

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT  
PÚBLICA

VARIACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS Y CON  
CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN UNA BEBIDA DE ZUMO  
Y LECHE AL APLICAR TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS DE  
CONSERVACIÓN.

ANA ZULUETA ALBELDA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 7 de setembre de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Jordi Mañes Vinuesa
- Dr. Giovanni Burini
- Dra. Guillermina Font Pérez
- Dra. M<sup>a</sup> Dolores Rodrigo Aliaga
- Dr. Robert C. Soliva Fortuny

Va ser dirigida per:

Dra. Ana María Frígola Cánoves

Dra. María José Esteve Más

©Copyright: Servei de Publicacions  
Ana Zulueta Albelda

---

Dipòsit legal: V-953-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7720-8

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,  
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal  
Area de Nutrició i Bromatologia

**Variación de compuestos bioactivos y con capacidad  
antioxidante en una bebida de zumo y leche al aplicar  
tecnologías no térmicas de conservación**

**Changes in bioactive and antioxidant compounds in a juice-  
milk beverage treated by nonthermal technologies**

**TESIS DOCTORAL EUROPEA**

**Ana Zulueta Albelda**

Valencia, Mayo de 2009

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





VNIVERSITAT ID VALÈNCIA  
Facultat (Ø\*) de Farmàcia  
DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT  
PÚBLICA, CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ,  
TOXICOLOGIA I MEDICINA LEGAL  
Àrea de Nutrició i Bromatologia  
Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot, València

Ana M<sup>a</sup> Frígola Cánoves y M<sup>a</sup> José Esteve Más, profesoras titulares de Universidad, del Área de Nutrición y Bromatología, del departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, de la Universitat de València.

CERTIFICAN QUE: la licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos D<sup>a</sup> Ana Zulueta Albelda ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del área, el trabajo que lleva por título: "Variación de compuestos bioactivos y con capacidad antioxidante en una bebida de zumo y leche al aplicar tecnologías no térmicas de conservación" para optar al Título de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Burjassot, a 14 de mayo de 2009.

Fdo.: Ana M<sup>a</sup> Frígola Cánoves

Fdo.: M<sup>a</sup>José Esteve Más



Ana Zulueta Albelda ha disfrutado de una beca de investigación (BI04-4) con cargo al proyecto: Optimización y validación de procesos mínimos de conservación de un nuevo alimento funcional líquido mediante aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) solos o con calor.

Este trabajo ha sido financiado por:

- Proyecto de investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL-2003-05236-C02-02) “Optimización y validación de procesos mínimos de conservación de un nuevo alimento funcional líquido mediante aplicación de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) solos o con calor”.
- Proyecto de investigación del Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL-2006-13320-C03-03/Alí) “Evaluación del impacto de procesos mínimos de conservación, por PEAÍ y APH, solas o combinadas con calor que garanticen la calidad y valor nutritivo de alimentos líquidos”.
- Proyecto de investigación de la Generalitat Valenciana (GV 2007-048) “Parámetros nutritivos y de calidad de una bebida funcional de zumo/leche procesada por tecnologías no térmicas”.
- Ayudas a Grupos de Investigación de la Generalitat Valenciana (Grupos 03/147).

Empresas participantes:

- J. García Carrión S.A.
- Grupo Leche Pascual S.L.
- EDV Packaging solutions.

La presente tesis está enmarcada en el programa de doctorado internacional “Food Chemistry and Toxicology”





Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier  
cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir  
errores.

Julius Robert Oppenheimer (1904-1967)



## AGRADECIMIENTOS

***A todos aquellos que ha dejado huella en mí a lo largo de estos años y me han enseñado tantas cosas...***

En primer lugar, quisiera agradecer profundamente todo el apoyo brindado a mis directoras la Dra Ana Frígola Cánoves y la Dra. María José Esteve Más sin las cuales, no hubiera podido aproximarme y disfrutar de este mundo tan apasionante. Quiero daros las gracias por todo lo que me habéis enseñado académicamente, por contagiarme con vuestra ilusión por esta profesión, por preocuparos por mi futuro y por vuestros ánimos...GRACIAS.

Me gustaría destacar en todo este trabajo a una persona muy especial la Dra. Isabel Frasquet Pons por ser una persona excepcional, por la alegría y bondad que desprendía, por su amistad, SIEMPRE estarás en mi recuerdo.

