mezcla, elaborado en el IATA, se trató por PEAI con los siguientes parámetros seleccionados: campo=25 kV/cm; tiempo de tratamiento= 330  $\mu$ s; amplitud de pulso= 2  $\mu$ s; temperatura del baño= 35°C. Alcanzando el zumo mezcla una temperatura máxima de 74°C.

Todos los envases, herméticamente cerrados, se almacenan en dos cámaras (2°C y 10°C), en oscuridad y con control de la humedad relativa. Las muestras (PEAI y calor) almacenadas a 2°C se analizaron después de 18, 35, 53 y 70 días, y las almacenadas a 10°C se analizaron después de 7, 25, 42 y 60 días.

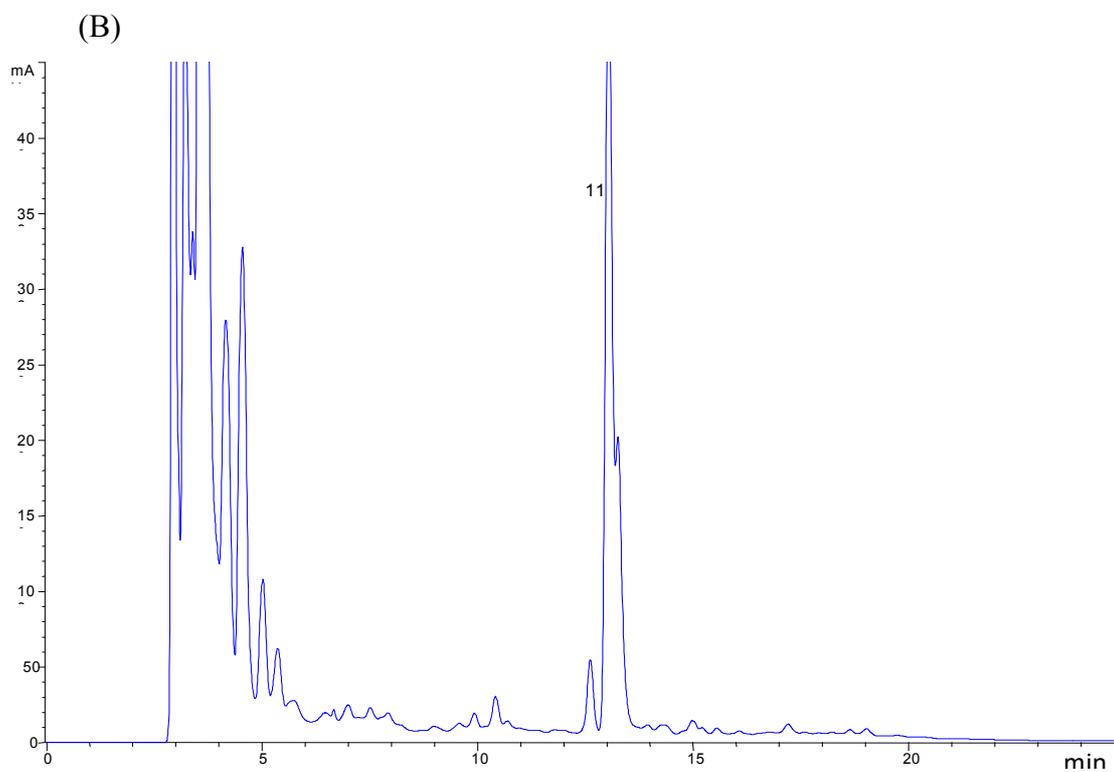
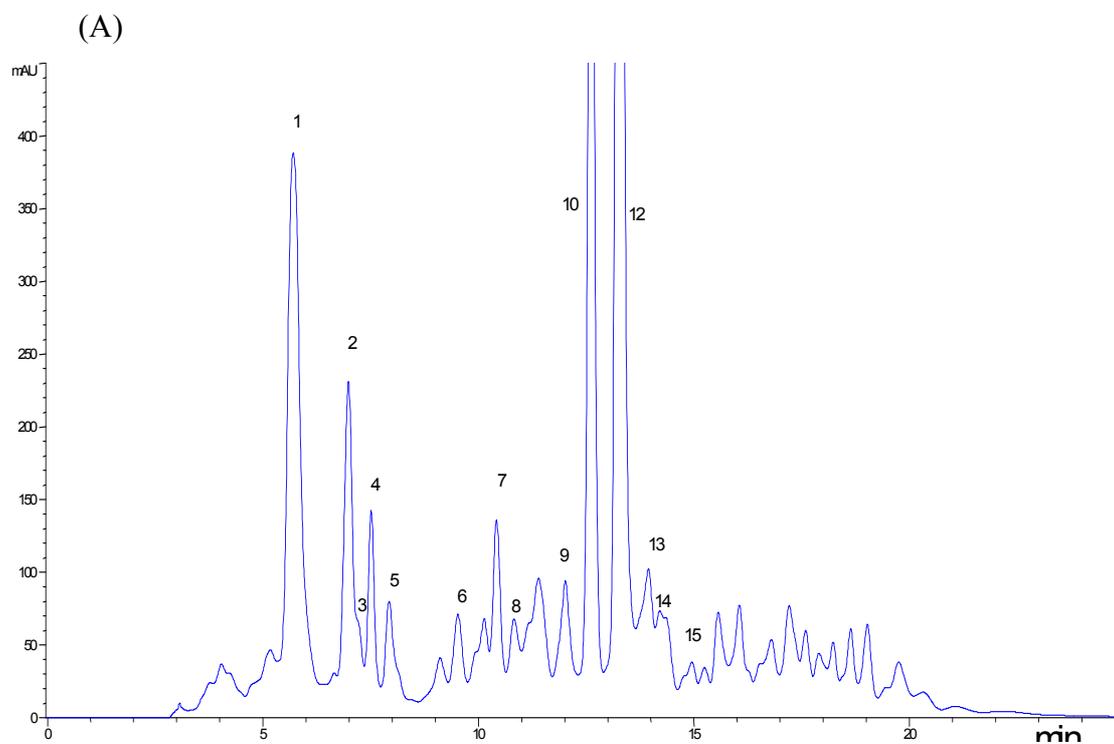
#### **4.5.8.- ALMACENAMIENTO DEL ZUMO FRESCO A -40°C**

La congelación de zumos de frutas y vegetales es una práctica común en la industria para mantener su calidad durante largos periodos de tiempo. Sin embargo, durante el almacenamiento en congelación de los alimentos pueden darse importantes cambios nutricionales, aparecer aromas no deseados (off-flavour), y cambios en el color y/o textura, ya que los sistemas enzimáticos pueden permanecer activos incluso a temperaturas por debajo de cero (Rodríguez-Saona et al., 1995; Lisiewska & Kmiecik, 2000; Sahari et al., 2004). Lisiewska y Kmiecik (2000) estudiaron el efecto del periodo de almacenamiento y de la temperatura en la composición química y en la calidad organoléptica de unos botes de tomates congelados de dos variedades diferentes, y encontraron diferencias significativas en los contenidos de vitamina C, carotenoides y  $\beta$ -caroteno para cada variedad de tomate. Después de 6 meses de almacenamiento en congelación, estos tomates, en comparación con la materia prima, contenían 38 y 26% menos vitamina C, 18 y 7% menos carotenoides, y 21 y 7% menos  $\beta$ -caroteno. Lisiewska et al. (2004) obtuvieron que el nivel de  $\beta$ -caroteno era estable en todas las muestras de eneldo durante la congelación y el almacenamiento en congelación (-20, -30 y -40°C) durante más de 3 meses. La opinión mayoritaria es que la congelación no previene de la degradación de carotenoides. De acuerdo con Biacs y Wissgott (1997) las pérdidas se deben sobretodo a la actividad enzimática, particularmente en un medio

aerobio. Como ya se ha comentado, la concentración de vitamina C es un indicador del valor nutritivo del alimento, por lo que se utiliza como parámetro de calidad nutritiva y, la degradación de los carotenoides afecta no sólo al color si no también a su valor nutritivo y aroma.

Para poder establecer los posibles cambios en el zumo mezcla de naranja-zanahoria durante su almacenamiento en congelación, se estudia la estabilidad de estos zumos almacenados a  $-40^{\circ}\text{C}$  durante 132 días.

Figura nº 68. Cromatograma de zumo mezcla de naranja-zanahoria sin tratar a  $\lambda=450$  nm (A) y  $\lambda=290$  nm (B).



Cuadro n° 62. Longitudes de onda y tiempos de retención del zumo mezcla de naranja-zanahoria.

Picos	Carotenoides	$\lambda$ (nm)	Naranja-zanahoria
			$t_R$ (min) $\pm$ RSD
1	9- <i>cis</i> -violaxantina+Neoxantina	430	5.75 $\pm$ 0.04
2	Anteraxantina	450	7.01 $\pm$ 0.03
3	Mutatoxantina	430	7.20 $\pm$ 0.01
4	Luteína	450	7.54 $\pm$ 0.02
5	Zeaxantina	450	7.96 $\pm$ 0.04
6	$\alpha$ -criptoxantina	450	9.53 $\pm$ 0.03
7	$\beta$ -criptoxantina	450	10.45 $\pm$ 0.04
8	<i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina	450	10.83 $\pm$ 0.05
9	9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	430	12.06 $\pm$ 0.04
10	$\alpha$ -caroteno	450	12.63 $\pm$ 0.03
11	Fitoeno+Fitoflueno	290	13.06 $\pm$ 0.02
12	$\beta$ -caroteno	450	13.28 $\pm$ 0.03
13	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	450	13.95 $\pm$ 0.02
14	$\zeta$ -caroteno	430	14.28 $\pm$ 0.04
15	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	450	14.96 $\pm$ 0.03

Tiempo de Retención:  $t_R$

#### **4.5.9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### ***4.5.9.1.- Efectos del Tratamiento por Calor y por PEAI sobre el Contenido de Carotenoides***

*Efecto del tratamiento por calor en el contenido de carotenoides del zumo de naranja-zanahoria.*

El perfil cromatográfico del extracto saponificado del zumo fresco de naranja-zanahoria se observa en la figura nº 68, y los carotenoides identificados aparecen en el cuadro nº 62.

En el cuadro nº 63 se muestra la concentración media de cada uno de los carotenos cuantificados en el zumo fresco de naranja-zanahoria así como su actividad vitamínica expresada como equivalentes de retinol. También se indica la concentración de cada uno de los carotenoides en el zumo de naranja-zanahoria tratado térmicamente. De todos los carotenoides estudiados sólo 5 disminuyen significativamente ( $p < 0.05$ ): 9-*cis*-violaxantina+neoxantina (32.9%), anteraxantina (3.9%),  $\alpha$ -criptoxantina (15.5%), 9-*cis*- $\alpha$ -caroteno (25.9%) y 9-*cis*- $\beta$ -caroteno (27.3%), el resto aumentan significativamente excepto la luteína, mutatoxantina,  $\beta$ -caroteno y  $\xi$ -caroteno. El mayor aumento de concentración lo presenta el 13-*cis*- $\beta$ -caroteno (163.9%), seguido de la zeaxantina (46.5%) y de la *cis*- $\beta$ -criptoxantina (46.3%). La disminución de violaxantina+neoxantina y anteraxantina después de la pasteurización coincide con el incremento de mutatoxantina. Esto se explica porque la violaxantina y la anteraxantina en condiciones muy ácidas se convierte en mutatoxantina y otros compuestos como auroxantina, no identificado en este caso (Granado et al., 1992).

La vitamina A aumenta en el zumo de naranja-zanahoria respecto al zumo sin tratar.

El tratamiento térmico está relacionado con un aumento en la concentración de carotenoides, quizás debido a la degradación enzimática y a inexplicables pérdidas de humedad y de sólidos solubles que concentran la muestra por unidad de peso (Rodríguez-Amaya, 1997). El calor induce la isomerización *cis/trans* (13-*cis*- $\beta$ -

caroteno) y la formación de diferentes derivados carotenoides (Quackembush, 1987; Khachik et al., 1991; Khachik et al., 1992). Lee y Coates (2003) estudiaron el efecto del tratamiento térmico (90°C, 30 s) sobre el color y los pigmentos de las naranjas, obteniendo que los carotenoides que disminuían eran la violaxantina (46.4%), cis-violaxantina (19.7%) y anteraxantina (24.8%). Estos autores obtuvieron un claro aumento en la concentración de luteoxantina (30.9%), mutatoxantina (74.2%), luteína (13.4%) y  $\zeta$ -caroteno (23.1%). Doering et al. (1995) indicaron que al exponer el  $\beta$ -caroteno a temperaturas inferiores a 100°C se formaba principalmente 13 y 15-cis- $\beta$ -caroteno, y que el 9-cis- $\beta$ -caroteno se formaba cuando la temperatura era superior a 100°C. Resultados similares obtuvieron Kuki et al. (1991), cuando el  $\beta$ -caroteno se calienta a 80°C durante 30 min se forma 13-cis y 15-cis- $\beta$ -caroteno. Sin embargo, Chen et al. (1995) y Johnsson (1991) obtuvieron que el  $\beta$ -caroteno en zumo de zanahoria era estable a la cis-isomerización cuando se pasteurizaba a 100°C. Marx et al. (2003) estudiaron los efectos del tratamiento térmico sobre la *trans-cis*-isomerización del  $\beta$ -caroteno en zumo de zanahoria, obteniendo que la pasteurización a 95°C y la esterilización a 121°C producían la formación de 13-cis- $\beta$ -caroteno en menor porcentaje que si el zumo se esterilizaba a 130°C. Lavelli y Giovanelli (2003) evaluaron el efecto del calor durante el almacenamiento en productos derivados del tomate, obteniendo que el contenido de  $\beta$ -caroteno disminuía incluso a 30°C. Bull et al. (2004) indicaron que el tratamiento por altas presiones y el tratamiento térmico del zumo de naranja no disminuía significativamente el contenido de  $\beta$ -caroteno.

*Efecto del tratamiento por PEAI en el contenido de carotenoides del zumo de naranja-zanahoria.*

Para establecer el efecto de los tratamientos por PEAI se aplican distintos campos (25, 30, 35 y 40 kV/cm) durante diferentes tiempos (desde 30 hasta 340  $\mu$ s), en todos los casos se comparan los resultados con un zumo de naranja-zanahoria sin tratar. En los cuadros nº 64 - 67 se muestran los resultados obtenidos. En los cuadros se indica

la temperatura máxima alcanzada en cada uno de los tratamientos, véase que en ningún caso se superan los 65°C.

Se observa que la concentración de la mezcla 9-cis-violaxantina+neoxantina aumenta con el tiempo de tratamiento, aunque el ajuste no es significativo se observa que la velocidad de formación de estos carotenoides aumenta con la intensidad de tratamiento:  $0.73 \pm 0.18$  ( $R^2 = 0.89$ ,  $p < 0.05$ ),  $0.97 \pm 0.35$  ( $R^2 = 0.81$ ,  $p < 0.05$ ),  $1.63 \pm 0.79$  ( $R^2 = 0.68$ ,  $p > 0.05$ ) y  $1.86 \pm 0.69$  ( $R^2 = 0.81$ ,  $p < 0.05$ )  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de zumo por  $\mu\text{s}$ , para el zumo tratado a 25, 30, 35 y 40 kV/cm, respectivamente. Algo similar ocurre con la concentración de anteraxantina, que aumenta con el tiempo de tratamiento y su velocidad de formación se incrementa con la intensidad del tratamiento:  $0.26 \pm 0.07$  ( $R^2 = 0.90$ ,  $p < 0.05$ ),  $0.42 \pm 0.08$  ( $R^2 = 0.93$ ,  $p < 0.05$ ),  $0.75 \pm 0.12$  ( $R^2 = 0.95$ ,  $p < 0.05$ ) y  $0.94 \pm 0.27$  ( $R^2 = 0.87$ ,  $p < 0.05$ )  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de zumo por  $\mu\text{s}$ , para el zumo tratado a 25, 30, 35 y 40 kV/cm, respectivamente. Un comportamiento similar se observa en la evolución de la concentración de cis- $\beta$ -criptoxantina y 9-cis- $\alpha$ -caroteno. En el campo de 25 kV/cm hay un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en los primeros 110  $\mu\text{s}$ , disminuyendo cuando el tiempo de tratamiento es mayor. Cuando la intensidad del campo aumenta (30, 35 y 40 kV/cm), la concentración de cis- $\beta$ -criptoxantina incrementa con el tiempo de tratamiento, mientras que la concentración de 9-cis- $\alpha$ -caroteno aumenta cuando la intensidad del campo es 30 kV/cm pero disminuye a intensidades de campo mayores. La concentración de  $\alpha$ -caroteno aumenta cuando se aplican campos de 25 y 30 kV/cm, se mantiene en los tratamientos de 40 kV/cm, y decrece significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando la intensidad de campo es de 35 kV/cm., se puede observar que en este resultado no influye el tiempo de tratamiento. La concentración de  $\beta$ -caroteno es mayor cuando la intensidad del campo es de 30 kV/cm, aunque este aumento no es significativo ( $p > 0.05$ ). Cuando la intensidad de campo aplicada es 25, 35 o 40 kV/cm no se observan diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) con el tiempo de tratamiento. La concentración de 13-cis- $\beta$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno y 9-cis- $\beta$ -caroteno aumenta con el tiempo de tratamiento en el campo de 25 kV/cm. En los campos de 30 y 35 kV/cm no se observan diferencias significativas en la concentración de 13-cis- $\beta$ -caroteno y  $\zeta$ -caroteno con el tiempo de tratamiento, pero disminuyen significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando la intensidad del

campo aumenta (40 kV/cm). La concentración de 9-cis- $\beta$ -caroteno decrece en los campos de 35 y 40 kV/cm e incrementa en los campos de 25 y 30 kV/cm. En el cuadro n° 69 se muestran las tendencias de la evolución de la concentración de luteína y zeaxantina con la intensidad del campo y el tiempo de tratamiento.

En el campo de 25 kV/cm la concentración de todos los carotenoides identificados aumenta respecto al zumo fresco de naranja-zanahoria. Por otra parte la concentración de todos los carotenoides incrementa cuando los tiempos de tratamiento aplicados son cortos, mientras que disminuyen o mantienen a tiempos más altos (cuadros n° 64 - 67), respecto a la concentración en el primer tiempo de tratamiento. En el campo de 30 kV/cm también se observa un aumento de la concentración, siendo este muy significativo cuando el tiempo aplicado es de 200  $\mu$ s.

El procesado por PEAI es una alternativa al tratamiento térmico del zumo mezcla de naranja-zanahoria, siendo necesario para seleccionar las mejores condiciones de tratamiento, no solo considerar la inactivación microbiológica y enzimática, sino también las características organolépticas y el valor nutritivo.

Al comparar el zumo fresco con el tratado por PEAI, la concentración de vitamina A es mayor en el zumo mezcla naranja-zanahoria tratado a 25 kV/cm, sobre todo en los tres primeros tiempos, después de 280  $\mu$ s el aumento de la concentración de vitamina A es menor. Cuando la intensidad del campo es 30 kV/cm la vitamina A incrementa con el tiempo de tratamiento, hay un aumento del 58.2% en el último tiempo aplicado (220  $\mu$ s), respecto al zumo sin tratar. Sin embargo para el primer tiempo aplicado hay un gran descenso de la concentración de vitamina A (-29%). En el campo de 35 kV/cm, la vitamina A inicial (zumo sin tratar) disminuye en todos los casos. Cuando se aplica un campo de 40 kV/cm la vitamina A aumenta, 4.5% y 20% en el primer y segundo tiempo de tratamiento aplicado, respectivamente, pero después disminuye alcanzando concentraciones similares a las del zumo fresco. Véase figura n° 70.

Los resultados obtenidos cuando se aplican los PEAI al zumo no se pueden comparar con otros autores porque no se han encontrado trabajos similares en la bibliografía.

Cuadro n° 63. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y de vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria sin tratar y pasteurizado.

Picos	Carotenoides	Zumo Naranja-Zanahoria	
		sin Tratar	Pasteurizado
1	9- <i>cis</i> -violaxantina+Neoxantina	332.29 $\pm$ 19.94	223.03 $\pm$ 10.95
2	Anteraxantina	132.12 $\pm$ 5.28	126.97 $\pm$ 6.33
3	Mutatoxantina	13.87 $\pm$ 0.83	15.08 $\pm$ 0.96
4	Luteína	45.17 $\pm$ 2.71	47.20 $\pm$ 3.01
5	Zeaxantina	37.15 $\pm$ 2.19	54.42 $\pm$ 1.56
6	$\alpha$ -criptoxantina	25.46 $\pm$ 0.81	21.51 $\pm$ 1.51
7	$\beta$ -criptoxantina	38.81 $\pm$ 2.87	50.17 $\pm$ 2.03
8	<i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina	26.29 $\pm$ 0.98	38.46 $\pm$ 1.22
9	9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	106.40 $\pm$ 3.23	78.76 $\pm$ 1.58
10	$\alpha$ -caroteno	691.02 $\pm$ 18.56	818.63 $\pm$ 16.32
11	Fitoeno+Fitoflueno	334.36 $\pm$ 11.02	401.90 $\pm$ 15.27
12	$\beta$ -caroteno	1789.69 $\pm$ 108.36	1893.49 $\pm$ 112.23
13	13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	99.71 $\pm$ 7.38	263.13 $\pm$ 15.63
14	$\zeta$ -caroteno	100.14 $\pm$ 4.66	99.14 $\pm$ 3.97
15	9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	41.33 $\pm$ 3.02	30.05 $\pm$ 2.85
Vitamina A		367.45 $\pm$ 22.05	396.24 $\pm$ 31.64

Parte Experimental

Cuadro n° 64. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI con campo de 25 kV/cm.