Mi agradecimiento también a las doctoras Amparo Alegría, Reyes Barberá y María Jesús Lagarda así como al resto del profesorado del área de Nutrición y Bromatología por hacer que todo pareciera más en familia.

A todos los compañeros del laboratorio, en especial a “las Anitinas”: Clara, Lupe, Lourdes y Sara, por ser un apoyo fundamental en las horas de trabajo y fuera de éste como amigas. A Vicente, Toni y Ramón por sus risas. A los que llegaron después y me ayudaron a finalizar todo a tiempo, Francisco y Rebeca, y las chicas que fueron ampliando el grupo Celia y María José.

A todos los profesores y compañeros del laboratorio de “toxi” en especial al Dr. Jordi Mañes por su apoyo en la realización del doctorado internacional y su grata compañía y la de sus doctorandos en los “viajes al extranjero”.

Al personal técnico y administrativo por estar siempre disponibles a tenderte una mano.

A los compañeros del IATA, Fernando y Alejandro por compartir tantas anécdotas con el zumo-leche. A Loles por facilitarme la estancia en Leuven y disfrutar de las pizzas y los paseos en bici. A los doctores Antonio Martínez y con especial recuerdo al Dr. Miguel Rodrigo, por su carácter afable y disponibilidad para tenderte una mano.

Thanks to Dr. Marck Hendrickx for its technical support and to give me the opportunity to keep in touch with the High Pressure Technology. Special thanks to Inneke and Philippe my dearest colleagues in the folates section at the Katholieke Universiteit of Leuven.

Grazie mille al Dr. Giovanni Burini e la sua squadra del Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Biochimica Applicata e Scienze della Nutrizione per la sua ospitalità a Perugia, per farmi sentire come a casa dal primo giorno che sono arrivata e valutare la mia voglia d' imparare.

Gracias en especial a mi FAMILIA y mis AMIGOS que han soportado mis momentos de stress y a los que he tenido que privar muchas veces de mi compañía. Gracias también a mis actuales compañeros de trabajo por entenderme y apoyarme en la finalización de esta etapa.

Gracias a mis padres y hermana por no dejar que nunca me rinda y apoyarme en todo lo que hago, para mi sois lo más importante.

Sobretudo gracias a Pau por ser como es, por hacer que me sienta especial cada día, por su inestimable ayuda y apoyo (incluso técnico) durante este largo camino y por todo lo que nos queda por vivir juntos...

*Abuela, nunca te olvidaré. Va por ti...*

*A mis padres*  
*A mi hermana*  
*A mi abuela*



*A Pau*

m





## **INDICE/ Index**

Indice de Cuadros/ List of Tables .....	I
Indice de Figuras/ List of Figures .....	V
Abreviaturas/ List of abbreviations .....	IX
RESUMEN .....	XI
RESUM .....	XII
SUMMARY .....	XV
RIASSUNTO .....	XVII
1. LITERATURE REVIEW .....	1
1.1. Trends in ready to drink beverages .....	3
1.2. Bioactive compounds in orange juice .....	6
1.2.1. Ascorbic acid .....	6
1.2.2. Carotenoids .....	12
1.2.3. Phenolic compounds.....	18
1.3. Bioactive compounds of milk .....	20
1.4. Preservation methods for liquid foods.....	24
1.4.1. Traditional thermal technologies .....	24
1.4.1.1. Sterilization. ....	24
1.4.1.2. Pasteurization. ....	25
1.4.2. Innovative non-thermal technologies. ....	25
1.4.2.1. High Intensity Pulsed Electric Fields (PEF).....	26
1.4.2.2. High Pressure Processing .....	39
1.5. References .....	43
2. OBJETIVO/ OBJETIVES .....	57
3. PLAN DE TRABAJO/ WORK PLAN .....	61
4. PARTE EXPERIMENTAL/ EXPERIMENTAL WORK .....	67
<b>CAPÍTULO 1. Caracterización físico-química y nutricional de bebidas de zumo y leche del mercado. ....</b>	<b>69</b>
1.1. Introducción .....	69
1.2. Material y métodos. ....	69

1.1.1. Muestras.....	69
1.1.2. Parámetros físico-químicos.....	71
1.1.2.1. pH.....	71
1.1.2.2. °Brix.....	72
1.1.2.3. Densidad.....	72
1.1.2.4. Color.....	73
1.2.3. Compuestos bioactivos.....	76
1.2.3.1. Vitamina C.....	76
1.2.3.2. Carotenoides.....	79
1.2.3.3. Fenoles solubles totales.....	86
1.2.3.4. Capacidad antioxidante total (TEAC).....	87
1.3. Resultados y discusión.....	89
1.3.1. Color.....	89
1.3.2. Carotenoides.....	91
1.3.3. Relación entre el color de las bebidas y las concentraciones de carotenoides.....	96
1.3.4. Parámetros físico-químicos: pH, °Brix y densidad.....	98
1.3.5. Ácido ascórbico.....	101
1.3.6. Fenoles solubles totales.....	102
1.3.7. Capacidad antioxidante total (TEAC).....	103
1.4. Conclusiones.....	107

<b>CAPÍTULO 2. Preparación y caracterización de una nueva bebida de zumo de naranja y leche.....</b>	<b>109</b>
2.1. Introducción.....	109
2.2. Materiales y métodos.....	109
2.2.1. Muestra.....	109
2.2.1.1 <i>Formulación de la bebida</i> .....	109
2.3. Resultados.....	110
2.3.1. Optimización de la preparación de la bebida.....	110
2.3.2. Caracterización físico-química.....	112
2.3.2. Estabilidad del ácido ascórbico.....	113

**CAPÍTULO 3. Efecto de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante total de las bebidas de zumo de naranja y leche.** ..... 115

3.1. Introducción .....	115
3.2. Material y métodos .....	115
3.2.1. Muestras .....	115
3.2.2. Tratamiento por pulsos eléctricos de Alta Intesidad.....	116
3.2.3. Tratamiento térmico .....	119
3.2.4. Análisis de compuestos bioactivos .....	119
3.2.4.1. Vitamina C .....	119
3.2.4.1. Carotenoides y vitamina A .....	119
3.2.4.3. Fenoles solubles totales. ....	119
3.2.4.4. Capacidad antioxidante total.....	119
3.2.5. Análisis físico-químicos.....	121
3.2.5.1. pH. ....	121
3.2.5.2. °Brix .....	121
3.2.5.3. Color .....	121
3.2.6. Análisis estadístico. ....	122
3.3. Resultados y Discusión.....	122
3.3.1. pH y °Brix.....	122
3.3.2. Ácido ascórbico.....	125
3.3.3. Carotenoides. ....	134
3.3.4. Color. ....	143
3.3.5. Compuestos fenólicos. ....	147
3.3.7. Capacidad antioxidante total. ....	150
3.4. Conclusiones .....	154

**CAPITULO 4. Influencia de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad sobre el perfil de ácidos grasos en una bebida de zumo de naranja y leche enriquecida con omega-3 y ácido oléico** ..... 157

4.1. Introducción .....	157
4.2. Material y métodos .....	158
4.2.1. Muestra.....	158
4.2.2. Tratamiento por pulsos eléctricos .....	158
4.2.3. Determinación de parámetros físico-químicos.....	159

4.2.3.1. pH .....	159
4.2.3.2. °Brix .....	159
4.2.3.3. Hidroximetilfurfural .....	159
4.2.3.4. Índice de peróxidos.....	161
4.2.4. Perfil de ácidos grasos. ....	163
4.3. Resultados y discusión .....	167
4.3.1. Parámetros físico-químicos. ....	167
4.3.2. Perfil de ácidos grasos.....	170
4.4. Conclusiones. ....	176

**CAPÍTULO 5. Capacidad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>) de la leche, lactosuero y suero deproteinado. ....** 179

5.1. Introducción .....	179
5.2. Material y métodos .....	179
5.2.1. Muestras.....	179
5.2.2. Capacidad antioxidante total (ORAC).....	180
5.3. Resultados y discusión .....	183
5.3.1. Parámetros analíticos. ....	183
5.3.2. Capacidad antioxidante de la leche .....	185
5.3.3. Capacidad antioxidante del lactosuero.....	188
5.3.4. Capacidad antioxidante del suero deproteinado .....	189
5.4. Conclusiones.....	191