Tiempo Tratamiento ( $\mu\text{s}$ )	0	60	110	200	280	340
Picos Temperatura Máxima ( $^{\circ}\text{C}$ )	40	44	51	58	65	
1 9- <i>cis</i> -violaxantina+Neoxantina	381.46	522.73	493.74	648.35	602.03	662.53
2 Anteraxantina	135.32	177.04	154.22	226.07	215.17	223.91
3 Mutatoxantina	11.54	28.58	44.02	30.22	19.91	26.19
4 Luteína	50.46	73.92	60.14	84.06	87.57	87.18
5 Zeaxantina	43.11	26.56	48.50	64.19	67.67	68.69
6 $\alpha$ -criptoxantina	26.16	30.47	37.21	37.24	42.68	36.60
7 $\beta$ -criptoxantina	38.35	66.89	99.16	90.90	87.86	84.47
8 <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina	30.70	50.64	58.37	55.22	46.17	31.28
9 9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	59.86	75.26	193.74	177.92	165.33	144.85
10 $\alpha$ -caroteno	722.17	920.14	848.29	975.48	793.19	812.20
11 Fitoeno+Fitoflueno	320.56	629.95	402.90	506.90	497.26	598.53
12 $\beta$ -caroteno	1928.78	2132.48	1950.31	2365.17	1996.79	1935.79
13 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	97.21	91.04	220.73	157.88	199.71	83.56
14 $\zeta$ -caroteno	80.98	146.51	194.77	154.26	141.91	142.65
15 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	30.13	66.75	57.49	47.62	62.96	75.52
<b>Vitamina A</b>	<b>391.59</b>	<b>449.88</b>	<b>420.24</b>	<b>495.92</b>	<b>418.05</b>	<b>409.24</b>

Cuadro n° 65. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI con campo de 30 kV/cm.

Tiempo Tratamiento ( $\mu\text{s}$ )	0	60	110	170	200	220
<b>Picos</b>		<b>42</b>	<b>47</b>	<b>56</b>	<b>61</b>	<b>64</b>
<b>Temperatura Máxima (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b>						
1 9- <i>cis</i> -violaxantina+Neoxantina	381.46	486.82	511.07	549.00	494.07	693.25
2 Anteraxantina	135.32	191.40	214.41	227.16	219.28	247.36
3 Mutatoxantina	11.54	20.37	25.06	24.36	24.60	31.26
4 Luteína	50.46	65.93	83.46	86.09	85.96	96.96
5 Zeaxantina	43.11	57.54	66.31	67.06	70.68	84.50
6 $\alpha$ -criptoxantina	26.16	45.05	43.22	43.71	42.04	50.35
7 $\beta$ -criptoxantina	38.35	60.30	73.71	87.59	67.79	107.22
8 <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina	30.70	56.59	47.77	47.44	67.61	75.68
9 9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	59.86	143.14	161.89	155.03	169.49	259.14
10 $\alpha$ -caroteno	722.17	1002.91	1121.57	1100.34	934.37	1185.56
11 Fitoeno+Fitoflueno	320.56	364.02	467.99	504.10	646.99	560.87
12 $\beta$ -caroteno	1928.78	1051.66	2127.89	2435.42	2007.34	2965.81
13 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	97.21	126.94	165.09	179.01	188.93	202.03
14 $\zeta$ -caroteno	80.98	176.66	168.19	162.15	189.62	211.77
15 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	30.13	69.34	70.25	63.68	83.93	89.64
<b>Vitamina A</b>	<b>391.59</b>	<b>278.60</b>	<b>468.27</b>	<b>518.42</b>	<b>433.87</b>	<b>619.68</b>

Parte Experimental

Cuadro n° 66. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI con campo de 35 kV/cm.

Tiempo Tratamiento ( $\mu\text{s}$ )	0	60	90	110	130	150
Picos Temperatura Máxima ( $^{\circ}\text{C}$ )	44	50	54	59	64	
1 9- <i>cis</i> -violaxantina+Neoxantina	261.00	501.00	313.75	383.64	537.22	552.20
2 Anteraxantina	93.73	148.99	157.14	204.03	194.79	198.43
3 Mutatoxantina	16.38	18.00	14.89	15.52	13.43	15.31
4 Luteína	38.56	61.48	64.98	78.33	84.48	81.43
5 Zeaxantina	33.39	47.6	53.89	53.13	70.88	76.09
6 $\alpha$ -criptoxantina	29.11	33.92	29.04	28.28	27.03	29.21
7 $\beta$ -criptoxantina	35.71	45.08	53.47	71.49	105.24	92.70
8 <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina	25.20	36.13	30.79	27.83	31.39	36.21
9 9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	222.69	137.15	161.81	143.87	153.04	133.3
10 $\alpha$ -caroteno	867.62	472.61	577.91	571.76	721.70	489.43
11 Fitoeno+Fitoflueno	423.15	447.64	348.67	368.46	387.53	375.32
12 $\beta$ -caroteno	2253.27	1086.74	1564.3	1644.78	2102.18	1000.86
13 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	157.95	118.04	115.41	112.51	103.72	41.51
14 $\zeta$ -caroteno	205.50	132.83	122.48	116.38	145.25	126.47
15 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	70.66	40.44	45.11	48.89	46.68	50.74
<b>Vitamina A</b>	<b>467.95</b>	<b>235.33</b>	<b>323.54</b>	<b>337.43</b>	<b>431.38</b>	<b>225.86</b>

Cuadro n° 67. Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI con campo de 40 kV/cm.

Tiempo Tratamiento ( $\mu\text{s}$ )	0	30	60	80	90	100
Picos Temperatura Máxima ( $^{\circ}\text{C}$ )		43	53	61	60	65
1 9- <i>cis</i> -violaxantina+Neoxantina	305.23	484.92	519.44	507.22	466.93	562.35
2 Anteraxantina	164.09	189.46	220.31	258.31	276.77	225.64
3 Mutatoxantina	16.03	10.67	8.76	12.63	10.97	8.97
4 Luteína	41.19	55.79	67.13	78.40	56.84	71.63
5 Zeaxantina	29.00	38.36	39.67	42.95	32.66	40.62
6 $\alpha$ -criptoxantina	20.39	18.03	14.36	13.79	13.93	15.19
7 $\beta$ -criptoxantina	42.79	57.68	63.86	83.86	93.16	87.09
8 <i>cis</i> - $\beta$ -criptoxantina	18.57	42.82	31.19	39.13	46.18	36.83
9 9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	83.18	78.92	59.56	70.47	77.78	66.57
10 $\alpha$ -caroteno	452.13	490.87	541.20	443.47	452.12	462.32
11 Fitoeno+Fitoflueno	273.15	201.90	203.13	208.70	226.27	230.53
12 $\beta$ -caroteno	1047.93	1073.35	1264.06	975.06	1025.15	1032.81
13 13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	46.46	67.25	92.68	48.54	53.52	45.43
14 $\zeta$ -caroteno	33.10	49.10	39.01	36.79	42.02	33.74
15 9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	34.41	6.60	9.21	6.98	13.24	4.84
<b>Vitamina A</b>	<b>218.66</b>	<b>228.70</b>	<b>264.35</b>	<b>209.77</b>	<b>219.80</b>	<b>220.73</b>

Figura nº 69. Concentración de luteína y zeaxantina ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) en diferentes campos eléctricos en zumo de naranja-zanahoria.

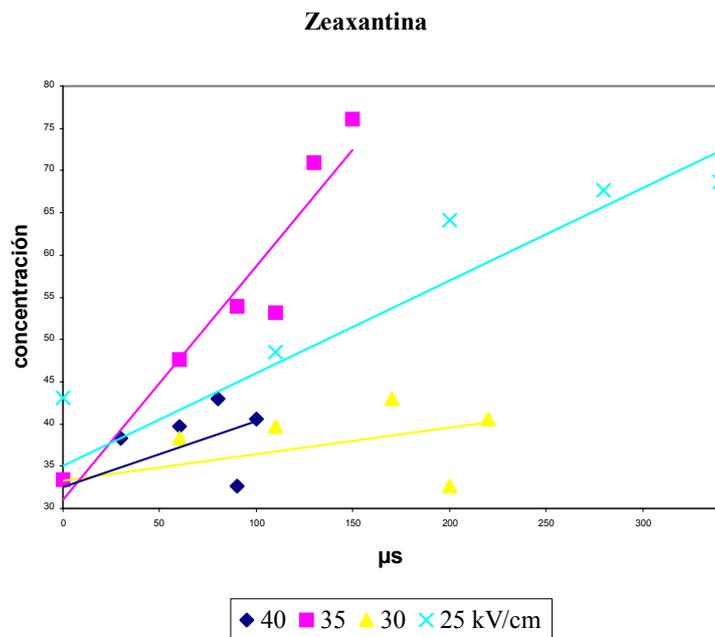
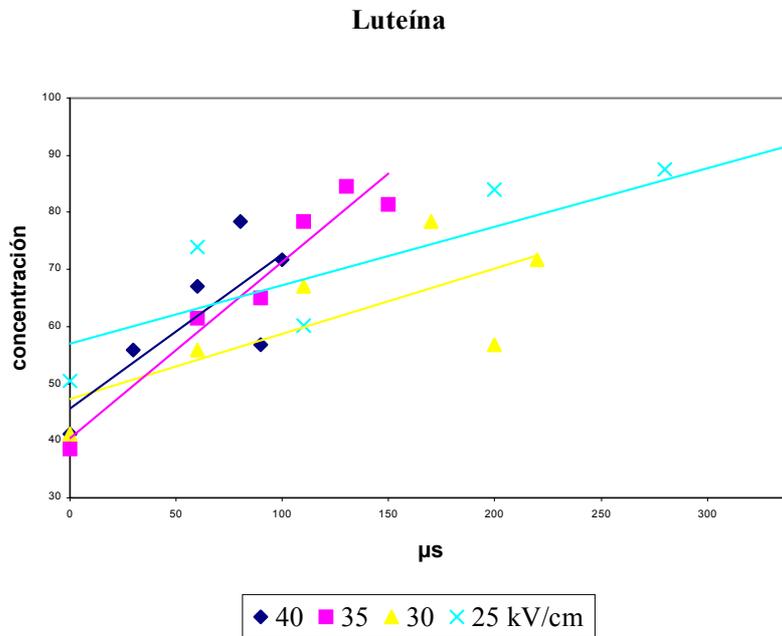
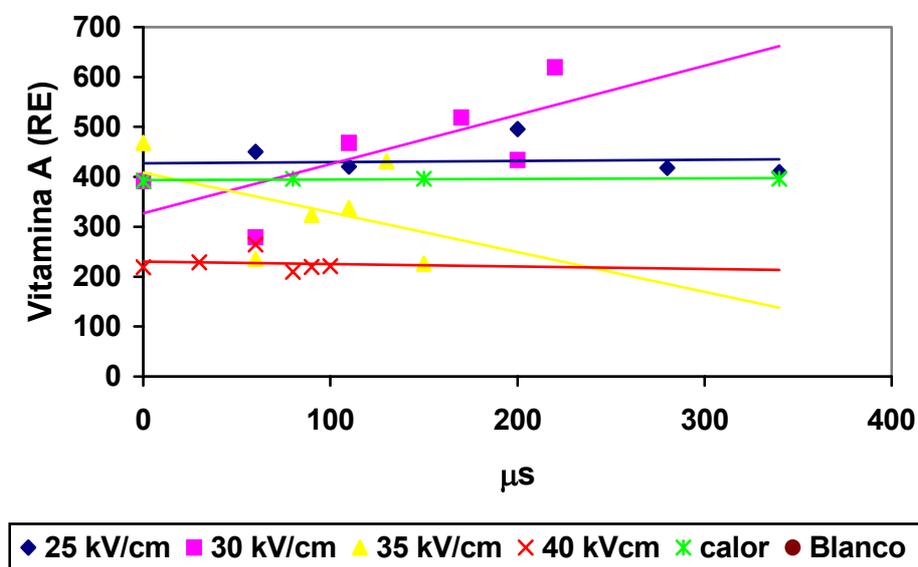


Figura nº 70. Variación de la vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) con el tratamiento de PEAI y calor.



*Efecto del Tratamiento por PEAI o por Calor sobre la Vitamina C.*

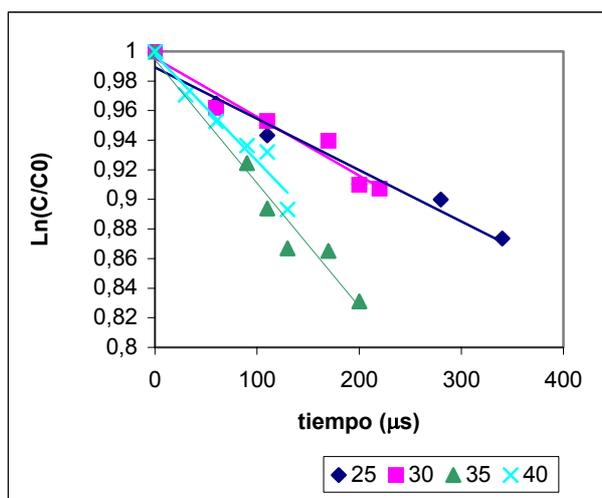
Se estudian distintos campos (25, 30, 35 y 40 kV/cm) y en cada uno de ellos cinco tiempos de tratamiento (de 30 a 340  $\mu\text{s}$ ). En el cuadro nº 68 se muestran los resultados obtenidos. La concentración de ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria fresco no sometido a ningún tratamiento es de  $27.11 \pm 0.44 \text{ mg}/100\text{mL}$ . Al ajustar por mínimos cuadrados la concentración remanente de ácido ascórbico frente al tiempo de tratamiento en cada uno de los campos se observa que sigue una cinética de orden cero (véase figura nº 71):  $C = C_0 - kt$ , donde  $C$  es la concentración de ácido ascórbico después del tratamiento ( $\text{mg}/100\text{mL}$ ),  $C_0$  es la concentración en el zumo sin tratar,  $k$  es la velocidad de degradación del ácido ascórbico ( $\mu\text{s}^{-1}$ ),  $t$  es el tiempo de tratamiento ( $\mu\text{s}$ ). La velocidad de degradación ( $k$ ) del ácido ascórbico obtenida es  $-0.009 \pm 0.0008 \mu\text{s}^{-1}$  (coeficiente de correlación 0.984, error estándar 0.250);  $-0.014 \pm 0.0009 \mu\text{s}^{-1}$  (coeficiente de correlación 0.992, error estándar 0.177);  $-0.022 \pm 0.0023 \mu\text{s}^{-1}$  (coeficiente de correlación 0.981, error estándar 0.0352) y

$-0.0187 \pm 0.0049 \mu\text{s}^{-1}$  (coeficiente de correlación 0.884, error estándar 0.545) para el campo de 25, 30, 35 y 40 kV/cm, respectivamente. En todos los casos el ajuste es significativo al 99 % ( $p < 0.01$ ) excepto para el campo de 40 kV/cm en el que el ajuste es significativo al 95 % ( $p < 0.05$ ).

La degradación del ácido ascórbico estudiada por otros autores se ajusta a una cinética de orden 1. Esto se explica teniendo en cuenta que el tiempo de tratamiento en PEAI es de  $\mu\text{s}$ , mientras que en los procesos térmicos el tiempo durante el que se aplica calor es mayor, en este caso las curvas de degradación se dividen claramente en dos tramos lineales que se corresponden con dos tipos de degradación, una aeróbica y otra anaeróbica (Nagy, 1980; Eison-Perchonok & Downes, 1982; Robertson & Samaniego, 1986; Kennedy et al., 1992; Ariaahu et al., 1997; Esteve et al., 1998; Esteve et al., 1999; Blasco et al., 2004). Al ser tratamientos tan cortos ( $\mu\text{s}$ ) cuando se aplican PEAI no se consiguen condiciones anaeróbicas.

Los resultados obtenidos nos indican que en el tratamiento por PEAI a 25 kV/cm la velocidad de degradación del ácido ascórbico es menor por lo que es el de elección para la conservación del zumo de naranja-zanahoria y su posterior estimación de la vida útil de dicho zumo.

Figura nº 71. Degradación (k) del ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria en cada uno de los tratamientos de PEAI estudiados.



Cuadro n° 68. Concentración de ácido ascórbico (mg/100mL) en el zumo de naranja-zanahoria para los distintos campos y tiempos de tratamiento.

<b>Campo (kV/cm)</b>	<b>Tiempo (<math>\mu</math>s)</b>	<b>Ácido ascórbico<math>\pm</math>RSD (mg/100mL)</b>
25	60	26.16 $\pm$ 0.635
25	110	25.57 $\pm$ 0.317
25	200	24.69 $\pm$ 0.864
25	280	24.40 $\pm$ 0.690
25	340	23.68 $\pm$ 1.499
30	60	26.07 $\pm$ 0.466
30	110	25.83 $\pm$ 1.043
30	170	25.47 $\pm$ 1.025
30	200	24.66 $\pm$ 0.868
30	220	24.60 $\pm$ 1.030
35	90	25.07 $\pm$ 0.680
35	110	24.24 $\pm$ 0.267
35	130	23.50 $\pm$ 0.260
35	170	23.46 $\pm$ 0.439
35	200	22.53 $\pm$ 1.192
40	30	26.32 $\pm$ 0.255
40	60	24.83 $\pm$ 0.388
40	90	25.38 $\pm$ 0.147
40	110	25.27 $\pm$ 0.307
40	130	24.21 $\pm$ 0.292

#### 4.5.9.2.- Vida Útil (a 2 y 10°C)

##### *pH, °Brix y Vitamina C.*

Para poder comparar la vida útil del zumo de naranja-zanahoria pasteurizado y el tratado por PEAI, en primer lugar se estudia la cinética de degradación del ácido ascórbico cuando se trata el zumo por PEAI a 25 kV/cm durante dos tiempos a 280  $\mu$ s (alcanzando las temperaturas de 65 y 68 °C) y durante 330  $\mu$ s (alcanzando la temperatura de 74 °C), y cuando a la muestra de zumo se le aplica un tratamiento térmico (98 °C durante 21 s), manteniéndolo después del tratamiento en refrigeración a 2 y 10°C durante el periodo de estudio. La concentración inicial de vitamina C en el zumo mezcla de naranja-zanahoria es de  $23.49 \pm 0.53$  mg/100mL. Durante todo el estudio se controla el pH y los °Brix de los zumos, obteniendo que el tratamiento no influye sobre estos parámetros, no observándose ninguna modificación durante el almacenamiento. Los valores de pH son  $3.87 \pm 0.05$ ,  $3.88 \pm 0.18$ ,  $3.83 \pm 0.06$  y  $3.79 \pm 0.09$  para el zumo pasteurizado, el tratado por PEAI a 280  $\mu$ s a 65 °C, el tratado por PEAI a 280  $\mu$ s a 68 °C y el zumo por PEAI a 330  $\mu$ s a 74°C, respectivamente. Los °Brix son  $10.1 \pm 1.4$ ,  $9.98 \pm 1.3$ ,  $10.8 \pm 0.9$ , y  $10.4 \pm 0.7$  para el zumo pasteurizado, el zumo por PEAI a 280  $\mu$ s a 65 °C, el tratado por PEAI a 280  $\mu$ s a 68 °C y el tratado por PEAI a 330  $\mu$ s a 74°C, respectivamente.

La concentración remanente de ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria pasteurizado es del 83 %, mientras que en el zumo tratado por PEAI es del 90 % (ver cuadro nº 69), por lo que claramente se observa que el tratamiento por PEAI afecta menos al valor nutricional que la pasteurización. Qiu et al. (1998) observaron que la degradación de la vitamina C en zumo de naranja era menor cuando se aplicaba PEAI que cuando se procesaba térmicamente. Grahl y Märkl (1996) obtuvieron que el ácido ascórbico remanente en leche después de aplicar un tratamiento PEAI era mayor del 90%.

Durante el almacenamiento la concentración de vitamina C en el zumo disminuye según las condiciones de almacenamiento. Teniendo en cuenta estudios

previos (Kincal & Giray, 1987; Esteve et al., 1995<sup>a</sup>) se considera que el ácido ascórbico sigue una cinética de degradación de primer orden:

$$C = C_0 \exp(-k_T t) \quad (1)$$

En donde  $C_0$  es el contenido de ácido ascórbico inicial (mg/100 mL),  $k_T$  es el índice constante ( $\text{día}^{-1}$ ),  $C$  es el contenido en ácido ascórbico al tiempo  $t$  (mg/100 mL), y  $t$  es el tiempo de almacenamiento (días).

Para estudiar la degradación del ácido ascórbico, se representa  $\ln(C/C_0)$  frente al tiempo de almacenamiento para cada tratamiento aplicado (figura n° 72). La velocidad de degradación del ácido ascórbico en el zumo estudiado, así como el coeficiente de correlación, durante el almacenamiento a 2 y 10 °C se indica en el cuadro n° 69 para cada uno de los tratamientos de conservación aplicados. Se observa que la velocidad de degradación del ácido ascórbico cuando el zumo se almacena a 2 °C es menor que cuando la temperatura de almacenamiento es de 10 °C (tal como cabría esperar). La velocidad de degradación es mayor en el zumo pasteurizado que en el tratado por PEAI. No se observa una diferencia significativa entre el tratamiento por PEAI durante 280  $\mu\text{s}$  a 65 °C y a 68 °C, mientras que la degradación es significativamente mayor cuando se aplica un tratamiento PEAI durante 330  $\mu\text{s}$ .