**CAPÍTULO 6. Comparación de los métodos ORAC y TEAC para la medida de la capacidad antioxidante en muestras de zumo y leche. ....** 193

6.1. Introducción .....	193
6.2. Materiales y métodos.....	193
6.2.1. Muestras.....	193
6.2.3. Capacidad antioxidante total (TEAC).....	193
6.2.2. Capacidad antioxidante total (ORAC).....	193
6.3. Resultados y discusión .....	195
6.3.1. Parámetros analíticos .....	195
6.3.2. Capacidad antioxidante de sustancias de referencia.....	196
6.3.3. Capacidad antioxidante de las bebidas a base de zumo y leche.....	198
6.3.4. Correlación entre los métodos ORAC y TEAC .....	206

6.4. Conclusiones .....	207
-------------------------	-----

**CAPÍTULO 7. Almacenamiento de las bebidas de zumo y leche tratadas por PEAI y pasterización. Vida útil del producto..... 209**

7.1. Introducción .....	209
7.2. Material y métodos .....	210
7.2.1. Muestras.....	210
7.2.2. Tratamiento por PEAI .....	210
7.2.3. Tratamiento térmico.....	210
7.2.4. Condiciones de almacenamiento.....	210
7.2.5. Parámetros nutricionales .....	210
7.2.5.1. Ácido ascórbico.....	210
7.2.5.2. Carotenoides y vitamina A.....	210
7.2.5.3. Fenoles solubles totales.....	210
7.2.6. Capacidad antioxidante total.....	211
7.2.6.1. Método TEAC.....	211
7.2.6.2. Método ORAC.....	211
7.2.7. Parámetros físico-químicos.....	211
7.2.7.1. pH y °Brix.....	211
7.2.7.2. Densidad.....	211
7.2.7.3. Color .....	211
7.2.7.4. Hidroximetilfurfural.....	211
7.2.7.5. Densidad .....	211
7.2.7.6. Índice de turbidez.....	211
7.2.8. Análisis estadístico .....	212
7.3. Resultados y discusión .....	212
7.3.1. Ácido ascórbico .....	212
7.3.2. Perfil de carotenoides y vitamina A.....	218
7.3.3. Fenoles solubles totales .....	233
7.3.4. Capacidad antioxidante total (TEAC y ORAC) .....	236
7.3.5. Parámetros físico-químicos .....	242
7.3.5.1. pH.....	242
7.3.5.2. °Brix .....	246
7.3.5.3. Densidad.....	248
7.3.5.4. Índice de turbidez.....	250

7.3.5.5. Parámetros de color.....	252
7.3.5.6. Hidroximetilfurfural.....	258
7.4. Conclusiones.....	262
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	267
BIBLIOGRAFÍA/ REFERENCES.....	275
ANEXOS.....	291
.I. Estadística datos almacenamiento/ Statitics for storage data analysis.....	293
III. PAPERS/ PUBLICACIONES.....	297