La vida útil del zumo pasteurizado y tratado por PEAI (a distintas condiciones) almacenado a 2 y 10 °C se calcula como el tiempo en el cual la concentración de ácido ascórbico se reduce al 50 % y teniendo en cuenta el valor de la velocidad de degradación ( $k_T$ ) obtenida al aplicar la ecuación de Arrhenius (cuadro n° 69) para cada temperatura de almacenamiento. En el cuadro n° 70 se indica la vida media del ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria almacenado a 2 y 10 °C, para cada uno de los tratamientos estudiados. La menor velocidad de degradación del ácido ascórbico en los zumos tratados por PEAI hace que la vida útil del zumo sea mucho mayor que en el zumo pasteurizado. También hay un gran aumento de la vida útil del zumo cuando la temperatura de conservación es de 2 °C, por lo que sería recomendable almacenar el zumo a esta temperatura para asegurar que al consumidor le llega con un alto valor nutritivo. Si comparamos el zumo tratado por PEAI durante 280  $\mu\text{s}$  y durante 330  $\mu\text{s}$ , observamos que en el primer caso la vida útil del zumo es mayor, por lo que sería el tratamiento de elección, no encontrando una diferencia significativa cuando la

temperatura es de 65 ó 68 °C. De los resultados obtenidos podemos deducir que la vida media del zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI es de 50 días si se almacena a 2°C mientras que si el zumo es pasteurizado es de 11 días. Qiu et al. (1998) observaron resultados similares durante el almacenamiento del zumo de naranja, puesto que las muestras que habían sido tratadas por PEAI sufrían menos pérdidas de vitamina C que las tratadas por calor.

Esteve et al. (1996) estudiaron la estabilidad del ácido ascórbico en zumo de naranja natural y en zumos de naranja comerciales mantenidos a 4 y 10 °C, obteniendo que a 4 °C las pérdidas de ácido ascórbico eran menores del 10% a los 7 días de almacenamiento. Choi et al. (2002) obtuvieron que, en un zumo pasteurizado (90°C, 90s), durante el almacenamiento en refrigeración (4.5 °C), el ácido ascórbico disminuía más del 50% dentro de las 3 primeras semanas y se degradaba completamente después de 5 semanas de almacenamiento. Shivashankara et al. (2004) estudiaron el contenido de ácido ascórbico en mango almacenado a 5°C después de un tratamiento de PEAI, observando que el ácido ascórbico disminuye después de 20 días de almacenamiento. Yeom et al. (2000<sup>b</sup>) estudiaron los efectos de los PEAI (35 kV/cm, 59 μs) y del calor (94.6 °C, 30 s) en la concentración del ácido ascórbico en el zumo de naranja durante el almacenamiento a 4 °C y 22 °C. El zumo de naranja tratado por PEAI tuvo un contenido en ácido ascórbico significativamente superior al del pasteurizado durante el almacenamiento a 4 °C. Estos autores obtuvieron que después de 47 días de almacenamiento a 4 °C la concentración de ácido ascórbico se reducía al 50% en el zumo tratado por PEAI, mientras que en el zumo tratado por calor esta reducción era a los 31 días. Si la temperatura de almacenamiento era de 25 °C la concentración de ácido ascórbico se reducía al 50 % a los 13 y 12 días, para el zumo tratado por PEAI y para el tratado por calor, respectivamente.

El contenido de ácido ascórbico en el zumo tratado por PEAI es mayor que en el zumo pasteurizado por calor, y se mantiene durante más tiempo cuando se almacena en refrigeración por lo que su valor nutritivo es mayor.

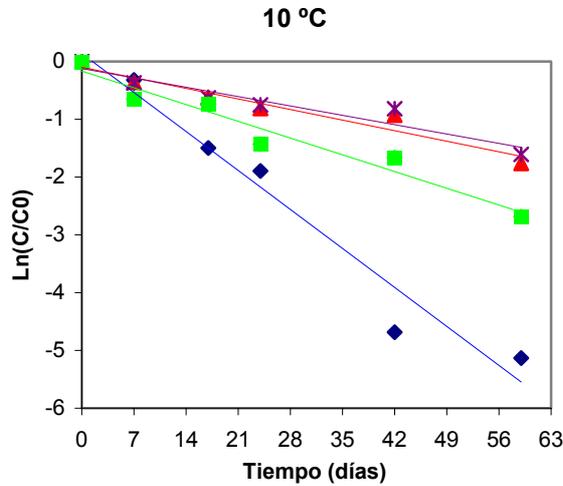
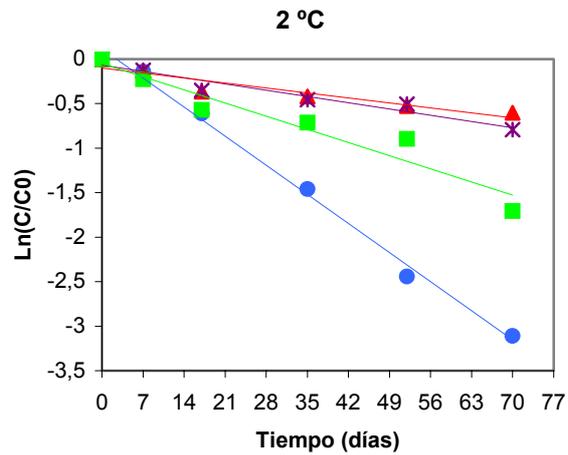
Cuadro n° 69. Constantes ( $k_T$ ) y coeficientes de correlación ( $R^2$ ) para la degradación del ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI y pasteurizado durante el almacenamiento a 2 y 10 °C.

<b>Tratamiento zumo</b>	<b><math>C_0</math> (mg/100 mL)</b>	<b><math>k_T</math> (días<sup>-1</sup>) (RSD)</b>	<b><math>R^2</math></b>
<b>10 °C</b>			
<b>Pasteurizado</b>	19.52	-0.0963 (0.0097)	0.980
<b>PEAI 280<math>\mu</math>s 65°C</b>	21.21	-0.0261 (0.0034)	0.967
<b>PEAI 280<math>\mu</math>s 68°C</b>	20.99	-0.0231 (0.0036)	0.954
<b>PEAI 330<math>\mu</math>s</b>	21.68	-0.0414 (0.0047)	0.975
<b>2°C</b>			
<b>Pasteurizado</b>	19.52	-0.0466 (0.0017)	0.997
<b>PEAI 280<math>\mu</math>s 65°C</b>	21.21	-0.0080 (0.0015)	0.938
<b>PEAI 280<math>\mu</math>s 68°C</b>	20.99	-0.0101 (0.0013)	0.967
<b>PEAI 330<math>\mu</math>s</b>	21.68	-0.0211 (0.0030)	0.963

Cuadro n° 70. Vida media (días) del zumo de naranja-zanahoria pasteurizado y tratado por PEAI cuando se almacena a 2 y 10 °C.

	<b>Temperatura de almacenamiento</b>	
	<b>10 °C</b>	<b>2 °C</b>
	<i>Vida media (días)</i>	<i>Vida media (días)</i>
<b>Pasteurizado</b>	5	11
<b>PEAI 280µs 65°C</b>	19	62
<b>PEAI 280µs 68°C</b>	22	50
<b>PEAI 330µs 74°C</b>	12	24

Figura nº 72. Cinética de degradación del ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI (campo 25 kV/cm) y pasteurizado, durante el almacenamiento a 2 °C y 10 °C.



### ***Carotenos y vitamina A.***

Durante el estudio de la vida útil del zumo de naranja-zanahoria pasteurizado (98 °C durante 21 s) y tratado por PEAI a 25 kV/cm durante dos tiempos a 280  $\mu$ s (66°C) y durante 330  $\mu$ s (74 °C) y almacenado en refrigeración a 2 y 10 °C, se determina el contenido de carotenoides y el contenido de vitamina A y su evolución durante el almacenamiento. La concentración de vitamina A en el zumo fresco mezcla de naranja-zanahoria sin tratar es de  $100.21 \pm 1.29$  y  $31.95 \pm 7.65$   $\mu$ RE/100g para los dos zumos utilizados, mientras que después de aplicar el tratamiento es de  $127.21 \pm 1.29$ ,  $191.42 \pm 0.59$  y  $23.05 \pm 4.78$   $\mu$ RE/100g, para el zumo mezcla de naranja-zanahoria pasteurizado, tratado por PEAI (25 kV/cm) 280 $\mu$ s y 330  $\mu$ s, respectivamente.

En los cuadros n° 71-76, se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro n° 71. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo pasteurizado durante el almacenamiento a  $10^{\circ}\text{C}$ .

Carotenoides	Tiempo almacenamiento (días)					
	Sin tratar	0	7	25	42	60
9- <i>cis</i> -violaxantina	402.62±6.11	517.02±22.02	371.65±1.56	-	-	-
+Neoxantina						
Anteraxantina	135.73±3.76	164.93±48.29	167.30±0.94	-	-	-
Mutatoxantina	22.04±0.22	37.87±7.30	37.34±0.01	35.61±1.18	39.43±0.47	44.51±0.92
Luteína	55.91±0.08	68.05±13.37	74.58±1.39	62.93±1.13	61.60±1.03	68.52±0.19
Zeaxantina	46.67±0.06	73.12±1.91	57.20±0.18	43.93±1.53	43.90±1.52	48.20±0.02
$\alpha$ -criptoxantina	39.35±0.19	55.89±0.15	46.29±0.39	39.60±3.17	37.95±2.25	29.32±1.34
$\beta$ -criptoxantina	76.66±3.58	102.89±7.25	108.01±0.18	82.65±7.27	92.11±4.38	104.83±14.65
9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	41.77±0.47	49.17±10.06	38.61±2.76	-	-	-
$\alpha$ -caroteno	214.64±18.00	258.14±18.00	247.66±6.74	161.23±31.51	196.60±21.65	58.29±3.43
Fitoeno+Fitoflueno	202.68±11.29	248.39±4.19	205.82±0.81	157.43±8.49	142.40±4.58	41.40±0.87
$\beta$ -caroteno	433.60±23.33	552.55±55.00	514.77±1.83	284.61±77.89	340.49±1.85	120.71±4.78
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	43.38±0.46	71.87±3.84	50.43±1.12	65.04±2.61	44.43±0.51	18.22±1.60
$\zeta$ -caroteno	32.64±3.21	81.47±3.04	36.41±0.71	44.10±1.51	29.97±1.31	11.97±0.08
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	8.43±0.29	17.57±0.72	19.42±0.48	-	-	-
Vitamina A	100.21±1.29	127.21±1.29	118.18±0.47	69.78±2.34	82.65±0.94	34.36±0.47

- no detectado

## Parte Experimental

Cuadro n° 72. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo pasteurizado durante el almacenamiento a  $2^{\circ}\text{C}$ .

Carotenoides	Tiempo almacenamiento (días)					
	Sin tratar	0	18	35	53	70
9- <i>cis</i> -violaxantina +Neoxantina	402.62±6.11	517.02±22.02	335.90±7.45	291.73±13.21	198.58±16.34	193.89±5.49
Anteraxantina	135.73±3.76	164.93±48.29	156.05±2.18	143.31±2.19	113.60±4.28	120.75±1.77
Mutatoxantina	22.04±0.22	37.87±7.30	35.49±2.17	36.05±0.92	32.74±2.77	38.64±0.52
Luteína	55.91±0.08	68.05±13.37	74.26±2.43	74.71±5.49	62.04±0.83	75.89±1.25
Zeaxantina	46.67±0.06	73.12±1.91	56.21±1.77	56.36±0.45	16.58±0.09	60.15±0.21
$\alpha$ -criptoxantina	39.35±0.19	55.89±0.15	51.44±1.53	46.59±0.23	15.83±0.51	62.24±0.33
$\beta$ -criptoxantina	76.66±3.58	102.89±7.25	131.01±3.28	101.32±4.35	51.11±5.33	159.08±1.52
9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	41.77±0.47	49.17±10.06	39.80±3.23	-	-	-
$\alpha$ -caroteno	214.64±18.00	258.14±18.00	354.87±0.56	199.68±1.80	77.45±10.95	181.49±0.73
Fitoeno+Fitoflueno	202.68±11.29	248.39±4.19	251.92±4.43	139.36±4.07	75.77±8.86	138.77±1.74
$\beta$ -caroteno	433.60±23.33	552.55±55.00	677.98±9.22	353.32±10.43	145.78±17.28	357.54±10.56
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	43.38±0.46	71.87±3.84	70.53±1.60	39.07±0.15	25.61±0.92	64.48±0.74
$\zeta$ -caroteno	32.64±3.21	81.47±3.04	55.78±1.48	29.78±0.38	19.10±1.12	35.87±0.18
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	8.43±0.29	17.57±0.72	16.32±0.66	-	-	-
Vitamina A	100.21±1.29	127.21±1.29	158.59±0.58	85.73±1.03	36.33±0.39	90.37±0.89

- no detectado

Cuadro n° 73. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo tratado por PEAI a 25 kV/cm, 280  $\mu\text{s}$ , durante el almacenamiento a 10°C.

Carotenoides	Sin tratar	Tiempo almacenamiento (días)				
		0	7	25	42	60
9- <i>cis</i> -violaxantina	402.62±6.11	292.48±2.91	113.44±1.52	-	-	-
+Neoxantina						
Anteraxantina	135.73±3.76	98.97±1.56	45.19±0.75	-	-	-
Mutatoxantina	22.04±0.22	20.14±0.38	18.00±0.88	25.57±2.34	28.86±12.00	29.06±9.36
Luteína	55.91±0.08	44.10±1.58	43.26±0.37	63.84±21.77	57.36±17.92	55.87±11.76
Zeaxantina	46.67±0.06	38.75±1.73	36.95±0.94	43.76±11.85	39.22±14.27	38.09±9.67
$\alpha$ -criptoxantina	39.35±0.19	49.79±3.51	51.97±1.95	53.04±14.81	33.01±18.23	30.21±5.66
$\beta$ -criptoxantina	76.66±3.58	80.65±2.18	105.15±13.66	122.08±11.21	123.30±26.97	121.43±22.01
9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	41.77±0.47	62.72±12.37	92.87±1.93	-	-	-
$\alpha$ -caroteno	214.64±18.00	427.09±0.42	437.17±50.93	550.27±24.91	210.10±8.87	205.35±11.21
Fitoeno+Fitoflueno	202.68±11.29	285.61±32.23	272.26±27.01	334.23±73.94	127.71±11.39	116.98±14.31
$\beta$ -caroteno	433.60±23.33	851.75±17.97	863.73±21.06	1113.99±319.69	396.83±16.41	343.23±19.06
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	43.38±0.46	76.85±7.86	77.07±6.43	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	32.64±3.21	89.80±2.03	83.84±6.89	74.75±4.30	25.46±0.86	24.98±7.76
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	8.43±0.29	29.00±0.76	37.22±10.03	-	-	-
Vitamina A	100.21±1.29	191.42±0.59	196.11±0.15	248.05±78.07	96.06±5.64	86.52±6.45

- no detectado

## Parte Experimental

Cuadro n° 74. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo tratado por PEAI a 25 kV/cm, 280  $\mu\text{s}$ , durante el almacenamiento a 2°C.

Carotenoides	Sin tratar	Tiempo almacenamiento (días)				
		0	18	35	53	70
9- <i>cis</i> -violaxantina	402.62±6.11	292.48±2.91	130.60±0.06	270.65±18.17	341.34±20.80	299.67±17.65
+Neoxantina						
Anteraxantina	135.73±3.76	98.97±1.56	-	127.89±2.34	134.55±41.02	129.66±19.65
Mutatoxantina	22.04±0.22	20.14±0.38	19.98±0.19	28.53±3.01	30.14±0.63	32.12±7.09
Luteína	55.91±0.08	44.10±1.58	42.35±1.09	55.13±2.52	60.05±2.50	63.34±9.21
Zeaxantina	46.67±0.06	38.75±1.73	33.48±1.63	48.70±2.16	16.88±0.37	154.56±2.12
$\alpha$ -criptoxantina	39.35±0.19	49.79±3.51	45.92±0.07	46.83±0.81	14.43±0.28	16.23±9.11
$\beta$ -criptoxantina	76.66±3.58	80.65±2.18	107.04±5.09	135.41±1.06	42.00±6.75	38.36±10.03
9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	41.77±0.47	62.72±12.37	78.55±11.71	18.38±3.32	20.92±0.35	19.87±5.23
$\alpha$ -caroteno	214.64±18.00	427.09±0.42	408.67±55.14	227.35±0.84	149.97±20.15	151.89±16.23
Fitoeno+Fitoflueno	202.68±11.29	285.61±32.23	216.99±22.43	140.35±1.21	96.58±20.52	98.21±7.11
$\beta$ -caroteno	433.60±23.33	851.75±17.97	789.13±110.57	431.18±1.03	317.74±11.14	309.76±12.98
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	43.38±0.46	76.85±7.86	25.52±4.03	33.34±0.75	11.59±1.39	13.21±2.76
$\zeta$ -caroteno	32.64±3.21	89.80±2.03	68.39±0.90	33.21±3.31	32.63±1.82	37.21±2.89
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	8.43±0.29	29.00±0.76	32.41±2.29	-	1.41±0.99	0.98±0.76
Vitamina A	100.21±1.29	191.42±0.59	177.64±3.73	104.44±0.62	71.70±4.24	70.58±3.24

- no detectado

Cuadro n° 75. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo tratado por PEAI a 25 kV/cm, 330  $\mu\text{s}$ , durante el almacenamiento a 10°C.

Carotenoides	Sin tratar	Tiempo almacenamiento (días)				
		0	7	25	42	60
9- <i>cis</i> -violaxantina	359.47±59.39	457.01±58.68	426.89±35.26	233.31±15.60	-	-
+Neoxantina						
Anteraxantina	139.49±19.62	164.64±38.59	181.65±59.00	125.34±2.94	-	-
Mutatoxantina	29.86±5.33	32.45±6.93	46.44±12.72	44.53±0.67	35.55±1.18	44.66±0.67
Luteína	56.27±11.95	61.02±16.50	93.10±23.48	75.64±1.37	55.94±1.23	61.80±6.85
Zeaxantina	15.71±3.28	16.23±5.13	65.64±18.82	56.39±1.28	39.65±1.4	46.07±2.36
$\alpha$ -criptoxantina	9.83±0.56	12.17±4.80	52.39±2.07	49.42±2.59	42.84±0.45	46.28±0.40
$\beta$ -criptoxantina	24.24±2.27	25.92±1.54	111.45±10.52	130.28±7.73	109.68±0.63	125.23±0.1
9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	6.13±0.72	10.28±2.65	19.07±0.85	-	-	-
$\alpha$ -caroteno	65.96±14.79	52.91±9.06	52.65±5.09	135.57±29.33	183.20±3.53	178.42±0.93
Fitoeno+Fitoflueno	43.81±5.01	38.62±0.16	44.79±4.02	81.20±10.71	99.25±1.27	99.99±0.66
$\beta$ -caroteno	138.71±36.0	86.83±29.06	70.41±3.14	254.94±7.60	295.94±7.60	289.58±1.06
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	18.37±6.80	13.13±1.07	-	-	-	-
$\zeta$ -caroteno	15.59±6.07	24.23±1.53	12.68±2.47	28.40±1.75	31.84±0.27	27.90±1.60
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	0.70±0.09	4.25±1.74	1.16±0.47	4.94±0.26	-	-
Vitamina A	31.95±7.65	23.05±4.78	26.43±0.28	66.84±10.41	76.19±0.26	75.44±0.62

- no detectado

## Parte Experimental

Cuadro n° 76. Variaciones de los distintos carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo tratado por PEAI a 25 kV/cm, 330  $\mu\text{s}$ , durante el almacenamiento a 2°C.

Carotenoides	Tiempo almacenamiento (días)					
	Sin tratar	0	18	35	53	70
9- <i>cis</i> -violaxantina +Neoxantina	359.47±59.39	457.01±58.68	478.10±4.38	407.18±8.12	317.48±2.02	175.57±1.98
Anteraxantina	139.49±19.62	164.64±38.59	159.87±0.18	156.43±0.91	135.86±0.23	79.14±0.71
Mutatoxantina	29.86±5.33	32.45±6.93	35.62±0.87	41.41±1.23	32.91±0.19	22.10±0.47
Luteína	56.27±11.95	61.02±16.50	65.87±1.22	74.71±5.08	65.97±4.29	32.32±0.80
Zeaxantina	15.71±3.28	16.23±5.13	50.62±0.87	52.57±0.41	42.99±1.41	41.46±0.34
$\alpha$ -criptoxantina	9.83±0.56	12.17±4.80	60.39±0.55	54.03±2.03	42.87±0.14	41.62±0.75
$\beta$ -criptoxantina	24.24±2.27	25.92±1.54	143.13±1.24	141.87±1.01	118.67±1.16	121.23±1.33
9- <i>cis</i> - $\alpha$ -caroteno	6.13±0.72	10.28±2.65	44.02±1.39	15.83±0.68	11.24±0.36	7.35±0.80
$\alpha$ -caroteno	65.96±14.79	52.91±9.06	228.85±1.63	177.82±22.63	175.62±3.31	164.90±3.01
Fitoeno+Fitoflueno	43.81±5.01	38.62±0.16	145.40±0.56	118.83±8.89	110.16±0.02	106.22±1.10
$\beta$ -caroteno	138.71±36.0	86.83±29.06	377.08±2.94	324.95±11.86	296.27±3.03	307.03±5.70
13- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	18.37±6.80	13.13±1.07	39.86±0.20	28.17±4.13	26.57±0.23	23.01±0.23
$\zeta$ -caroteno	15.59±6.07	24.23±1.53	69.97±0.05	55.69±7.79	46.37±0.82	40.90±1.23
9- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	0.70±0.09	4.25±1.74	19.27±1.04	10.45±0.16	8.73±0.11	6.41±0.72
Vitamina A	31.95±7.65	23.05±4.78	99.92±0.12	86.21±1.12	77.63±0.18	78.42±0.49

Se realiza un análisis de regresión múltiple para estudiar la influencia del tratamiento aplicado, la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de vitamina A en el zumo de naranja-zanahoria. En el cuadro nº 77 se muestran los resultados obtenidos en el zumo de naranja-zanahoria.

Cuadro nº 77. Influencia del tratamiento aplicado, la temperatura y el tiempo de almacenamiento sobre la concentración de vitamina A: Análisis de regresión múltiple.

Variable dependiente: vitamina A.

Parámetros	Estimado	Error estándar	Estadístico T	p
<i>Constante</i>	118.671	18.250	6.502	0.000
<i>Tratamiento</i>	-1.386	7.900	-0.175	0.861
<i>Tiempo almacenamiento</i>	-0.793	0.339	-2.335	0.024
<i>Tª almacenamiento</i>	0.991	1.770	0559	0.578

#### ANÁLISIS DE LA VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p
<i>Modelo</i>	17377.8	3	5792	1.94	0.134
<i>Residual</i>	14896.0	50	2978.71		
<i>Total (corregido)</i>	166313.0	53			

Los resultados obtenidos indican que sólo el tiempo de almacenamiento influye significativamente ( $p < 0.05$ ) sobre el contenido de vitamina A, por lo que la ecuación que explicaría el modelo sería:

$$\text{Vitamina A} = 120.392 - 0.774527 * \text{Talmacen},$$

Siendo Talmacen= tiempo de almacenamiento (días).

Esta ecuación sólo explicaría la variabilidad de la vitamina A en un 9.9% (error estándar= 53.7).

Mediante un análisis multifactorial de la varianza se estudia si las variaciones de vitamina A son significativas durante el almacenamiento, a 10 y 2°C, y si dependen del tratamiento. Los resultados obtenidos son distintos según la temperatura de almacenamiento, a 10°C la concentración de vitamina A en los zumos mezcla de naranja-zanahoria tratados por PEAI a 25 kV/cm durante 280  $\mu$ s es mayor, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). En los zumos almacenados a 2°C la concentración de vitamina A es mayor en las muestras tratadas por PEAI durante 280  $\mu$ s, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con el zumo tratado por PEAI durante 330  $\mu$ s. Estas diferencias aunque son significativas no son válidas para extraer conclusiones puesto que la muestra inicial es distinta y tal como se ha indicado anteriormente la concentración de vitamina A difiere significativamente. En los cuadros nº 78-79 y figuras nº 73-76 se muestran los resultados obtenidos.

Cuadro nº 78. Análisis de la varianza multifactorial para la vitamina A: temperatura almacenamiento=10°C.

<b>Origen de las variaciones</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Promedio de los cuadrados</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<i>Efectos</i>					
<i>A: tiempo almacenamiento</i>	7065.87	4	1766.47	0.92	0.471
<i>B: tratamiento</i>	68885.1	2	34442.6	17.95	0.000
<i>Residual</i>	4034.7	21	1919.27		
<i>Total (corregido)</i>	125587.0	27			

Figura n° 73. Vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) durante el almacenamiento a  $10^\circ\text{C}$ .

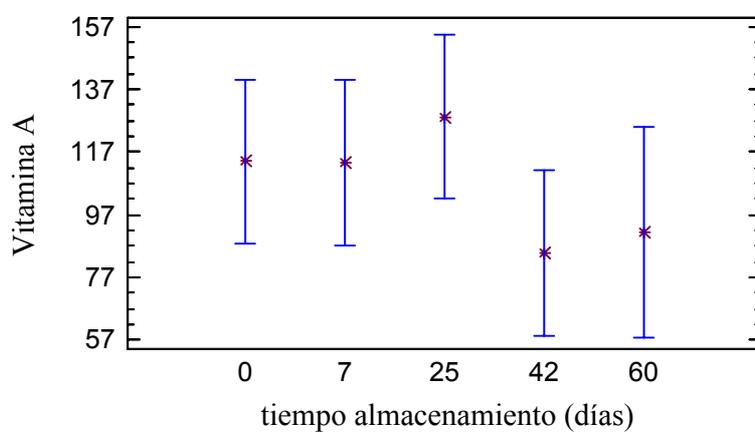
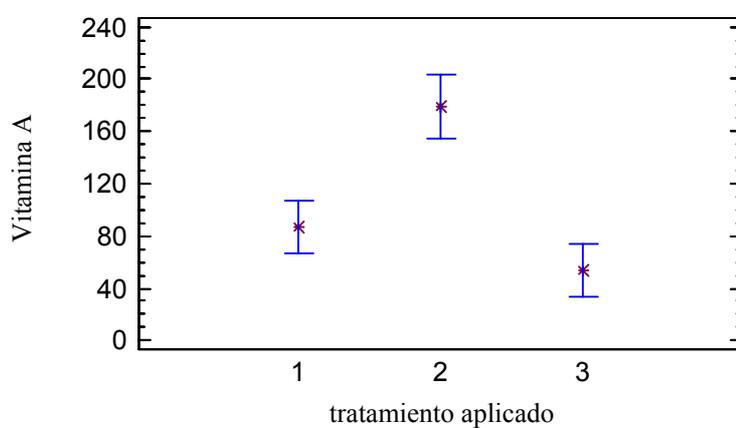


Figura n° 74. Vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) dependiendo del tratamiento aplicado, almacenada a  $10^\circ\text{C}$ .



1: *pasteurización*; 2: *PEAI, 25 kV/cm, 280  $\mu\text{s}$* ; 3: *PEAI, 25 kV/cm, 330  $\mu\text{s}$* .

Cuadro n° 79. Análisis de la varianza multifactorial para la vitamina A: temperatura de almacenamiento=2°C.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	p
<i>Efectos</i>					
<i>A: tiempo almacenamiento</i>	26079.8	4	65.19.94	5.46	0.0036
<i>B: tratamiento</i>	13954.3	2	6977.14	5.85	0.009
<i>Residual</i>	25058.2	21	1193.25		
<i>Total (corregido)</i>	66084.8	27			

Figura n° 75. Vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) durante el almacenamiento a 2 °C.

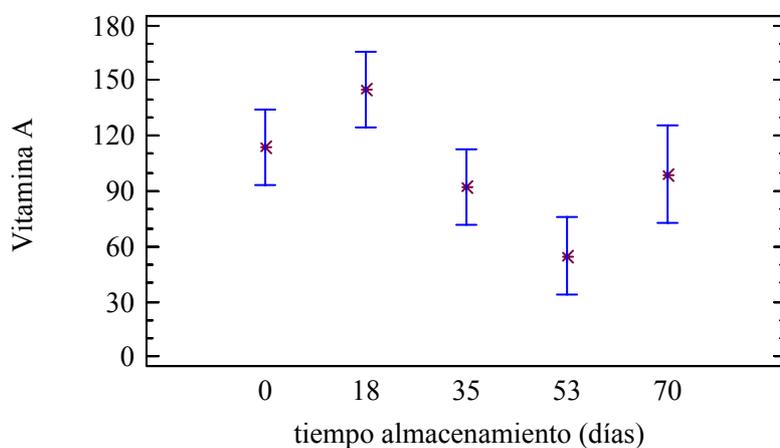
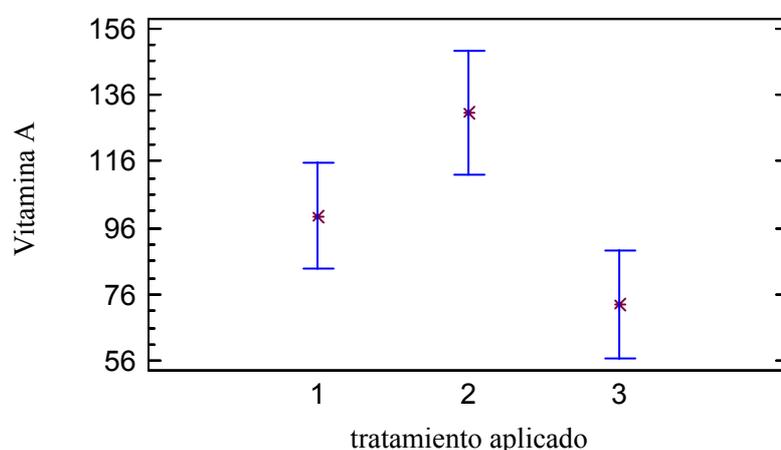


Figura n° 76. Vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) dependiendo del tratamiento aplicado, almacenada a  $2^\circ\text{C}$ .



1: *pasteurización*; 2: *PEAI, 25 kV/cm, 280  $\mu\text{s}$* ; 3: *PEAI, 25 kV/cm, 330  $\mu\text{s}$* .

Mediante un análisis discriminante se estudia qué carotenoides definen significativamente las tres variables: tratamiento, temperatura y tiempo de almacenamiento.

***Tratamiento: pasteurización, PEAI (25 kV/cm, 280  $\mu\text{s}$ /330  $\mu\text{s}$ ).***

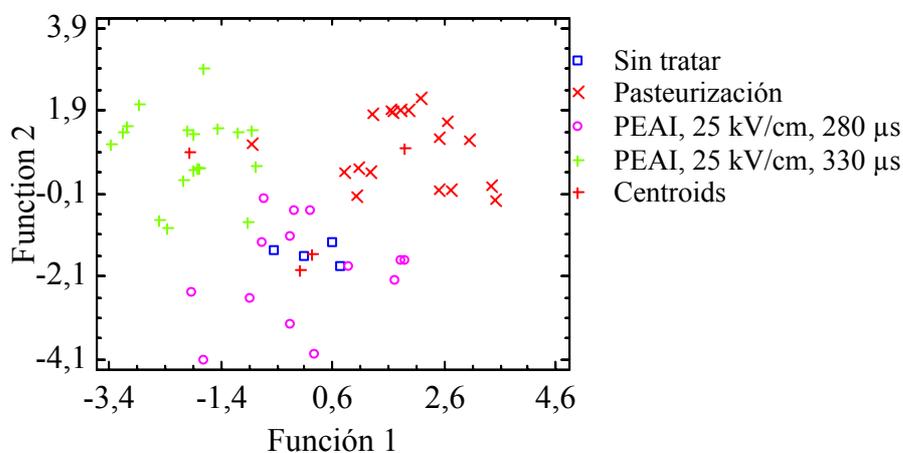
Este proceso está diseñado para desarrollar unas funciones discriminantes las cuales permiten predecir el tipo de tratamiento basándose en el valor de unas variables cuantitativas, en este caso los diferentes carotenoides identificados y cuantificados. Los coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar el tratamiento aplicado se muestran en el cuadro n° 80.

Cuadro n° 80. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar el tratamiento aplicado.

	Funciones discriminantes		
	1	2	3
<b>9-cis-violaxantina</b>	-0.2856	-0.2140	0.8861
<b>+Neoxantina</b>			
<b>Mutatoxantina</b>	0.6961	0.7287	-0.3530
<b><math>\alpha</math>-criptoxantina</b>	-1.0596	0.3359	-0.0712
<b><math>\beta</math>-caroteno</b>	1.5693	-1.1748	0.1112
<b>13-cis- <math>\beta</math>-caroteno</b>	1.7552	0.4288	0.1723
<b><math>\zeta</math>-caroteno</b>	-1.5783	0.5895	-1.0124

Se utilizan 54 casos para desarrollar un modelo discriminante de 3 niveles de tratamiento, obteniendo que 6 variables son significativamente predictoras del tipo de tratamiento. En la figura n° 77 se puede observar cómo estas funciones permiten diferenciar el tipo de tratamiento aplicado a la muestra.

Figura n° 77. Tratamiento de conservación. Funciones discriminantes: representación gráfica.



En el cuadro n° 81 se muestra la tabla de clasificación de los tratamientos, y el porcentaje de aciertos en la predicción. El porcentaje de los casos correctamente clasificados es del 92.6%.

Cuadro n° 81. Clasificación de los tratamientos y porcentaje de aciertos en la predicción.

Tratamiento	Tamaño grupo	PREDICCIÓN TRATAMIENTO			
		Sin tratar	Pasteurización	PEAI, 280 $\mu$ s	PEAI, 330 $\mu$ s
<b>Sin tratar</b>	4	4 <i>100.00%</i>	0 <i>0.00%</i>	0 <i>0.00%</i>	0 <i>0.00%</i>
<b>Pasteurización</b>	18	0 <i>0.00%</i>	17 <i>94.44%</i>	0 <i>0.00%</i>	1 <i>5.56%</i>
<b>PEAI, 25 kV/cm, 280 <math>\mu</math>s</b>	14	2 <i>14.29%</i>	0 <i>0.00%</i>	12 <i>85.71</i>	0 <i>0.00%</i>
<b>PEAI, 25 kV/cm, 330 <math>\mu</math>s</b>	18	1 <i>5.56%</i>	0 <i>0.00%</i>	0 <i>0.00%</i>	17 <i>94.44%</i>

***Temperatura de almacenamiento: 2 y 10 °C.***

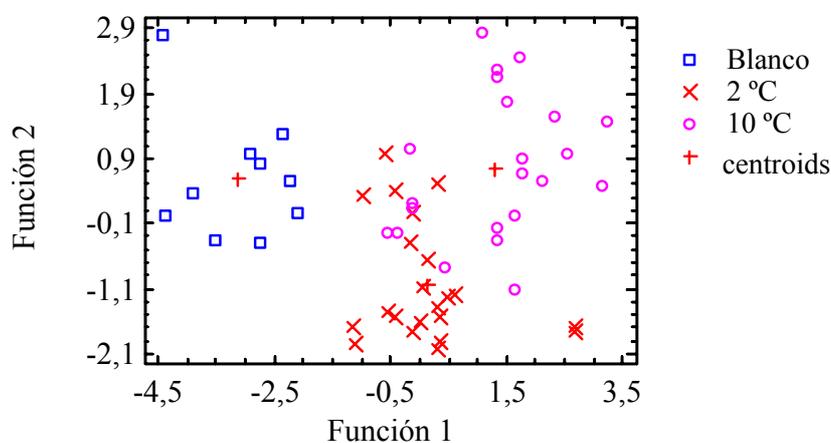
Los coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar la temperatura de almacenamiento de los zumos mezcla de naranja-zanahoria se muestran en el cuadro n° 82.

Para desarrollar un modelo discriminante de la temperatura de almacenamiento (2 y 10 °C) se utilizan 54 casos, determinando que 5 variables (carotenoides) permiten hacer predicciones significativas sobre la temperatura de almacenamiento (véase figura n° 78).

Cuadro n° 82. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar la temperatura de almacenamiento (2 y 10 °C).

	Funciones discriminantes	
	1	2
<b>9-<i>cis</i>-violaxantina +Neoxantina</b>	-1.6291	0.6294
<b>Anteraxantina</b>	0.7164	-1.6417
<b>Luteína</b>	0.7708	0.2895
<b>Zeaxantina</b>	-0.5149	1.3251
<b>β-criptoxantina</b>	0.8648	-1.3119

Figura n° 78. Temperatura de almacenamiento. Funciones discriminantes: representación gráfica.



En el cuadro n° 83 se muestra la tabla de clasificación de las temperaturas de almacenamiento, y el porcentaje de aciertos en la predicción. El porcentaje de los casos correctamente clasificados es del 85.2%.

Cuadro n° 83. Clasificación de las temperaturas de almacenamiento y porcentaje de aciertos en la predicción.

<b>PREDICCIÓN Tª ALMACENAMIENTO</b>				
<b>Almacenamiento</b>	<b>Tamaño grupo</b>	<b>Blanco</b>	<b>2 °C</b>	<b>10 °C</b>
<b>Blanco</b>	10	10 <i>100.00%</i>	0 <i>0.00%</i>	0 <i>0.00%</i>
<b>2 °C</b>	22	0 <i>0.00%</i>	20 <i>90.91%</i>	2 <i>9.09%</i>
<b>10 °C</b>	22	0 <i>0.00%</i>	6 <i>27.27%</i>	16 <i>72.73%</i>

***Tiempo almacenamiento.***

Los coeficientes estandarizados de las funciones (estadísticamente significativos) que permiten discriminar/diferenciar el tiempo de almacenamiento de los zumos mezcla de naranja-zanahoria se muestran en los cuadros n° 84 y 85. Se consideran las dos temperaturas de almacenamiento (2 y 10 °C), véanse las figuras 79 y 80.

Cuadro n° 84. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar el tiempo (días) de almacenamiento (2 °C).

	<b>Funciones discriminantes</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>9-<i>cis</i>-violaxantina +Neoxantina</b>	1.6852	-0.0439	0.1303	-0.7298
<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	-1.9369	-0.7937	0.0170	-0.2955
<b>cis-<math>\alpha</math>-caroteno</b>	1.4602	-0.6170	-0.4005	0.1509
<b>13-<math>\beta</math>-caroteno</b>	0.9549	0.3336	0.9461	0.5439

Cuadro n° 85. Coeficientes de las funciones (estadísticamente significativos) que se utilizan para discriminar el tiempo (días) de almacenamiento (10 °C).

	<b>Funciones discriminantes</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>9-<i>cis</i>-violaxantina +Neoxantina</b>	2.0101	0.1905	0.2405	0.4254
<b><math>\beta</math>-criptoxantina</b>	-1.3898	-0.5196	0.7506	0.2110
<b>cis-<math>\alpha</math>-caroteno</b>	0.9135	-1.5149	-0.1950	-0.3781
<b><math>\zeta</math>-caroteno</b>	1.2356	1.7564	0.5316	-0.3269

Figura nº 79. Tiempo de almacenamiento a 2°C. Funciones discriminantes: representación gráfica.

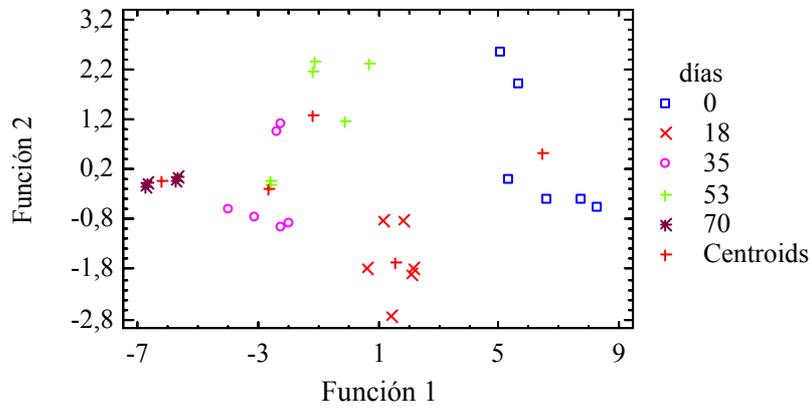
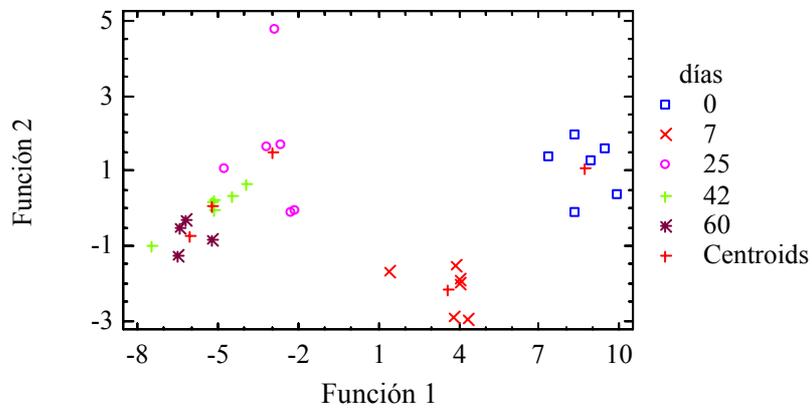


Figura nº 80. Tiempo de almacenamiento a 10°C. Funciones discriminantes: representación gráfica.



En los cuadros nº 86 y 87 se muestra la tabla de clasificación de los tiempos de almacenamiento a 2 y 10°C, y el porcentaje de aciertos en la predicción. El porcentaje de los casos correctamente clasificados es del 92.86 y 89.29%, para el almacenamiento a 2 y 10°C, respectivamente.

Cuadro n° 86. Clasificación de los tiempos de almacenamiento a 2°C y porcentaje de aciertos en la predicción.

Tiempo almacenamiento	PREDICCIÓN TIEMPO ALMACENAMIENTO					
	Tamaño grupo	0	18	35	53	70
0	6	6	0	0	0	0
		<i>100.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>
18	6	0	6	0	0	0
		<i>0.00%</i>	<i>100.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>
35	6	0	0	6	0	0
		<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>100.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>
53	6	0	0	2	4	0
		<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>33.33%</i>	<i>66.67%</i>	<i>0.00%</i>
70	4	0	0	0	0	4
		<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>100.00%</i>

Cuadro n° 87. Clasificación de los tiempos de almacenamiento a 10°C y porcentaje de aciertos en la predicción.