## INDICE DE CUADROS/ List of tables

<b>Table nº 1.</b> Recommended dietary Allowance for vitamin C.....	<b>9</b>
<b>Table nº 2.</b> Vitamin C contribution of different fruits and vegetables servings.....	<b>10</b>
<b>Table nº 3.</b> Spanish diet contribution to vitamin C intakes.....	<b>11</b>
<b>Table nº 4.</b> Retinol activity equivalents (RAE) ratios for b-carotene and other provitamin A carotenoids.....	<b>16</b>
<b>Table nº 5.</b> Recommended Dietary Allowance (RDA) for vitamin A as preformed vitamin A (RAE).....	<b>17</b>
<b>Table nº 6.</b> Approximated composition of milk.....	<b>20</b>
<b>Table nº 7.</b> Protein concentration in milk.....	<b>21</b>
<b>Table nº 8.</b> Nutrient contribution of milk depending on fat content.....	<b>23</b>
<b>Table nº 9.</b> Effects of PEF treatment on nutritional and physico-chemical parameters of orange juice and milk review.....	<b>35</b>
<b>Table nº 10.</b> HPP treated products commercialized in recent years.....	<b>42</b>
<b>Cuadro nº 11.</b> Composición de las bebidas de zumo y leche del mercado	<b>70</b>
<b>Cuadro nº 12.</b> Coeficientes de extinción de los patrones.....	<b>80</b>
<b>Cuadro nº 13.</b> Gradiente de fase móvil para la determinación de carotenoides por CLAR.....	<b>84</b>
<b>Cuadro nº 14.</b> Parámetros de color de las bebidas de zumo y leche comerciales.....	<b>90</b>
<b>Cuadro nº 15.</b> Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) con actividad provitamina A presentes en las bebidas comerciales de zumo y leche.....	<b>93</b>
<b>Cuadro nº 16.</b> Parámetros físico-químicos de las bebidas de zumo y leche comerciales analizadas.....	<b>99</b>
<b>Cuadro nº 17.</b> Concentración de vitamina C, fenoles solubles totales y capacidad antioxidante total (TEAC) de las bebidas comerciales.....	<b>104</b>
<b>Cuadro nº 18.</b> Recuperaciones (%) de ácido ascórbico tras la preparación de la bebida de zumo de naranja y leche.....	<b>110</b>
<b>Cuadro nº 19.</b> Características físico-químicas del zumo de naranja y de la bebida de zumo de naranja y leche.....	<b>113</b>
<b>Cuadro nº 20.</b> Parámetros específicos del tratamiento por PEAI.....	<b>118</b>
<b>Cuadro nº 21.</b> Preparación de la curva de calibración de Trolox.....	<b>120</b>
<b>Cuadro nº 22.</b> Valores de pH y $^{\circ}\text{Brix}$ de las bebidas de zumo de naranja y leche tras el tratamiento por PEAI.....	<b>124</b>

<b>Cuadro nº 23.</b> Concentraciones de ácido ascórbico (mg/100 mL) de las bebidas de zumo de naranja y leche tras el tratamiento por PEAI.....	<b>126</b>
<b>Cuadro nº 24.</b> Constantes de degradación del ácido ascórbico ( $k_E$ ) tras los diferentes tratamientos por PEAI.....	<b>129</b>
<b>Cuadro nº 25.</b> Variación de las concentraciones de ácido ascórbico (mg/100 mL) según la energía aplicada ( $W$ , J/mL).....	<b>133</b>
<b>Cuadro nº 26.</b> Longitudes de onda y tiempos de retención de los carotenoides detectados en las bebidas de zumo de naranja y leche.....	<b>136</b>
<b>Cuadro nº 27.</b> Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y vitamina A (RAE) en la bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI a $E=15\text{ kV/cm}$ .....	<b>137</b>
<b>Cuadro nº 28.</b> Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y vitamina A (RAE) en la bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI a $E=25\text{ kV/cm}$ .....	<b>138</b>
<b>Cuadro nº 29.</b> Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y vitamina A (RAE) en la bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI a $E=35\text{ kV/cm}$ .....	<b>139</b>
<b>Cuadro nº 30.</b> Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y vitamina A (RAE) en la bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI a $E=40\text{ kV/cm}$ .....	<b>140</b>
<b>Cuadro nº 31.</b> Concentración de carotenoides y vitamina A (RAE) en las bebidas de zumo de naranja y leche pasteurizadas ( $90^\circ\text{C}$ , 20 s).....	<b>142</b>
<b>Cuadro nº 32.</b> Color de las bebidas de zumo de naranja y leche tras el tratamiento por PEAI y pasteurización.....	<b>146</b>
<b>Cuadro nº 33.</b> Concentración (mg GAE/L) de compuestos fenólicos solubles totales en las bebidas de zumo y de naranja y leche tratadas por PEAI.....	<b>149</b>
<b>Cuadro nº 34.</b> Valores de capacidad antioxidante (TEAC) para las muestras de zumo y leche tratadas por PEAI.....	<b>152</b>
<b>Cuadro nº 35.</b> Cambios en los valores de pH y $^\circ\text{Brix}$ de las bebidas de zumo de naranja y leche adicionada con ácidos grasos durante el tratamiento por PEAI.....	<b>167</b>
<b>Cuadro nº 36.</b> Contenido total de grasa de las bebidas de zumo de naranja y leche adicionadas con ácidos grasos omega 3 y oléico tras el tratamiento por PEAI.....	<b>170</b>
<b>Cuadro nº 37.</b> Tiempos de retención (min) de los diferentes ácidos grasos presentes en la bebida.....	<b>172</b>