Tiempo almacenamiento	PREDICCIÓN TIEMPO ALMACENAMIENTO					
	Tamaño grupo	0	7	25	42	60
0	6	6	0	0	0	0
		<i>100.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>
7	6	0	6	0	0	0
		<i>0.00%</i>	<i>100.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>
25	6	0	0	5	1	0
		<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>83.33%</i>	<i>16.67%</i>	<i>0.00%</i>
42	6	0	0	0	5	1
		<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>83.33%</i>	<i>16.67%</i>
60	4	0	0	0	1	3
		<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>0.00%</i>	<i>25.00%</i>	<i>75.00%</i>

#### 4.5.9.3.- Almacenamiento del Zumo Fresco de Naranja-Zanahoria a -40°C

##### Vitamina C

La concentración inicial de ácido ascórbico en el zumo mezcla de naranja-zanahoria fue de  $27.09 \pm 0.18$  mg/100mL. Los contenidos de vitamina C obtenidos a lo largo del almacenamiento se compararon mediante el análisis de la varianza univariable (ANOVA). Como se encontraron diferencias estadísticamente significativas se aplicó un test de Tukey, el cual indicó que la concentración de ácido ascórbico después de 132 días de almacenamiento a -40°C ( $25.98 \pm 0.18$  mg/100mL) era significativamente inferior a la concentración inicial. El análisis de regresión que se aplicó a la pérdida de ácido ascórbico respecto al tiempo indicó que la pérdida seguía un modelo lineal para describir la relación entre el ácido ascórbico y el tiempo de almacenamiento (días). La ecuación del modelo ajustada fue:

$$\text{ácido ascórbico (mg/100mL)} = 26.99 - 0.010 \cdot \text{tiempo (días)} \quad (\text{figura n}^\circ 81)$$

La pendiente de la ecuación indica que el porcentaje de degradación del ácido ascórbico durante el almacenamiento a -40°C es,  $0.010 \pm 0.004$  mg/100mL por día. El coeficiente estadístico  $R^2$  indica que el modelo adaptado explica la variabilidad del 56.4% en el ascórbico. El coeficiente de correlación es -0.751, indicando una relación fuerte entre las variables. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar de los residuales es 0.372. Navarro et al. (1981), estudiaron el almacenamiento del zumo concentrado (60 °Brix) a 0, -8 y -18 °C para establecer las condiciones apropiadas para la conservación del zumo de naranja, y encontraron que no había variaciones en la concentración de ácido ascórbico durante los 6 meses de almacenamiento. Lee y Coates (1999) estudiaron la variación de la vitamina C en un zumo de naranja sin pasteurizar, recién exprimido y congelado, durante el almacenamiento a -23°C y encontraron que después de 24 meses había un 19.2% de pérdidas de vitamina C, el porcentaje de pérdida de vitamina C fue de 0.011 mg/100mL por día, siendo superior al encontrado en este estudio para el zumo de naranja-zanahoria almacenado a -40°C. Korus et al. (2002)

encontraron que la vitamina C en la almorta disminuía (7–8%) después de 6 meses de almacenamiento en congelación (a -30 y -40°C). Giannakourou y Taoukis (2003) establecieron que para las hortalizas congeladas (alubias verdes, espinacas, frijoles verdes y quimbombo), la dependencia entre la temperatura y la pérdida de vitamina C en el rango de -3 a -20°C se ajustaba adecuadamente a la ecuación de Arrhenius. Martins y Silva (2004) estudiaron la congelación de frijoles verdes, realizando una evaluación del perfil de calidad durante el almacenamiento casero a -6, -12 y -18 °C, y encontraron que las pérdidas de ácido ascórbico eran significativas después de 4 días de almacenamiento a -6°C (51.47%), y cuando la temperatura de almacenamiento era de -12°C el ácido ascórbico disminuía muy rápidamente durante los primeros 5 días (45.03%) y después de 14 días el ácido ascórbico residual era de 10.72%. Cuando los frijoles verdes se almacenaban a -18°C, la concentración de ácido ascórbico residual después de 15 días era del 10%. Bahçeci et al. (2005) encontraron que el ácido ascórbico en los frijoles verdes disminuía siguiendo una cinética de primer orden durante el almacenamiento a -18°C. Sahari et al. (2004) encontraron que las mayores pérdidas de ácido ascórbico ocurrían durante los primeros 15 días de almacenamiento, siendo los porcentajes 64.5, 10.7 y 8.9% a -12, -18 y -24°C, respectivamente, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre -18 y -24°C.

### Vitamina A

Al estudiar la variación de la vitamina A ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) en el zumo de naranja-zanahoria durante el almacenamiento a -40°C se ve que su concentración aumenta significativamente con el tiempo ( $p < 0.05$ ), de 44.75 a 468.33 ( $\mu\text{gRE}/100\text{g}$ ) (figura nº 82). Ajustando por mínimos cuadrados se encuentra que la nube de puntos proporciona un ajuste significativo ( $p < 0.01$ ) con un modelo lineal:

$$\text{vitamina A } (\mu\text{gRE}/100\text{g}) = 3.89 \cdot \text{tiempo (días)} + 9.54$$

El valor  $R^2$  indica que el modelo ajustado explica el 75.0% de la variabilidad del contenido en vitamina A. El coeficiente de correlación es de 0.866, lo cual indica una

fuerte relación entre las variables. El error estándar estimado muestra que la desviación estándar residual es de 93.66.

Hay una correlación negativa significativa entre la evolución de las concentraciones de ácido ascórbico y vitamina A durante el almacenamiento a -40°C, siendo el coeficiente de correlación de -0.833 y el error estándar estimado de 0.312:

$$\text{ácido ascórbico} = 26.99 - 0.003 \cdot \text{vitamina A}$$

(ácido ascórbico en mg/100mL, y vitamina A en µgRE/100g).

Se procede a estudiar la evolución de cada carotenoide en el zumo congelado de naranja-zanahoria (-40°C). En las figuras nº 83–86 se muestra una representación gráfica de los resultados obtenidos. Ajustando por mínimos cuadrados, se obtiene un ajuste lineal significativo ( $p < 0.05$ ) en ocho de los carotenoides estudiados, con las siguientes pendientes:

9- <i>cis</i> -violaxantina + Neoxantina	$-2.429 \pm 0.810$ ( $R^2 = 0.775$ ) µg/100g por día
Anteraxantina	$-1.037 \pm 0.312$ ( $R^2 = 0.799$ ) µg/100g por día
α-caroteno	$7.148 \pm 1.796$ ( $R^2 = 0.852$ ) µg/100g por día
Fitoeno + Fitoflueno	$2.339 \pm 0.483$ ( $R^2 = 0.892$ ) µg/100g por día
β-caroteno	$19.084 \pm 4.518$ ( $R^2 = 0.865$ ) µg/100g por día
13- <i>cis</i> -β-caroteno	$1.138 \pm 0.296$ ( $R^2 = 0.843$ ) µg/100g por día
ξ-caroteno	$1.560 \pm 0.285$ ( $R^2 = 0.913$ ) µg/100g por día
9- <i>cis</i> -β-caroteno	$0.524 \pm 0.190$ ( $R^2 = 0.748$ ) µg/100g por día

Solamente 9-*cis*-violaxantina + neoxantina y anteraxantina disminuían con el tiempo de almacenamiento. La figura nº 83 muestra el porcentaje remanente de las concentraciones de cada uno de estos dos carotenoides. Después de 36 días la disminución en la concentración de anteraxantina fue de 43.1%, mientras que no hubo variación en la concentración de 9-*cis*-violaxantina + neoxantina, pero éstas disminuyeron bruscamente (41.5%) después de 48 días de almacenamiento a -40°C. Al final del periodo estudiado (132 días), las pérdidas fueron del 50.5 y 64.8% para 9-*cis*-violaxantina + neoxantina y anteraxantina, respectivamente. Los otros carotenoides (luteína, zeaxantina, mutatoxantina,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -criptoxantina, *cis*- $\beta$ -criptoxantina y 9-*cis*- $\alpha$ -caroteno) también se modificaron durante el almacenamiento a -40°C, aunque la aplicación del análisis de regresión simple no mostró ninguna relación significativa entre las variables.

El valor de p, que prueba la significancia estadística de la correlación, es de 0.000 e indica que no hay correlaciones estadísticamente significativas al 95% de nivel de confianza. Se puede ver que cuando las concentraciones de  $\alpha$ -caroteno, fitoeno + fitoflueno,  $\beta$ -caroteno y  $\xi$ -caroteno aumentan, hay una disminución significativa en las concentraciones de 9-*cis*-violaxantina + neoxantina y anteraxantina (cuadro nº 88).

Figura nº 81. Variación del ácido ascórbico en zumos de naranja-zanahoria durante el almacenamiento a -40°C.

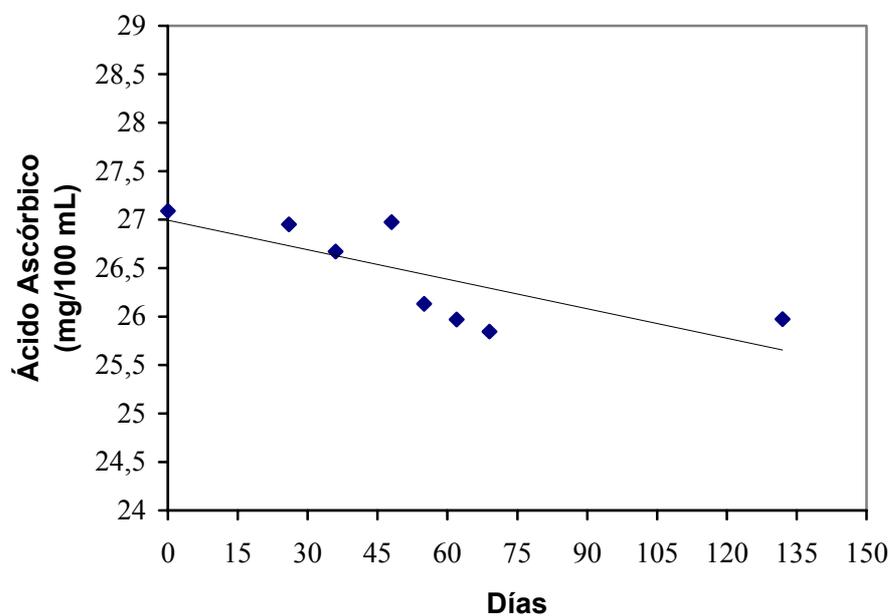


Figura nº 82. Evolución del contenido en vitamina A en zumo de naranja-zanahoria durante el almacenamiento a -40°C.

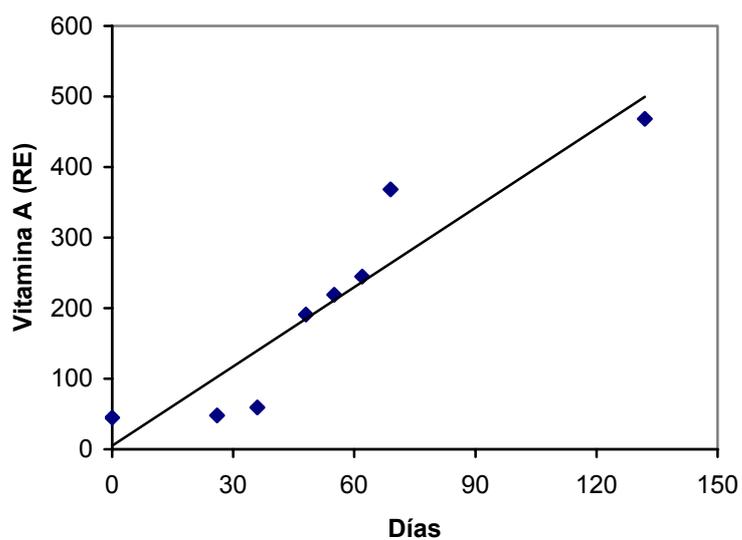


Figura nº 83. Evolución de la 9-cis-violaxantina+neoxantina y de la anteraxantina en el zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C).

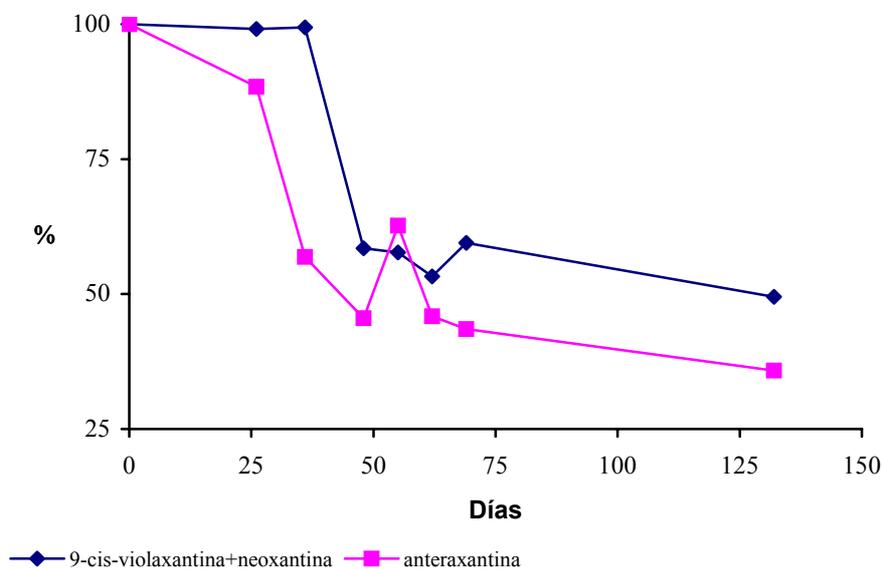


Figura nº 84. Evolución de la luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, cis- $\beta$ -criptoxantina, mutatoxantina y  $\alpha$ -criptoxantina en zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C).

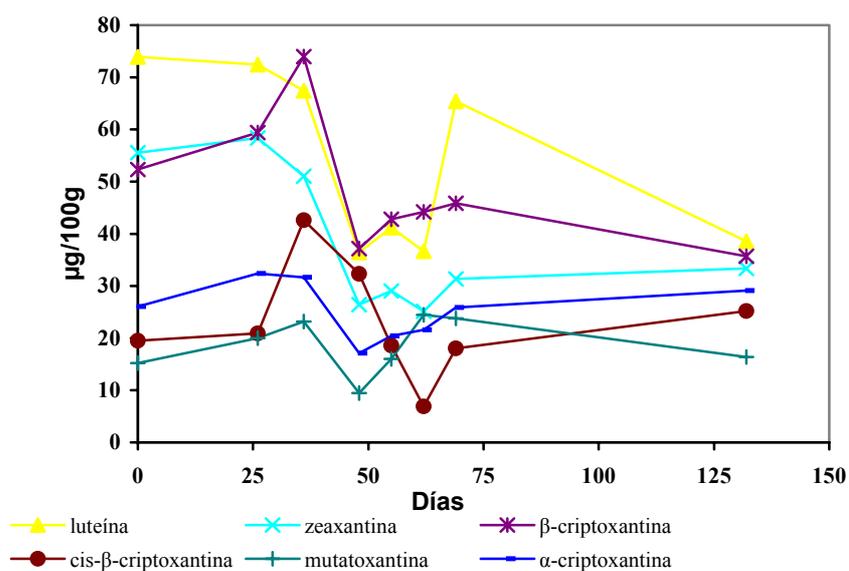


Figura nº 85. Evolución del 9-cis- $\alpha$ -caroteno, 13-cis- $\beta$ -caroteno,  $\zeta$ -caroteno y 9-cis- $\beta$ -caroteno en zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C).

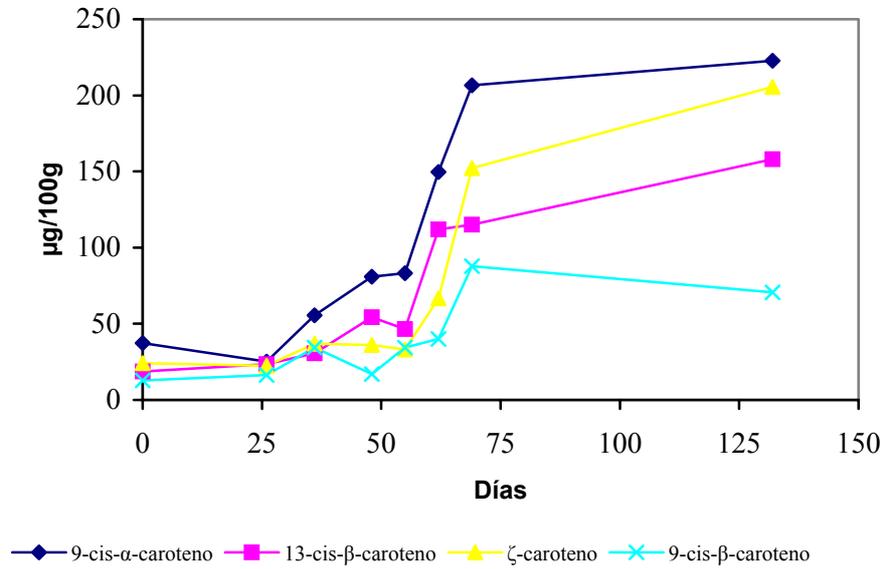
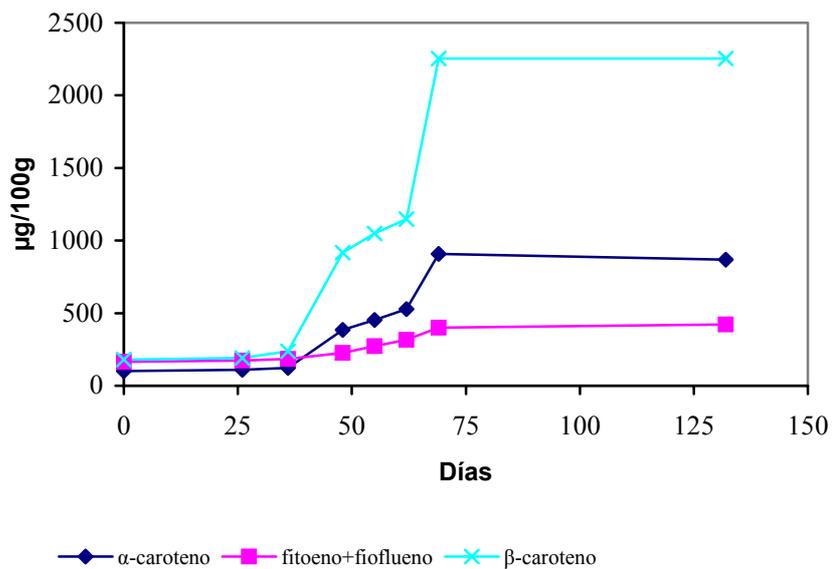


Figura nº 86. Evolución del  $\alpha$ -caroteno, fitoeno+fitoflueno y  $\beta$ -caroteno en el zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C).



Cuadro n° 88. Coeficiente de correlación entre carotenoides en zumo de naranja-zanahoria congelado (-40°C).

	anteraxantina	luteína	zeaxantina	mutatoxantina	$\alpha$ -criptoxantina	$\beta$ -criptoxantina	Cis- $\beta$ -criptoxantina	9-cis- $\alpha$ -caroteno	$\alpha$ -caroteno	Fitoeno+fitoflueno	$\beta$ -caroteno	13-cis- $\beta$ -caroteno	$\zeta$ -caroteno	9-cis- $\beta$ -caroteno	
9-cis-violaxantina+neoxantina	0.813*	0.864**	0.955**	0.124	0.621	0.853**	0.371	-0.480	-0.839**	-0.815*	-0.821*	-0.560	-0.674	-0.565	
Anteraxantina		0.691	0.810*	-0.060	0.353	0.521	-0.064	-0.470	-0.797*	-0.788*	-0.793*	-0.643	-0.744*	-0.689	
Luteína			0.863**	0.363	0.681	0.751*	0.150	-0.121	-0.494	-0.489	-0.480	-0.296	-0.382	-0.158	
Zeaxantina				0.115	0.765*	0.760*	0.304	-0.592	-0.715	-0.672	-0.686	-0.366	-0.486	-0.447	
Mutatoxantina					0.479	0.487	-0.259	0.477	0.144	0.226	0.109	-0.091	0.085	0.443	
$\alpha$ -criptoxantina						0.673	0.290	-0.407	-0.213	-0.121	-0.181	0.111	0.061	0.131	
$\beta$ -criptoxantina							0.460	-0.230	-0.675	-0.624	-0.671	-0.506	-0.556	-0.303	
Cis- $\beta$ -criptoxantina								-0.433	-0.319	-0.340	-0.271	0.095	-0.104	-0.163	
9-cis- $\alpha$ -caroteno									0.551	0.491	0.503	0.406	0.252	0.559	
$\alpha$ -caroteno											0.986**	0.997**	0.835**	0.926**	0.904**
Fitoeno+fitoflueno												0.983**	0.826*	0.940**	0.914**
$\beta$ -caroteno													0.873**	0.946**	0.906**
13-cis- $\beta$ -caroteno														0.955**	0.810*
$\zeta$ -caroteno															0.887**

\*\* ajuste significativo al 99%; \* ajuste significativo al 95%.

El almacenamiento del zumo de naranja-zanahoria a -40°C provoca una disminución en la concentración del ácido ascórbico (4.1%). La vitamina A aumenta durante el almacenamiento, lo cual contribuye a mantener las características organolépticas del producto. Nueve de los 14 carotenoides identificados aumentan significativamente después de 132 días de almacenamiento a -40°C. Sólo la concentración de anteraxantina y de 9-cis-violaxantina+neoxantina disminuye durante el periodo estudiado.

#### **4.5.10.- CONCLUSIONES**

El tratamiento por PEAI es un método alternativo a la pasteurización térmica convencional del zumo de naranja-zanahoria. Para seleccionar las mejores condiciones del tratamiento por PEAI, no sólo es necesario tener presente la inactivación microbiológica y enzimática si no que también hay que mantener las características organolépticas y el valor nutritivo, siendo el ácido ascórbico y la vitamina A unos buenos parámetros para ello. La vitamina C se ha elegido como parámetro de calidad del tratamiento térmico de conservación de alimentos por muchos autores.

El procesado mediante PEAI produce, generalmente, un aumento significativo en la concentración de los diferentes carotenoides identificados en el zumo naranja-zanahoria al aumentar el tiempo de tratamiento, mientras que al procesar el zumo mediante pasteurización convencional, la mayoría de los carotenoides disminuyen su concentración o la aumentan de un modo no significativo. El contenido de ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI también es mayor que en el pasteurizado convencionalmente, y además se mantiene durante más tiempo en almacenamiento en refrigeración, por lo que el valor nutritivo también es mayor en el zumo de naranja-zanahoria tratado con esta nueva tecnología.

En el zumo mezcla de naranja-zanahoria el tratamiento por PEAI a 25 y 30 kV/cm permite obtener una concentración de vitamina A superior a la encontrada en el zumo pasteurizado. Un tratamiento PEAI a 25 kV/cm durante 280  $\mu$ s permite que la vida media del zumo se extienda hasta 50 días almacenado a 2 °C, mientras que cuando la temperatura de conservación es de 10 °C la vida media del zumo de naranja-zanahoria es de 19 días.

El almacenamiento del zumo de naranja-zanahoria a -40°C causó una disminución en la concentración del ácido ascórbico (4.1%). La actividad provitamínica A ( $\mu$ gRE/100g) aumentó durante el almacenamiento del zumo de naranja-zanahoria congelado. Nueve de los catorce carotenoides identificados aumentaron después de 132 días de almacenamiento a -40°C. Solamente anteraxantina y 9-cis-violaxantina + neoxantina disminuyeron su concentración durante el periodo estudiado.



# **CONCLUSIONES**



## **5.- CONCLUSIONES**

La revisión bibliográfica efectuada y los resultados obtenidos en el estudio realizado en relación a la determinación de vitamina C y carotenoides en zumo de mandarinas (clemenules, clemenvilla y fortuna) y naranja (navel, navelina y navel-lane), la caracterización de los zumos y néctares de naranja comercializados, la evaluación de la influencia sobre la vitamina C y carotenoides del tratamiento térmico y de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad en un zumo mezcla de naranja-zanahoria y finalmente, la estimación de la vida útil del zumo de naranja-zanahoria pasteurizado y tratado por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad, permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Se utiliza un método por cromatografía líquida con gradiente de elución ternario y detector de fotodiodo-array que permite la determinación de quince carotenoides (cis/trans) en zumos vegetales. Como muestran los parámetros analíticos el método es sensible, fiable, exacto y reproducible.
2. La determinación polarográfica del ácido es sensible, precisa y rápida tal como muestran sus parámetros analíticos. El método propuesto permite cuantificar pequeñas variaciones en el contenido de vitamina C en zumos cítricos y vegetales producidos por los tratamientos de conservación y almacenamiento.

### *Naranjas y Mandarinas*

3. Se pueden clasificar los cítricos agrupándolos en naranjas y mandarinas, con el 100% de aciertos en la predicción, determinando los parámetros:
  - a) Vitaminas A y C.
  - b) Seis carotenoides: 9-cis-violaxantina + neoxantina, cis-anteraxantina, mutatoxantina,  $\alpha$  y  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -caroteno.
  - c) Vitamina C y 9-cis-violaxantina + neoxantina.

4. Se pueden clasificar correctamente las 6 variedades de cítricos estudiados (clemenules, clemenvilla, fortuna, navel, navelina y navel-lane):
  - a) Con un 81.7% de aciertos en la predicción con la determinación de los parámetros: pH, °Brix, relación zumo/peso, vitamina A y vitamina C.
  - b) Con un 98.1% de aciertos en la predicción con la determinación de los parámetros vitamina C, 9-cis-violaxantina + neoxantina y  $\alpha$ -criptoxantina.

### *Zumos y Néctares comerciales*

5. En todos los casos los contenidos de vitamina C en las muestras son superiores a los indicados en las etiquetas.
6. La concentración de vitamina A es mayor en los zumos que en los néctares, siendo a su vez mayor en los zumos exprimidos que en los de a base de concentrado. Existen diferencias importantes en cuanto al tipo de carotenoides para cada muestra, la 9-cis-violaxantina+neoxantina sólo se encuentra en zumos refrigerados, los carotenoides neocromo y 7,8,7',8'-tetrahidrolicopeno han sido identificados tanto en zumos como en néctares, a base de concentrado y no refrigerados, sin embargo no se han encontrado en otras muestras.

### *Zumo de naranja-zanahoria*

7. La concentración de ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAI es mayor que en el pasteurizado convencionalmente.
8. El procesado mediante PEAI produce, generalmente, un aumento significativo en la concentración de los diferentes carotenoides identificados en el zumo naranja-zanahoria al aumentar el tiempo de tratamiento, mientras que al procesar el zumo mediante pasteurización convencional, la concentración de la mayoría de los carotenoides disminuye o aumenta de un modo no significativo.

9. En el zumo mezcla de naranja-zanahoria el tratamiento por PEAI a 25 y 30 kV/cm permite obtener una concentración de vitamina A superior a la encontrada en el zumo pasteurizado.

*Vida útil*

10. El tratamiento por PEAI a 25 kV/cm durante 280  $\mu$ s permite que la vida media del zumo sea de 50 días almacenado a 2°C, mientras que cuando la temperatura de conservación es de 10°C la vida media es de 19 días siendo en ambos casos, la vida útil superior a la del zumo pasteurizado.

*Almacenamiento a -40°C*

11. Durante el almacenamiento del zumo fresco de naranja-zanahoria a -40°C la concentración de vitamina C disminuye, sin embargo la vitamina A aumenta. Nueve de los catorce carotenoides identificados aumentan después de 132 días de almacenamiento a -40°C.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## **6.- BIBLIOGRAFÍA**

- A.O.A.C., 1990, “*Official Methods of Analysis*”. 15<sup>th</sup> Ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, VA, USA.
- Abraham J., 1991, “*Les vitamines: sensibilité des vitamines aux agressions physico-chimiques*”. **Extrait des Cahiers de Nutrition et de diététique**, 1.
- Abram F., Smelt J. P. P. M., Bos R., Wouters P. C., 2003, “*Modelling and optimization of inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric field treatment*”. **Journal of Applied Microbiology**, 94, 571-579.
- Albanes D., Malila N., Taylor P. R., Huttunen J. K., Virtamo J., Edwards B. K., Rautalahti M., Hartman A. M., Barret M. J., Pietinen P., Hartman T. J., Sipponen P., Lewin K., Teerenhovi L., Hietanen P., Tangrea J. A., Virtanen M., Heinonen O. P., 2000, “*Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on colorectal cancer: results from a controlled trial (Finland)*”. **Cancer Causes Control**, 11, 197-205.
- Alwazeer D., Cachon R., Divies C., 2002, “*Behavior of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in fresh and thermally processed orange juice*”. **Journal of Food Protection**, 65, 1586-1589.
- Alwazeer D., Delbeau C., Divies C., Cachon R., 2003, “*Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice*”. **International Journal of Food Microbiology**, 89, 21-29.
- Ames B. N., Shigenaga M. K., Hagen T. M., 1993, “*Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*”. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 90, 7915-7922.
- Ancos (de) B., Cano M. P., Sánchez-Moreno C., 2005, “*Revista de Nutrición Práctica: Aspectos saludables de los zumos de frutas y jugos de hortalizas*”. **Dietecom**, abril.
- Ancos (de) B., Sgroppo S., Plaza L., Cano M. P., 2002, “*Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment*”. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 82, 790-796.
- Anderson L., Dibble M. V., Turkki P. R., Mitchell H. S., Rynbergen H. J., 1987, “*Nutrition in Health and Disease*”. 17th Ed., Ed. Interamericana, México D. F.
- Anguelova T. & Warthesen J., 2000, “*Degradation of lycopene, alfa-carotene, and beta-carotene during lipid peroxidation*”. **Journal of Food Science**, 65 (1), 71-75.
- Aparicio P., Farré R., Frígola A., 1992, “*Determinación del ácido ascórbico en vegetales por polarografía diferencial de impulsos*”. **Anales de Bromatología**, XLIV, 257-261.
- Aranceta J., Serra I., Ortega R., Entrala A., Gil A., 2000, “*Las vitaminas en la alimentación de los españoles. Estudio eVe*”. Editorial Médica Panamericana 2002, Madrid, 1–285.
- Ariahu C. C., Adekunle D. E., Nkpa N. N., 1997, “*Kinetics of heat/enzymic degradation of ascorbic acid in fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis*) leaves*”. **Journal of Food Processing and Preservation**, 21, 21-32.

- ATBC, 1994, "The  $\alpha$ -tocopherol,  $\beta$ -carotene cancer prevention study group. The effect of vitamin E and  $\beta$ -carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers". **New England Journal of Medicine**, 330, 1029-1035.
- Aviram M., Dornfeld L., Rosenblat M., 2000, "Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice". **American Journal of Clinical Nutrition**, 71, 1062-1076.
- Ayhan Z., Streaker C. B., Zhang Q. H., 2000, "Design construction and validation of a sanitary glove box packaging system for product shelf-life studies". **Journal of Food Processing and Preservation**, 25, 183-196.
- Ayhan Z., Yeom H. Y., Zhang Q. H., Min D. B., 2001, "Flavour, colour, and vitamin C retention of PEF processed orange juice in different packaging materials". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49 (2), 669-674.
- Ayranci G. & Tütüncüler A., 1993, "Preparation and storage stability of juices from different carrot species". **Die Nahrung**, 37 (5), 433-439.
- Bahçeci K. S., Serpen A., Gökmen V., Acar J., 2005, "Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage". **Journal of Food Engineering**, 66 (2), 187-192.
- Barbosa-Cánovas G. V., Góngora-Nieto M. M., Pothakamury U. R., Swanson B. G., 1999, "Preservation of foods with pulsed electric fields". **Academic Press Ltd.** London.
- Barbosa-Cánovas G. V., Góngora-Nieto M. M., Swanson B. G., 2001, "Pulsed power in food preservation". **International Food Information System**.
- Barsotti L. & Cheftel J. C., 1999, "Food processing by pulsed electric fields. II. Biological aspects". **Food Reviews International**, 15 (2), 181-213.
- Barua A. B., Kostic D., Olson J. A., 1993, "New simplified procedures for the extraction and simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of retinol, tocopherols and carotenoids in human serum". **Journal of Chromatography**, 617, 257-264.
- Bazzano L. A., He J., Orden L. G., Loria C. M., Vupputuri S., Myers L., Whelton P. K., 2002, "Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in U. S. Adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study". **American Journal of Clinical Nutrition**, 76, 93-99.
- Bello J., 2000, "Ciencia Bromatológica. Principios Generales de los alimentos". Editorial Díaz de Santos, S. A.
- Ben-Amotz A. & Fishler R., 1998, "Analysis of carotenoids with emphasis on 9-cis-beta-carotene in vegetables and fruits commonly consumed in Israel". **Food Chemistry**, 62 (4), 515-520.
- Bendicho S., Arántegui J., Martín O., 2001, "Procesado de alimentos mediante pulsos eléctricos de alta intensidad de campo. II. Efectos sobre microorganismos y componentes de los alimentos". **Alimentaria**, 323, 37-44.
- Bendicho S., Espachs A., Stevens D., Arántegui J., Martín O., 1999, "Effect of high intensity pulsed electric fields on vitamins of milk". **European Conference of Emerging Food Science and Technology**, Tampere, Finland.

- Benloch R., Farré R., Frígola A. M., 1993, "A quantitative estimate of ascorbic and isoascorbic acid by high performance liquid chromatography. Application to citric juices". **Journal of Liquid Chromatography**, 16 (14), 3113-3122.
- Bezman Y., Rouseff R. L., Naim M., 2001, "2-methyl-3-furanthiol and methional are possible off-flavours in stored orange juice: aroma-similarity, NIF/SNIF GC-O, and GC analyses". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49 (1), 5425-5432.
- Biacs P. & Wissgott U., 1997, "Investigation of colour changes of some tomato products during frozen storage". **Nahrung**, 41, 306-310.
- Biacs P. A., Daood H. G., Huszka T. T., Biacs P. K., 1993, "Carotenoids and carotenoid esters from new cross-cultivars of paprika". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41 (11), 1864-1867.
- Biesalski H. K., 1997, "Bioavailability of vitamin A". **European Journal of Clinical Nutrition**, 51, S71-S75.
- Blasco R., Esteve M. J., Frígola A., Rodrigo M., 2004, "Ascorbic acid degradation kinetics in mushrooms in a high-temperature short-time process controlled by a thermoresistometer". **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 37, 171-175.
- Block G., Norkus E., Hudes M., Mandel S., Helzlsouer K., 2001, "Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption?". **American Journal of Epidemiology**, 154, 1113-1118.
- Block G., Patterson B., Subar A., 1992, "Fruit, vegetables and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence". **Nutrition and Cancer**, 18 (1), 1-29.
- Blumberg J. & Block G., 1994, "The alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study in Finland". **Nutrition Reviews**, 52 (7), 242-245.
- Braddock R. J., 1999, "Single strength orange juices and concentrate". In **Handbook of Citrus by-products and Processing Technology**; Wiley, J., Ed.; New York, NY, pp 53-83.
- Brandt K., Christensen L. P., Hansen-Moller J., Hansen S. L., Haraldsdottir J., Jespersen L., Purup S., Kharazmi A., Barkholt V., Frokiaer H., Kobaek-Larse M., 2004, "Health promoting compounds in vegetables and fruits: a systematic approach for identifying plant components with impact on human health". **Trends in Food Science and Technology**, 15, 384-393.
- Britton G., 1995, "Carotenoids. Vol. 1B: Spectroscopy". Edited by Britton G., Liaaen-Jensen S., and Pfander, H. Birkhäuser Verlag Basel.
- Bull M. K., Zerdin K., Howe E., Goicoechea D., Paramanandhan P., Stockman R., Sellahewa J., Szabo E. A., Johnson R. L., Stewart C. M., 2004, "The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice". **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 5, 135-149.
- Bureau J. & Bushway R. J., 1986, "HPLC determination of carotenoids in fruit and vegetables in the U. S.". **Journal of Food Science**, 51, 128.
- Burns J., Frase P. D., Bramley P. M., 2003, "Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables". **Phytochemistry**, 62, 939-947.
- Bushway R. J., 1986, "Determination of alpha and beta-carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 34 (3), 409-412.

- Butz P. & Tauscher B., 2000, "Recent studies on pressure-induced chemical changes in food constituents". **High Pressure Research**, 19 (1-6), 401-408.
- Butz P., Edenharder R., Fernández A., Fister H., Merkel C., Tauscher B., 2002, "Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment". **Food Research International**, 35, 295-300.
- Calderón-Miranda M. L., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G., 1999, "Transmission electron microscopy of *Listeria innocua* treated by pulsed electric fields and nisin in skimmed milk". **International Journal of Food Microbiology**, 51 (1), 31-38.
- Cameron R. G. & Grohmann K., 1996, "Purification and characterization of a thermally tolerant pectin methylesterase from a commercial valencia fresh frozen orange juice". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44 (2), 458-462.
- Cameron R. G., Baker R. A., Grohmann K., 1998, "Multiple forms of pectinmethylesterase from citrus peel and their effects on juice cloud stability". **Journal of Food Science**, 63, 253-256.
- Cano M. P. & Ancos (de) B., 1994, "Carotenoid and carotenoid ester composition in mango fruit as influenced by processing method". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 42 (12), 2737-2742.
- Cano M. P., 1991, "HPLC separation of chlorophyll and carotenoid pigments of four kiwi fruit cultivars". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39, 1786-1791.
- Cano M. P., Ancos (de) B., Lobo M. G., Monreal M., 1996<sup>a</sup>, "Carotenoid pigments and colour of hermaphrodite and female papaya fruits (*Carica papaya* L.) cv Sunrise during post-harvest ripening". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 71, 351-358.
- Cano M. P., Ancos (de) B., Lobo M. G., Monreal M., 1996<sup>b</sup>, "Effects of freezing and canning of papaya slices on their carotenoid composition". **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, 202, 279-284.
- Cano M. P., Plaza L., Sánchez-Moreno C., Ancos (de) B., 2003, "Elaboración y conservación de zumos de naranja. Efecto de nuevas tecnologías sobre su calidad sensorial y nutricional". **Alimentación, Nutrición y Salud**, 10 (4), 108-119.
- Carr A. C. & Frei B., 1999, "Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans". **American Journal of Clinical Nutrition**, 69, 1086-1107.
- Casas A. y Mallent D., 1988, "El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, de la variedad y de la temperatura". **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, 28 (2), 184-201.
- Cassano A., Drioli E., Galaverna G., Marchelli R., Di Silvestro G., Cagnasso P., 2003, "Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes". **Journal of Food Engineering**, 57 (2), 153-163.
- Castaldo D., Laratta B., Loiudice R., Giovane A., Quagliuolo L., Servillo L., 1997, "Presence of residual pectin methylesterase activity in thermally stabilized industrial fruit preparations". **Food Science and Technology**, 30 (5), 479-484.
- Chandler L. A. & Schwartz S. J., 1987, "HPLC separation of cis-trans carotene isomers in fresh and processed fruits and vegetables". **Journal of Food Science**, 52 (3), 669-672.
- Chang D. C., 1992, "An efficient method of microinjecting attached cells using electroporation". **Molecular Biology of the Cell** 3, A90-A90 Suppl. S.

- Chen B. H. & Chen Y. Y., 1993, "Stability of chlorophylls and carotenoids in sweet potato leaves during microwave cooking". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41 (8), 1315-1320.
- Chen B. H. & Yang S. H., 1992, "An improved analytical method for the determination of carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds". **Food Chemistry**, 44, 61-66.
- Chen B. H., Peng H. Y., Chen H. E., 1995, "Changes of carotenoids, color, and vitamin A contents during processing of carrot juice". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43 (7), 1912-1918.
- Chen C. S. & Wu M. C., 1998, "Kinetic models for thermal inactivation of multiple pectinesterase in citrus juices". **Journal of Food Science**, 63, 747-750.
- Chen H. E., Peng H. Y., Chen B. H., 1996, "Stability of carotenoids and vitamin A during storage of carrot juice". **Food Chemistry**, 57 (4), 497-503.
- Chen T. M. & Chen B. H., 1994, "Optimization of mobile phases for HPLC of cis-trans carotene isomers". **Chromatographia**, 39 (5/6), 346-354.
- Choi M. H., Kim G. H., Lee H. S., 2002, "Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage". **Food Research International**, 35, 753-759.
- Chytil F., 1999, "Vitamin A: not for vision only". **The British Journal of Nutrition**, 82, 161-162.
- Cortés C., Esteve M. J., Frígola A., Torregrosa F., 2004, "Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 2203-2212.
- Cortés C., Esteve M. J., Frígola A., Torregrosa F., 2005, "Quality characteristics of horchata (a Spanish vegetable beverage) treated with pulsed electric fields during shelf-life". **Food Chemistry**, 91, 319-325.
- Craft N. E., 1992, "Carotenoid reversed-phase high performance liquid chromatography methods: Reference compendium". **Methods in Enzymology**, 185-205. Ed.; Academic Press: New York.
- Craft N. E., Sander L. C., Pierson H. F., 1990, "Separation and relative distribution of all-trans-beta-carotene and its cis isomers in beta-carotene preparations". **Journal of the Micronutrients Analysis**, 8, 209-221.
- Cullum A., 2003, "Increasing fruit and vegetable consumption: the 5 a day programme". **Nutrition Bulletin**, 28, 159-163.
- Davey M. W., van Montagu M., Inzé D., Sanmartin M., Kanellis A., Smirnoff N., Benzoe I. J. J., Strain J. J., Favell D., Fletcher J., 2000, "Review: Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 825-860.
- Davies M. B., Austin J., Partridge D. A., 1991, "Vitamin C: Its Chemistry and Biochemistry". Herts, U. K., **Royal Society of Chemical Distribution Centre**.
- Doering W., Von E., Sotieiou-Leventis C., Roth W. R., 1995, "Thermal interconversions among 15-cis-, 13-cis-, and all-trans-beta-carotene: kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans-beta-carotene". **Journal of the American Chemists Society**, 117, 2747-2757.