<b>Cuadro nº 38.</b> Variaciones en el porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS) tras el tratamiento por PEAI.....	<b>173</b>
<b>Cuadro nº 39.</b> Variaciones en el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) tras el tratamiento por PEAI.....	<b>174</b>
<b>Cuadro nº 40.</b> Variaciones en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) tras el tratamiento por PEAI.....	<b>175</b>
<b>Cuadro nº 41.</b> Volúmenes ( $\mu$ l) de las disoluciones adicionadas a la cubeta de medida para la determinación de la capacidad antioxidante ( $ORAC_{FL}$ ).....	<b>182</b>
<b>Cuadro nº 42.</b> Valores de $ORAC_{FL}$ ( $\mu$ mol TE/L) de las muestras de leche comerciales y sus respectivas fracciones.....	<b>186</b>
<b>Cuadro nº 43.</b> Capacidad antioxidante (ORAC y TEAC) de los patrones de referencia.....	<b>197</b>
<b>Cuadro nº 44.</b> Comparación de valores ORAC y TEAC en las muestras de zumo-leche (50:20, v/v), zumo (50%) y leche (20%).....	<b>200</b>
<b>Cuadro nº 45.</b> Porcentaje de fluorescencia relativa (IF%) en función del tiempo de reacción transcurrido para una muestra de zumo de naranja y una muestra de leche desnatada.....	<b>203</b>
<b>Cuadro nº 46.</b> Concentraciones de ácido ascórbico (mg/100 mL) durante el almacenamiento a 4 y 10°C en las bebidas de zumo y leche tratadas por pasteurización y PEAI.....	<b>213</b>
<b>Cuadro nº 47.</b> Constantes de degradación ( $k_T$ ) y coeficientes de correlación ( $R^2$ ) del ácido ascórbico durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C para las bebidas pasteurizadas y tratadas por pulsos.....	<b>214</b>
<b>Cuadro nº 48.</b> Vida útil (días) de las bebidas de zumo de naranja y leche almacenadas a 4 y 10°C tratadas por PEAI y pasteurización.....	<b>217</b>
<b>Cuadro nº 49.</b> Concentración de carotenoides ( $\mu$ g/100 g) a tiempo inicial en las bebidas sin tratar, tratadas por PEAI y pasteurizadas.....	<b>220</b>
<b>Cuadro nº 50.</b> Variación en las concentraciones de carotenoides ( $\mu$ g/100 g) en las bebidas de zumo y leche sin tratar durante el almacenamiento a 4°C.....	<b>221</b>
<b>Cuadro nº 51.</b> Variación en las concentraciones de carotenoides ( $\mu$ g/100 g) en las bebidas de zumo y leche sin tratar durante el almacenamiento a 10°C.....	<b>222</b>
<b>Cuadro nº 52.</b> Variación en la concentración de carotenoides ( $\mu$ g/100 g) en las bebidas de zumo y leche tratadas por PEAI durante el almacenamiento a 4°C.....	<b>223</b>

<b>Cuadro nº 53.</b> Variación en la concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en las bebidas de zumo y leche tratadas por PEAI durante el almacenamiento a $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>224</b>
<b>Cuadro nº 54.</b> Variación en la concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en la bebida de zumo y leche tratada por pasterización durante el almacenamiento a $4^{\circ}\text{C}$ .....	<b>225</b>
<b>Cuadro nº 55.</b> Variación en la concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en la bebida de zumo y leche tratada por pasterización durante el almacenamiento a $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>226</b>
<b>Cuadro nº 56.</b> Variación en las concentraciones de carotenoides totales ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y vitamina A (RAE) en las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>229</b>
<b>Cuadro nº 57.</b> Variación de las concentraciones de compuestos fenólicos (mg GAE/100 mL) de las muestras pasterizadas y tratadas por PEAI almacenadas a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>233</b>
<b>Cuadro nº 58.</b> Variación de la capacidad antioxidante (TEAC) de las bebidas pasterizadas y tratadas por PEAI almacenadas a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>237</b>
<b>Cuadro nº 59.</b> Variación de la capacidad antioxidante ( $\text{ORAC}_{\text{FL}}$ ) de las muestras pasterizadas y tratadas por PEAI almacenadas a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>237</b>
<b>Cuadro nº 60.</b> Variación en los valores de pH de las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>243</b>
<b>Cuadro nº 61.</b> Cambios en los $^{\circ}\text{Brix}$ de las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>246</b>
<b>Cuadro nº 62.</b> Densidad (g/mL) de las bebidas de zumo de naranja y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>249</b>
<b>Cuadro nº 63.</b> Índice de turbidez de las bebidas de zumo de naranja y leche durante el almacenamiento a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>251</b>
<b>Cuadro nº 64.</b> Cambios en los parámetros de color en las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>253</b>
<b>Cuadro nº 65.</b> Variación en las concentraciones de HMF (mg/100 mL) en las bebidas de zumo de naranja y leche almacenadas a 4 y $10^{\circ}\text{C}$ .....	<b>259</b>