- Donma M. M. & Donma O., 2005, "*Phytonutrients and children: The other side of the medallion*". **Food Research International**, 38, 681-692.
- Duthie G. G., 1999, "*Determination of activity of antioxidants in human subjects*". **Proceedings of the Nutrition Society**, 58 (4), 1015-1024.
- Eison-Perchonok M. H. & Downes T. W., 1982, "*Kinetics of ascorbic acid autoxidation as a function of dissolved oxygen concentration and temperature*". **Journal of Food Science**, 47, 765-773.
- Emenhiser C., Simunovic N., Sander L. C., Schwartz S. J., 1996, "*Separation of geometrical carotenoid isomers in biological extracts using polymeric C30 column in reversed-phase liquid chromatography*". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44 (12), 3887-3893.
- Epler K. S., Craft N. E., Ziegler R. G., 1993, "*Liquid chromatographic method for the determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food*". **Journal of Chromatography**, 619, 37-48.
- Esteve M. J., Farré R., Frígola A., 1995<sup>a</sup>, "*Changes in ascorbic acid content of green asparagus during the harvesting period and storage*". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43, 2058-2061.
- Esteve M. J., Farré R., Frígola A., 1995<sup>c</sup>, "*Ascorbic acid stability in ground asparagus samples and in oxalic acid extracts*". **Journal of Food Science**, 60 (6), 1282-1283.
- Esteve M. J., Farré R., Frígola A., 1996, "*Stability of ascorbic acid in orange juices after initial use at home begins*". **Journal of Food Quality**, 19, 243-249.
- Esteve M. J., Farré R., Frígola A., López, J.C., Romara, J.M., Ramírez, M., Gil, A. 1995<sup>b</sup>, "*Comparison of voltammetric and high performance liquid chromatographic methods for ascorbic acid determination in infant formulas*". **Food Chemistry**, 52, 99-102.
- Esteve M. J., Frígola A., Martorell L., Rodrigo C., 1998, "*Kinetics of ascorbic acid degradation in green asparagus during heat processing*". **Journal of Food Protection**, 61, 1518-1521.
- Esteve M. J., Frígola A., Martorell L., Rodrigo C., 1999, "*Kinetics of green asparagus ascorbic acid heated in a high-temperature thermoresistometer*". **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, 208, 144-147.
- Ewaidah E. H., 1992, "*Studies on commercially canned juices produced locally in Saudi-Arabia. 3. Physicochemical, organoleptic and microbiological assessment*". **Food Chemistry**, 44 (2), 103-111.
- Fawzi W. W., Spiegelman D., Villamor E., Mugusi F., Essex M., 2004, "*A randomized trial of multivitamin supplements and HIV disease progression and mortality*". **New England Journal of Medicine**, 351, 23-32.
- Fawzi W., Herrera M. G., Willett W. C., Nestel P., El Amin A., Lipsitz S., Mohamed K. A., 1994, "*Dietary vitamin A intake and the risk of mortality among children*". **American Journal of Clinical Nutrition**, 59, 401-408.
- Fernández G. A., Butz P., Bogнар A., Tauscher B., 2001, "*Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging*". **European Food Research and Technology**, 213 (4-5), 290-296.

- Fernández-Díaz M. D., Barsotti L., Dumay E., Cheftel J. C., 2000, "Effects of pulsed electric fields on ovalbumin solutions and diazayed egg white". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 2332-2339.
- Finot P. A., Aeschbacher H. U., Hurrell, R. F., Liardon R., 1990, "The Maillard Reaction in Food Processing, Human Nutrition and Physiology". Birkhauser Verlag, Basel.
- Food & Nutrition Board, 2000, "Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc". **The National Academies Press**. Washington D. C.
- Forastier F., Pistelli R., Sestini P., Fortes C., Renzoni E., Rusconi F., Dell'Orco V., Ciccone G., Bisanti L., 2000, "Consumption of fresh fruit rich in vitamin C and wheezing symptoms in children. SIDRIA Collaborative Group, Italy (Italian Studies on Respiratory Disorders in Children and the Environment)". **Thorax**, 55, 283-288.
- Friedman M., 1991, "Prevention of adverse effects of food browning". **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, Plenum Press., 289, 171-215.
- Friedman M., Molnar-Perl I., Knighton D. R., 1992, "Browning prevention in fresh and dehydrated potatoes by SH-containing amino acids". **Food Additives and Contaminants**, London, Taylor & Francis, 9 (5), 499-503.
- Fundación Grupo Eroski, 2003, "Los "frescos" saben mejor, pero son mucho más caros". **Revista Consumer**, 66, 26-29.
- Furr H. C., Barua A. B., Olson J. A., 1992, "Modern chromatographic analysis of vitamins. 2nd edition: 1.- Retinoids and carotenoids". **Chromatographic science series**, vol. 60, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc.
- 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.
- Gazzani G., Papetti A., Massoloni G., Daglia M., 1998, "Antioxidative and pro-oxidant activity of water soluble components of some common diet vegetables and the effect of thermal treatment". **Journal of Food Chemistry**, 6, 4118-4122.
- Generalitat Valenciana, 2005, "Producción de cítricos". **Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación**.
- Genovese D. B., Elustondo M. P., Lozano J. E., 1997, "Color and cloud stabilization in cloudy apple juice by steam heating during crushing". **Journal of Food Science**, 62, 1171-1175.
- Gershoff S., 1993, "Vitamin C: New roles, new requirements". **Nutrition Reviews**, 51, 319-326.
- Giannakourou M. C. & Taoukis P. S., 2003, "Kinetics modelling of vitamin C loss in frozen green vegetables under variable storage conditions". **Food Chemistry**, 83, 33-41.
- Giner J., Gimeno V., Espachs A., Elez P., Barbosa-Cánovas G. V., Martin O., 2000, "Inhibition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pectin methylesterase by pulsed electric fields". **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 1, 57-67.
- Giovannucci E., 1999, "Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: a review of the epidemiological literature". **Journal of the National Cancer Institute**, 91, 317-331.
- Giovannucci E., Ascherio A., Rimm E. B., Stampfer M. J., Colditz G. A., Willet W. C., 1995, "Intake of carotenoid and retinal in relation to prostate cancer risk". **Journal of the National Cancer Institute**, 87, 1767-1776.

- Góngora-Nieto M. M., Sepúlveda D. R., Pedrow P., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G., 2002, "Food Processing by Pulsed Electric Fields: Treatment Delivery, Inactivation Level, and Regulatory Aspects". **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 35 (5), 375-388.
- Goyle A. & Ojha P., 1998, "Effect of storage on vitamin C, microbial load and sensory attributes of orange juice". **Journal of Food Science and Technology**, 35 (4), 346-348.
- Grahl T. & Märkl H., 1996, "Killing of microorganisms by pulsed electric fields". **Applied Microbiology and Biotechnology**, 45 (1/2), 148-157.
- Granado F., Olmedilla B., Blanco I., Rojas-Hidalgo E., 1992, "Carotenoid composition in raw and cooked spanish vegetables". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40 (1), 2135-2140.
- Granado F., Olmedilla B., Blanco Y., Gil-Martínez E., Rojas-Hidalgo E., 1997, "Variability in the intercomparison of food carotenoid content data: a user's point of view". **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 37, 621-633.
- Grassmann J., Hippeli S., Elstre E. F., 2002, "Plant's defence mechanism and its benefits for animal and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress". **Plant Physiology and Biochemistry**, 40, 471-478.
- Halliwell B., 1996, "Antioxidants in human health and disease". **Annual Review of Nutrition**, 16, 33-50.
- Halliwell B., Murcia M. A., Chirico S., Aruoma O. I., 1995, "Free radicals and antioxidants in food and "in vivo": What they do and how they work". **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 35, 7-20.
- Hart D. J. & Scott K. J., 1995, "Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK". **Food Chemistry**, 54, 101-111.
- Hendrickx M., Ludikhuyze L., Van den Broeck I., Weemaes C., 1998, "Effects of high pressure on enzymes related to food quality". **Trends in Food Science & Technology**, 9, 197-203.
- Hennekens C. H., Buring J. E., Manson J. E., 1996, "Lack of effect of longterm supplementation with beta-carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease". **New England Journal of Medicine**, 334, 1145-1149.
- Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Hollman P. C. H., Katan M. B., Kromhout D., 1994, "Dietary flavonoids and cancer risk in the Zutphen elderly study". **Nutrition and Cancer an international Journal**, 22 (2), 175-184.
- Hertog M. G. L., Feskens E. J. M., Hollmann P. C. H., Katan M. B., Kromhout D. T. I., 1993, "Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary disease: the Zutphen Elderly Study". **The Lancet**, 342, 1007-1011.
- Hite B. H., 1899, "The effect of pressure in the preservation of milk". **West Virginia Agricultural Experiment Station Bulletins**, 58, 15-35.
- Ho S. Y., Mittal G. S., Cross J. D., 1997, "Effect of high field electric pulses on the activity of selected enzymes". **Journal of Food Engineering**, 31, 69-84.
- Hosotani K. & Kitagawa M., 2003, "Improved simultaneous determination method of  $\beta$ -carotene and retinol with saponification in human serum and rat liver". **Journal of Chromatography B**, 791, 305-313.

- Humphries J. M. & Khachik F., 2003, "Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat and pasta products". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 1322-1327.
- Hussein A., Odumeru J. A., Ayanbadejo T., Faulkner H., McNab W. B., Hager H., Szijarto L., 2000, "Effects of processing and packaging on vitamin C and  $\beta$ -carotene content of ready-to-use (RTU) vegetables". **Food Research International**, 33, 131-136.
- International Organization for Standardization, 1984, "Fruits, vegetables and derived products. Determination of ascorbic acid content. Part 2. Routine methods". **Standards ISO**, 6567/2, 4.
- Irwe S. & Olsson I., 1994, "Minimal Processing of Foods and Process Optimization. Reduction of Pectinesterase Activity in Orange Juice by High-Pressure Treatment". Singh R. P., Oliveira F. A. R., Eds., **CRC Press**, Ann Arbor, M. I.
- Jacob R. A., Skala J. H., Omaye S. T., 1987, "Biochemical indices of human vitamin C status". **American Journal of Clinical Nutrition**, 46, 818-822.
- Jacques P. F., Hartz S. C., Chylack J. T., McGandy R. B., Sadowski J. A., 1988, "Nutritional status in persons with and without senile cataract: blood vitamin and mineral levels". **American Journal of Clinical Nutrition**, 48 (1), 152-158.
- Jacques P., Chylack L. J., Hankinson S., Khu P., Rogers G., Friend J., Tung W., Wolfe J. K., Padhye N., Willett W. C., Taylor A., 2001, "Long-term nutrient intake and early age-related nuclear lens opacities". **Archives of Ophthalmology**, 119, 1009-1019.
- Jeyamkandan S., Jayas D. S., Holley R. A., 1999, "Pulsed electric field processing of foods". **Journal of Food Protection**, 62, 1088-1096.
- Jia M., Zhang Q. H., Min D. B., 1998, "Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice". **Food Chemistry**, 2747-2750.
- Jinno K. & Lin Y., 1995, "Separation of carotenoids by high-performance liquid chromatography with polymeric and monomeric octadecylsilica stationary phases". **Chromatographia**, 41 (5/6), 311-317.
- John J. H., Ziebland S., Yudkin P., Roe L. S., Neil H. A. W., 2002, "Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial". **The Lancet**, 359, 1969-1974.
- Johnsson L., 1991, "Thermal degradation of carotenes and influence on their physiological functions". In M. Friedman (Ed.), **Nutritional and toxicological consequences of food processing**, 75-82. New York: Plenum Press.
- Joslyn M. A., 1961, "Fruit and Vegetable Juice. Physiological and enzymological aspects of juice production". Tressler D. K., Joslyn M. A., Eds., **AVI Publishing**, Westport, C. T.
- Keith W. D., Harris L. J., Hudson L., Griffiths M. W., 1997, "Pulsed electric fields as a processing alternative for microbial reduction in spice". **Food Research International**, 30 (3/4), 185-191.
- Kennedy J. F., Rivera Z. S., Lloyd L. L., Warner F. P., Jumel K., 1992, "L-ascorbic acid stability in aseptically processed orange juice in TetraBrik cartons and the effect of oxygen". **Food Chemistry**, 45, 327-331.
- Khachik F. & Beecher G. R., 1987, "Application of a C-45-beta-carotene as an internal standard for the quantification of carotenoids in yellow/orange vegetables by liquid chromatography". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 35 (5), 732-738.

- Khachik F. & Beecher G. R., 1988, "Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. 1. Quantification of carotenoids and related esters by HPLC". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 36 (5), 929-937.
- Khachik F., Beecher G. R., Goli M. B., Lusby W. R., 1991, "Separation, identification and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high-performance liquid chromatography". **Pure and Applied Chemistry**, 63, 71-80.
- Khachik F., Beecher G. R., Lusby W. R., 1989, "Separation, identification, and quantification of the major carotenoids in extracts of apricots, peaches, cantaloupe, and pink grapefruit by liquid chromatography". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 37 (6), 1465-1473.
- Khachik F., Goli G. R., Beecher G. R., Holden J., Lusby W. K., Tenorio M. D., Barrera M. R., 1992, "Effect of food preparation on qualitative and quantitative distribution of major carotenoid constituents of tomatoes and several green vegetables". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 40, 390-398.
- Khachik, F., Beecher G. R., Lusby W. R., 1988, "Separation and identification of carotenoids and carotenol fatty acid esters in some squash products by liquid chromatography. 2. Isolation and characterization of carotenoids and related esters". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 36, 938-946.
- Kidmose U., Knuthsen P., Edelenbos M., Justesen U., Hegelung E., 2001, "Carotenoids and flavonoids in organically grown spinach (*Spinacia oleracea* L.) genotypes after deep frozen storage". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 81, 918-923.
- Kim H., Ye J., Li Y., 2001, "Inactivation of *Listeria monocytogenes* in chilling brine using a flow through electrochemical treatment". **Institute of Food Technologists**, Annual Meeting, Paper 59H-22.
- Kimball D. A., 1991, "Citrus processing-Quality Control and Technology. Juice cloud, color of citrus juices and citrus microbiology". Van Nostrand Reinhold, New York.
- Kimura M. & Rodríguez-Amaya D. B., 2002, "A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids". **Food Chemistry**, 78, 389-398.
- Kincal N. S. & Giray C., 1987, "Kinetics of ascorbic acid degradation in potato blanching". **International Journal of Food Science and Technology**, 22, 249-254.
- Kishida E., Nishimoto, Kojo S., 1992, "Specific determination of ascorbic-acid with chemical derivatization and high-performance liquid-chromatography". **Analytical Chemistry**, 64 (13), 1505-1507.
- Kissinger P. T. & Pachla L., 1987, "Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic using liquid chromatography, with ultraviolet and electrochemical detection". **Food Technology**, 41 (11), 108-111.
- Klavi H. & Bauernfeind J. C., 1981, "Carotenoids as colorants and vitamin A precursors". Bauernfeind J. C. Ed.; **Academic Press**: New York.
- Klavons J. A., Bennett R. D., Vannier S. H., 1994, "Physical/chemical nature of pectin associated with commercial orange juice cloud". **Journal of Food Science**, 59 (2), 399-401.
- Knorr D., 1993, "Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality". **Food Technology**, 47 (6), 156-161.

- Konings E. J. M. & Roomans H. S., 1997, "Evaluation and validation of an LC method for the analysis of carotenoids in vegetables and fruit". **Food Chemistry**, 59 (4), 599-603.
- Korus A., Lisiewska Z., Kmiecik W., 2002, "Effect of freezing and canning on the content of selected vitamins and pigments in seeds of two grass pea (*Lathyrus sativus* L.) cultivars at the not fully mature stage". **Nahrung/Food**, 46 (4), 233-237.
- Kozar S., Bujak A., Eder-Trifunovic J., Kniewald G., 1988, "Determination of L-ascorbic acid in fresh and processed fruit and vegetables by differential pulse polarography". **Fresenius' Zeitschrift fur Analytische Chemie**, 329, 760-763.
- Krinsky N. I., 1993, "Actions of carotenoids in biological systems". **Annual Review of Nutrition**, 13, 561-587.
- Kris-Etherton P. M., Hecker K. D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilpert K. F., Griel A. E., Etherton T. D., 2002, "Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer". **The American Journal of Medicine**, 113 (9B), 71S-88S.
- Kritchevsky S. B., 1999, " $\beta$ -carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease". **Journal of Nutrition**, 129, 5-8.
- Kritchevsky S. B., Tell G. E. S., Shimakawa T., Dennis B., Li R. L., Kohlmeier L., Steere E., Heiss G., 1998, "Provitamin A carotenoid intake and carotid artery plaques: the atherosclerosis risk in communities study". **American Journal of Clinical Nutrition**, 68 (3), 726-733.
- Kuki M., Koyama Y., Nagae H., 1991, "Triplet-sensitized and thermal isomerization of all-trans, 7-cis, 9-cis, 13-cis, and 15-cis-isomers of  $\beta$ -carotene: configurational dependence of the quantum yield of isomerization via  $T_1$  state". **Journal of Physical Chemistry**, 95, 7171-7180.
- Kurowska E. M., Spence J. D., Jordan J., Wetmore S., Freeman D. J., Piche L. A., Serratore P., 2000, "HDL-cholesterol-raising effect of orange juice in subjects with hypercholesterolemia". **American Journal of Clinical Nutrition**, 72 (5), 1095-1100.
- Lado B. H. & Yousef A. E., 2002, "Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms". **Microbes and Infection**, 4, 433-440.
- Lampe J. W., 1999, "Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies". **American Journal of Clinical Nutrition**, 70, 475S-490S.
- Landrum J. T. & Bone R. A., 2001, "Lutein, Zeaxanthin and the Macular Pigment". **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 385, 28-40.
- Lau O. W., Shiu K., Chang S., 1985, "Determination of ascorbic acid in vegetables and fruits by differential pulse polarography". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 36, 733-739.
- Lavelli V. & Giovanelli G., 2003, "Evaluation of heat and oxidative damage during storage of processed tomato products. II. Study of oxidative damage indices". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 83, 966-971.
- 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 (8), 549-556.
- Lee H. S. & Coates G. A., 1999, "Vitamin C in frozen, fresh squeezed, unpasteurized, polyethylene bottled orange juice: a storage study". **Food Chemistry**, 65, 165-168.
- Lee H. S. & Coates G. A., 2003, "Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments". **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 36, 153-156.

- Lee H. S., 2001, "Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (*Cara cara*)". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49 (5), 2563-2568.
- Lee H. S., Castle W. S., Coates G. A., 2001, "High-performance liquid chromatography for the characterization of carotenoids in the new sweet orange (*Earlygold*) grown in Florida, USA". **Journal of Chromatography A**, 913, 371-377.
- Lehninger A. L., 1993, "Bioquímica". 2ª Ed., Ediciones Omega.
- Lesellier E., Tchaplá A., Marty C., Lebert A., 1993, "Review: analysis of carotenoids by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography". **Journal of Chromatography**, 633, 9-23.
- Lessin W. J., Catigani G. L., Schwartz S. J., 1997, "Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45, 3728-3732.
- Lichtenthaler R. & Marx F., 2005, "Total Oxidant Scavenging Capacities of Common European Fruit and Vegetable Juices". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 103-110.
- Lisiewska Z. & Kmiecik W., 2000, "Effect of storage period and temperature on the chemical composition and organoleptic quality of frozen tomato cubes". **Food Chemistry**, 70, 167-173.
- Lisiewska Z., Kmiecik W., Slupski J., 2004, "Contents of chlorophylls and carotenoids in frozen dill: effect of usable part and pre-treatment on the content of chlorophylls and carotenoids in frozen dill (*Anethum graveolens L.*), depending on the time and temperature of storage". **Food chemistry**, 84, 511-518.
- Loscher J., Droh L., Westphal G., Vogel J., 1991, "L-ascorbic-acid-a carbonyl component of nonenzymatic browning reactions. 2. Amino-carbonyl Reactions of L-ascorbic-acid". **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, 192 (4), 323-327.
- Macmillan J. D. & Sheiman M. I., 1974, "Pectic enzymes". **Advances in Chemistry Series**, 136, 101-130.
- Manso M. C., Oliveira F. A. R., Oliveira J. C., Frias J. M., 2001, "Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice: kinetics of pectinmethylesterase inactivation". **Journal of Food Science**, 66 (2), 328-331.
- Martínez A., Rodrigo D., Ruiz P., Rodrigo M., 2000, "Pulsos eléctricos de alta intensidad: una nueva tecnología para la industria alimentaria". **Revista CTC**, 8, 20-24. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC).
- Martins R. C. & Silva C. L. M., 2004, "Frozen green beans (*Phaseolus vulgaris, L.*) quality profile evaluation during home storage". **Journal of Food Engineering**, 64, 481-488.
- Marx M., Schieber A., Carle R., 2000, "Quantitative determination of carotene stereoisomers in carrot juices and vitamin supplemented (ATBC) drinks". **Food Chemistry**, 70, 403-408.
- Marx M., Stuparic M., Schieber A., Carle R., 2003, "Effects of thermal processing on trans-cis-isomerization of  $\beta$ -carotene in carrot juices and carotene-containing preparations". **Food Chemistry**, 83, 609-617.
- Matus Z., Deli J., Szabolcs J., 1991, "Carotenoid composition of yellow pepper during ripening: isolation of beta-Cryptoxanthin 5,6-epoxide". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39 (11), 1907-1914.
- Mauron J., 1981, "The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint". **Progress in Food and Nutrition Science**, 5 (1-6), 5-35.

- McCall M. R. & Frei B., 1999, "Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans". **Free Radical Biology & Medicine**, 26, 1034-1053.
- McDonald C. J., Lloyd S. W., Vitale M. A., Petersson K., Innings F., 2000, "Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm". **Journal of Food Science**, 65, 984-989.
- Meléndez-Martínez A. J., Vicario I. M., Heredia F. J., 2003, "A routine high-performance liquid chromatography method for carotenoid determination in ultrafrozen orange juices". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 4219-4224.
- Mendes-Pinto M. M., Ferreira A. C., Oliveira M. B., Guedes de Pinho P., 2004, "Evaluation of some carotenoids in grapes by reversed- and normal-phase liquid chromatography: a qualitative analysis". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52 (10), 3182-3188.
- Mercadante A. Z., Britton G., Rodríguez-Amaya D. B., 1998, "Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*)". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46 (10), 4102-4106.
- Mermelstein N. H., 1998, "Processing papers cover wide range of topics". **Food Technology**, 52 (7), 50-54.
- Min D. B. & Zhang Q. H., 2002, "Pulsed electric field processing to improve the freshness of orange and tomato juices". **International Meeting**, IFT.
- Min S., Jin Z. T., Yeom H., Min S. K., Zhang Q. H., 2002, "Optimization of processing conditions and effects of commercial scale PEF processing on the microbiological, chemical, physical, and sensory properties of orange juice". **International Meeting**, IFT.
- Mínguez-Mosquera M. I., 1997, "Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos". Sevilla: Universidad de Sevilla. Serie: Ciencias, 47.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica, 2003, "Anuario de estadística agroalimentaria". **MAPA**, Madrid.
- Misawa N., Masamoto K., Hori T., Ohtani T., Boger P., Sandmann G., 1994, "Expression of an *Erwinia phytoene desaturase* gene not only confers multiple resistance to herbicides interfering with carotenoid biosynthesis but also alters xanthophyll metabolism in transgenic plants". **The Plant Journal**, 6, 481-489.
- Mouly P. P., Gaydou E. M., Corsetti J., 1999<sup>a</sup>, "Characterization of paprika (*Capsicum annum*) extract in orange juices by liquid chromatography of carotenoid profiles". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47 (3), 968-976.
- Mouly P. P., Gaydou E. M., Corsetti J., 1999<sup>b</sup>, "Determination of the geographical origin of valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles". **Journal of Chromatography A**, 844 (1-2), 149-159.
- Müller H., 1997, "Determination of the carotenoid content in selected vegetables and fruit by HPLC and photodiode array detection". **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, 204, 88-94.
- Murata M., Shinoda Y., Homma S., 2002, "Browning of model orange juice solution and changes in the components". **International Congress Series**, 1245, 459-460.
- Nagy S. & Smoot J. M., 1977, "Temperature and storage effects on percent retention and percent U. S. Recommended Dietary Allowance of vitamin C in canned single strength orange juice". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 25, 135-138.

- Nagy S., 1980, "Vitamin C contents of citrus fruit and their products: a review". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 28, 8-18.
- Navarro J. L., Lafuente B., Gasque F., Izquierdo L., Nadal M. I., 1981, "Influencia de la temperatura de almacenamiento sobre la pérdida de calidad del zumo concentrado de naranja". **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, 21, 505-512.
- Nicol M. & Savoure N., 1993, "Vitamins and cancers". **La Revue du Praticien**, 43 (2), 152-155.
- Nie H. Y. & Peng S. H., 1984, "Determination of total ascorbic acid in food using microfluorometric method". **Acta Nutrimenta Sinica**, 6 (3), 293-297.
- Nienaber U. & Shellhammer T. H., 2001, "High-pressure processing of orange juice: combination treatments and a shelf life study". **Journal of Food Science**, 66 (2), 332-336.
- Noga G. & Lenz F., 1983, "Separation of citrus carotenoids by reversed-phase high-performance liquid chromatography". **Chromatographia**, 17 (3), 139-142.
- O'Neil C. A. & Schwartz S. J., 1992, "Review: chromatographic analysis of cis/trans carotenoid isomers". **Journal of Chromatography**, 624, 235-252.
- O'Neil C. A., Schwartz S. J., Catignani G. L., 1991, "Comparison of liquid chromatographic methods for determination of cis-trans isomers of beta-carotene". **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, 74 (1), 36-42.
- Oakenfull D. & Scott A., 1984, "Hydrophobic interaction in the gelation of high methoxyl pectins". **Journal of Food Science**, 49, 1093-1098.
- Oliver J. & Palou A., 2000, "Chromatographic determination of carotenoids in foods". **Journal of Chromatography A**, 881, 543-555.
- Olmedilla B., Granado F., Blanco I., Rojas-Hidalgo E., 1992, "Determination of nine carotenoids, retinol, retinyl palmitate and alpha-tocopherol in control human serum using two internal standards". **Food Chemistry**, 45, 205-213.
- Omaye S. T. & Zhang P., 1998, "Phytochemical interactions:  $\beta$ -carotene, tocopherol and ascorbic acid". In Bidlack WR, Omaye ST (eds): "**Phytochemicals: A new Paradigm**" Lancaster, PA: Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Basel, 53-75.
- OMS, 2003, "Joint Expert consultation. Requirements of vitamin A, iron, folate, and vitamin B<sub>12</sub>". **FAO Food & Nutrition Series**.
- Ortuño A., García-Puig D., Fuster N. D., Pérez M. L., Sabater F., Porras I., García-Lidón A., Delrio J. A., 1995, "Flavone and nootketone levels in diferent varieties of grapefruit and pummelo". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 43 (1), 1-5.
- Parish M. E., 1998, "Orange Juice Quality After Treatment by Thermal Pasteurization or Isostatic High Pressure". **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, 31, 439-442.
- Peinado J., Toribio F., Pérez-Bendito D., 1987, "Kinetic-fluorimetric determination of ascorbic acid at the nanomole level". **Analyst**, 112 (6), 775-778.
- Perrig W. J., Perrig P. L., Stahelin H. B., 1997, "The relation between antioxidants and memory performance in the old and very old". **Journal of the American Geriatrics Society**, 45 (6), 718-724.
- Philip T., 1975, "Carotenoid esters in plant products". **Food Technology**, 29, 50-54.

- Philip T., Chen T.-S., Nelson D. B., 1988, "*Liquid chromatographic profiles of major carotenoid esters in commercially processed california navel and valencia orange juice concentrates*". **Journal of Chromatography**, 442, 249-265.
- Polydera A. C., Galanou E., Stoforos, N. G., Taoukis P. S., 2004, "*Inactivation kinetics of pectin methylesterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions*". **Journal of Food Engineering**, 62, 291-298.
- Polydera A. C., Stoforos N. G., Taoukis P. S., 2003, "*Comparative shelf life study and vitamin C loss kinetics in pasteurised and high pressure processed reconstituted orange juice*". **Journal of Food Engineering**, 60, 21-29.
- Pothakamury U. R., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G., Spence K. D., 1997, "*Ultrastructural changes in Staphylococcus aureus treated with pulsed electric fields*". **Food Science and Technology International**, 3, 113-121.
- Prochaska L. J., Nguyen X. T., Donat N., Piekutowski W. V., 2000, "*Effects of food processing on the thermodynamic and nutritive value of foods: literature and database survey*". **Medical Hypotheses**, 54 (2), 254-262.
- Psomiadou E. & Tsimidou M., 1998, "*Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation*". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46 (12), 5132-5138.
- Pupin A. M., Dennis M. J., Toledo M. C. F., 1999, "*HPLC analysis of carotenoids in orange juice*". **Food Chemistry**, 64 (2), 269-275.
- Qin B. L., Pothakamury U. R., Vega H., Martin O., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G., 1995, "*Food pasteurization using high-intensity pulsed electric fields*". **Food Technology**, 49, 55-60.
- Qin B., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G., Pedrow P. D., 1998, "*Inactivating microorganism using a pulsed electric field continuous treatment system*". **IEEE Transactions on Industry Applications**, 34 (1), 43-49.
- Qiu X., Sharma S., Tuhela L., Jia M., Zhang Q., 1998, "*An integrated PEF pilot plant for continuous nonthermal pasteurization of fresh orange juice*". **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, 41 (4), 1069-1074.
- Quackembush F. W., 1987, "*Reverse phase HPLC separation of cis and trans-carotenoids and its application to  $\beta$ -carotenes in food materials*". **Journal of Liquid Chromatography**, 10, 643-653.
- Ritter (de) E. & Purcell A. E., 1981, "*Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors. Carotenoid analytical methods*". Bauernfeind J. C., Ed., **Academic Press**, London, U. K., Chapter 10.
- Robertson G. L. & Samaniego C. M. L., 1986, "*Effect of initial dissolved oxygen levels on the degradation of ascorbic acid and the browning of lemon juice during storage*". **Journal of Food Science**, 51 (1), 184-187.
- Roca de Togores M. C. C., 1988, "*Vitamina C en mandarinas y naranjas. Influencia de la variedad y del tipo de almacenamiento*". Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. Valencia. España.
- Rodrigo C., Rodrigo M., Fiszman S. M., 1997, "*The impact of high temperature, short time thermal treatment on texture and weigh loss of green asparagus*". **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung A.**, 205 (1), 53-58.

- Rodrigo D., Barbosa-Cánovas G. V., Martínez A., Rodrigo M., 2003<sup>a</sup>, “Weibull distribution function based on an empirical mathematical model for inactivation of *Escherichia coli* by pulsed electric fields”. **Journal of Food Protection**, 66, 1007-1012.
- Rodrigo D., Barbosa-Cánovas G. V., Martínez A., Rodrigo M., 2003<sup>b</sup>, “Effect of PEF on pectin methyl esterase and natural microflora of fresh mixed orange and carrot juice treated with pulsed electric fields”. **Journal of Food Protection**, 66, 2336-2342.
- Rodrigo D., Martínez A., Harte F., Barbosa-Cánovas G. V., Rodrigo M., 2001, “Study of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in orange-carrot juice by means of pulsed electric fields: Comparison of inactivation kinetics models”. **Journal of Food Protection**, 64, 259-263.
- Rodríguez-Amaya D. B., 1997, “Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods”. **USAID**, OMNI Project.
- Rodríguez-Amaya D. B., 2000, “Factors influencing carotenoid composition in foods”. In **The fourth international symposium on natural colorants**, 258-263. Hamden, CT: The Hereld Organization.
- Rodríguez-Saona L. E., Barrett D. M., Selivonchick D. P., 1995, “Peroxidase and Lipoxygenase influence on stability of polyunsaturated fatty acids in sweet corn (*Zeamays L.*) during frozen storage”. **Journal of Food Science**, 60, 1041-1044.
- Rohle J. & Voigt F., 1984, “A simple method for the determination of L-ascorbic-acid in citric concentrates and juices”. **Nahrung-Food**, 28 (5), 579-580.
- Roig M. G., Bello J. F., Rivera Z. S., Kennedy J. F., 1999, “Studies on the occurrence of non-enzymatic browning during storage of citrus juice”. **Food Research International**, 32, 609-619.
- Rojas-Hidalgo E., 1996, “*Vitaminas y acción antioxidante*”. Ed. Edimsa. Madrid. España.
- Rouseff R., Raley L., Hofsommer H. J., 1996, “Application of diode array detection with a C-30 reversed phase column for the separation and identification of saponified orange juice carotenoids”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44 (8), 2176-2181.
- Ruiz J. J., Aldaz A., Domínguez M., 1977, “Mechanism of L-ascorbic acid oxidation and dehydro-L-ascorbic acid reduction on a mercury-electrode. I. acid-medium”. **Canadian Journal of Chemistry**, 55 (15), 2799-2806.
- Ryley J., Abdel-Kader Z. M., Guevara L. V., Lappo B. P., Lamb J., Manan F., Povey M. J. W., Race P., 1990, “The prediction of Vitamin Retention in Food Processing”. **Journal of Micronutrient Analysis**, 7, 329-347.
- Saguy I., Kopelman I. J., Mizrahi S., 1978, “Simulation of ascorbic acid stability during heat processing and concentration of grapefruit juices”. **Journal of Food Process Engineering**, 2, 213-225.
- Sahari M. A., Boostani M., Hamidi Z., 2004, “Effect of low temperature on the ascorbic acid content and quality characteristics of frozen strawberry”. **Food Chemistry**, 86, 357-363.
- Saleh M. H. & Tan B., 1991, “Separation and identification of cis/trans carotenoid isomers”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39 (8), 1438-1443.
- Sánchez-Mata M. C., Cámara-Hurtado M., Diez-Marques C., Torija-Isasa M., 2000, “Comparison of high-performance liquid chromatography and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans (*Phaseolus vulgaris L.*)”. **European Food Research Technology**, 210, 220-225.

- Sánchez-Moreno C., Plaza L., Ancos (de) B., Cano P., 2003, "Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juice". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 83, 430-439.
- Sarma U., Brunner E., Evans J., Wormald R., 1994, "Nutrition and the epidemiology of cataract and age-related maculopathy". **European Journal of Clinical Nutrition**, 48 (1), 1-8.
- Sastre-Gallego A. S., 1995, "Naranja y Salud. Vitamina C y salud". **Fundación Valenciana de Estudios Avanzados**. Valencia. España.
- Schieber A., Stintzing F. C., Carle R., 2001, "By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments". **Trends in Food Science & Technology**, 12, 401-413.
- Scott K. J. & Hart D. J., 1993, "Further observations on problems associated with the analysis of carotenoids by HPLC-2: Column temperature". **Food Chemistry**, 47, 403-405.
- Scrimshaw N. S. & Murray E. B., 2000, "Special issue on dietary approaches to vitamin A deficiency". In **Food Nutrition Bulletin**, 2 (2), 115-116. United Nation University Press: Tokio, Japan.
- Selma M. V., Fernández P. S., Valero M., Salmerón M. C., 2003, "Control of *Enterobacter aerogenes* by high-intensity, pulsed electric fields in horchata, a Spanish low-acid vegetable beverage". **Food Microbiology**, 20, 105-110.
- Shi J. & Le Maguer M., 2000, "Lycopene in Tomatoes: Chemical and Physical Properties Affected by Food Processing". **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 40, 1-42.
- Shivashankara K. S., Isobe S., Al-Haq M. I., Takenaka M., Shiina T., 2004, "Fruit antioxidant activity, ascorbic acid, total phenol, quercetin, and carotene of Irwin mango fruits stored at low temperature after high electric field pre-treatment". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 1281-1286.
- Simon J. A., Hudes E. S., Tice J. A., 2001, "Relation of serum ascorbic acid to mortality among U. S. Adults". **Journal of the American College of Nutrition**, 20, 255-263.
- Simopoulos A. P., 2001, "The Mediterranean diets: what is so special about the diet of Greece? The Scientific Evidence". **Journal of Nutrition**, 131, 3065S-3073S.
- Simpson K. L., Tsou S. C. S., Chichester C. O., 1985, "Carotenes". En: **Methods vitamins assay**. 4<sup>o</sup> ed. Augustin, J., Klein, B. P., Becker, D., Venugopal, p. B.. Forte Association of vitamin chemist. John Wiley and sons. New York. USA.
- Sio (de) F., Servillo L., Loiuduce R., Laratta B., Castaldo D. A., 2001, "Chromatographic procedure for the determination of carotenoids and chlorophylls in vegetable products". **Acta Alimentaria**, 30 (4), 395-405.
- Slater T. F. & Block G., 1991, "Antioxidant vitamins and  $\beta$ -carotene in disease prevention". **American Journal of Clinical Nutrition**, 53 (5), 189-196.
- Slattery M. L., Benson J., Curtin K., Ma K.-N., Schaeffer D., Potter J. D., 2000, "Carotenoids and colon cancer". **American Journal of Clinical Nutrition**, 71, 575-582.
- Southon S., 2000, "Increased fruit and vegetable consumption within the EU: Potential health benefits". **Food Research International**, 33, 211-217.
- Spilimbergo S., Dehghani F., Bertuccio A., Foster N. R., 2003, "Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO<sub>2</sub> at low temperature". **Biotechnology and Bioengineering**, 82 (1), 118-125.

- Steinmetz K. A. & Potter J. D., 1996, "Vegetables, fruit and cancer prevention: A review". **Journal of the American Dietetics Association**, 96 (10), 1027-1039.
- Stern P., 1998, "In nature's image. Fruit and vegetable beverages with added ingredients". **Fluessiges Obst**, 65, 126-130.
- Straub O., 1987, "Key to carotenoids". 2nd Edition. Edited by: Pfander H., Gerspacher M., Rychener M. & Schwabe R., Birkhäuser Verlag, Basel, Boston.
- Taungbodhitham A. K., Jones G. P., Wahlqvist M. L., Briggs D. R., 1998, "Evaluation of extraction method for the analysis of carotenoids in fruits and vegetables". **Food Chemistry**, 63 (4), 577-584.
- Taylor S., 1996, "Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans". **The FASEB Journal**, 10, 690-701.
- Tee E. S., 1992, "Carotenoids and retinoids in human nutrition". **CRC-Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 31 (1/2), 103-163.
- Tee E. S., Young S. I., Ho S. K., Mizura S. S., 1988, "Determination of vitamin C in fresh fruits and vegetables using the dye-titration and microfluorometric methods". **Pertanika**, 11 (1), 39-44.
- Téllez-Luis S., Ramírez J. A., Pérez-Lamela C., Vázquez M., Simal Gándara J., 2001, "Aplicaciones de la alta presión hidrostática en la conservación de alimentos". **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, 3 (2), 66-80.
- Temple N. J. & Gladwin K. K., 2003, "Fruit, Vegetables, and the Prevention of Cancer: Research Challenges". **Nutrition**, 19 (5), 467-470.
- Tomás-Barberán F. A., 2003, "Los polifenoles de los alimentos y la salud". **Alimentación, Nutrición y Salud**, 10 (2), 41-53.
- Topuz A., Topakci M., Canakci M., Akinci I., Ozdemir F., 2005, "Physical and nutritional properties of four orange varieties". **Journal of Food Engineering**, 66, 519-523.
- Tribble D. L., 1998, "Further evidence of the cardiovascular benefits of diet enriched in carotenoids". **American Journal of Clinical Nutrition**, 68, 521-522.
- Tsukida K., Saiki K., Takii T., Koyama Y., 1982, "Separation and determination of cis/trans-beta-carotenes by high-performance liquid chromatography". **Journal of Chromatography**, 245, 359-364.
- Ulmer H. M., Heinz V., Gänzle M. G., Knorr D., Vogel R. F., 2002, "Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer". **Journal of Applied Microbiology**, 93, 326-335.
- Vaclavik V. A., 1998, "Essentials of food science". Editorial Chapman & Hall.
- Van Breemen R. B., Schmitz H. H., Schwartz S. J., 1993, "Continuous-flow fast atom bombardment liquid chromatography/mass spectrometry of carotenoids". **Analytical Chemistry**, 65 (8), 965-969.
- Van den Berg H., Faulks R., Granado H. F., Hirschberg J., Olmedilla B., Sandmann G., Southon S., Stahl W., 2000, "Review: The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects". **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80, 880-912.

- Van den Broeck I., Ludikhuyze L. R., Van Loey A. M., Weemaes C. A., Hendrickx M. E., 1999, "Thermal and combined pressure-temperature inactivation of orange pectinesterase: influence of pH and additives". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47 (7), 2950-2958.
- Van Loey A., Verachtert B., Hendrick M., 2001, "Effects of high electric field pulses on enzymes". **Trends in Food Science & Technology**, 12, 94-102.
- Van Poppel G. & Goldbohm R. A., 1995, "Epidemiological evidence for  $\beta$ -carotene and cancer prevention". **American Journal of Clinical Nutrition**, 62, 1493-1503.
- Varma S. D., Devamanoharan P. S., Morris S. M., 1995, "Prevention of cataracts by nutritional and metabolic antioxidants". **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 35 (1-2), 111-129.
- Varsel C., 1980, "Citrus Nutrition and Quality. Citrus juice processing as related to quality and nutrition". Nagy S., Attaway J. A., Eds., **American Chemical Society**, Washington D. C.
- Vega-Mercado H., Powers J. R., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G., 1995, "Plasmin inactivation with pulsed electric fields". **Journal of Food Science**, 60, 1132-1136.
- Versteeg C., Rombouts F. M., Spaansen C. H., Pilnik W., 1980, "Thermostability and orange juice cloud destabilising properties of multiple pectinesterases from orange". **Journal of Food Science**, 45, 969-971.
- Virtamo J., Edwards B., Virtanen M., Taylor P., Maliha N., Albanes D., Huttunen J. K., Hartman A. M., Hietanen P., Maenpaa H., Koss L., Nordling S., Heinonen O. P., 2000, "Effects of supplemental alpha-tocopherol and beta-carotene on urinary tract cancer: incidence and mortality in a controlled trial (Finland)". **Cancer Causes Control**, 11, 933-939.
- West C. & Castenmiller J., 1998, "Food processing and bioavailability of food antioxidants". In: **Proceedings**. FAIR CT95-0158 Symposium Natul. Antioxidants in Processed Foods-Effects on storage characteristics and nutritional value. Denmark: Agril. University of Frederiksberg.
- Wicker L., Vassallo M. R., Echeverria E. J., 1988, "Solubilization of cell-wall bound, thermostable pectinesterase from valencia orange". **Journal of Food Science**, 53 (4), 1171.
- Williamson G., 1999, "Protective effects of fruits and vegetables in the diet". **Nutrition and Food Science**, 1, 6-10.
- Wingerath T., Stahl W., Kirsch D., Kaufmann R., Sies H., 1996, "Fruit juice carotenol fatty acid esters carotenoids as identified by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 44 (8), 2006-2013.
- Worsley S., 2001, "USA is challenging for top spot". **Foodnews® Juices and Fruit**. July 11.
- Yeom H. W., Streaker C. B., Zhang Q. H., Min D. B., 2000<sup>a</sup>, "Effects of pulsed electric fields on the activities of microorganisms and pectin methyl esterase in orange juice". **Journal of Food Science**, 65, 1359-1363.
- Yeom H. W., Streaker C. B., Zhang Q. H., Min D. B., 2000<sup>b</sup>, "Effects of Pulsed Electric Fields on the Quality of Orange Juice and Comparison with Heat pasteurization". **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48, 4597-4605.
- Zeitlin M. F., Megawangi R., Kramer E. M., Armstrong H. C., 1992, "Mothers' and children's intakes of vitamin A in rural Bangladesh". **American Journal of Clinical Nutrition**, 56, 136-147.
- Zerdin K., Rooney M. L., Vermuë J., 2003, "The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material". **Food Chemistry**, 82, 387-395.

## Bibliografia

---

- Zhang Q., Barbosa-Cánovas G. V., Swanson B. G., 1995, "*Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization*". **Journal of Food Engineering**, 25, 261-281.
- Zimmermann U., 1986, "*Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion*". **Reviews on Physiological Biochemical Pharmacology**, 105, 175-256.
- Zimmermann U., Pilwat G., Beckers F., Rieman F., 1976, "*Effects of external electric fields on cell membranes*". **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, 3, 58-83.