## INDICE DE FIGURAS/ List of figures

<b>Figure nº 1.</b> “Wheel of antioxidant foods” .....	<b>5</b>
<b>Figure nº 2.</b> Chemical structure of ascorbic acid and their derivatives.....	<b>7</b>
<b>Figure nº 3.</b> Structure of carotenoids: Carotenes and Xanthophylls.....	<b>13</b>
<b>Figure nº 4.</b> Structure of main orange flavanones.....	<b>19</b>
<b>Figure nº 5.</b> Mechanism of cell inactivation by pulsed electric fields.....	<b>27</b>
<b>Figure nº 6.</b> OSU-4D equipment located at the IATA (CSIC) pilot plant.....	<b>28</b>
<b>Figure nº 7.</b> Configuration of treatment chambers for continuous PEF treatment.....	<b>29</b>
<b>Figure nº 8.</b> Scheme of the electric field equipment used for the experiments.....	<b>30</b>
<b>Figure nº 9.</b> Juices pasteurized by PEF marketed by Genesis Juice Coop. in the Portland Oregon Area.....	<b>34</b>
<b>Figure nº 10.</b> High Pressure Processing equipment located at the Katholieke Universiteit of Leuven.....	<b>40</b>
<b>Figure nº 11.</b> Plan de trabajo desarrollado.....	<b>66</b>
<b>Figura nº 12.</b> Diagrama de color CIELab.....	<b>75</b>
<b>Figura nº 13.</b> Polarograma de una muestra de zumo de naranja y leche con sus respectivas adiciones de ácido ascórbico.....	<b>78</b>
<b>Figura nº 14.</b> Esquema de extracción de los pigmentos carotenoides.....	<b>83</b>
<b>Figura nº 15.</b> Cromatograma de la muestra 15D a $\lambda=450$ nm.....	<b>91</b>
<b>Figura nº 16.</b> Cromatograma de la muestra 17D a $\lambda=450$ nm.....	<b>92</b>
<b>Figura nº 17.</b> Posición de las bebidas comerciales analizadas en el plano $a^*b^*$ .....	<b>98</b>
<b>Figura nº 18.</b> Valores de pH, °Brix y densidad de las bebidas comerciales analizadas en función de las condiciones de almacenamiento.....	<b>100</b>
<b>Figura nº 19.</b> Concentraciones de vitamina C y fenoles solubles totales (FST) de las bebidas comerciales de zumo y leche.....	<b>103</b>
<b>Figura nº 20.</b> Capacidad antioxidante total (TEAC) de las bebidas comerciales almacenadas en refrigeración o a temperatura ambiente.....	<b>104</b>
<b>Figura nº 21.</b> Correlación entre las concentraciones de ácido ascórbico y los valores de capacidad antioxidante (TEAC) de las bebidas comerciales de zumo y leche.....	<b>106</b>
<b>Figura nº 22.</b> Esquema de preparación de la bebida de zumo de naranja y leche.....	<b>112</b>

<b>Figura nº 23.</b> Estabilidad del ácido ascórbico (mg/100 mL) en la bebida de zumo de naranja y leche durante su almacenamiento en refrigeración ( $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ ).....	<b>113</b>
<b>Figura nº 24.</b> Ajuste del modelo de degradación del ácido ascórbico durante el tratamiento por PEAI en la bebida de zumo de naranja y leche.	<b>127</b>
<b>Figura nº 25.</b> Cinética de degradación del ácido ascórbico para los diferentes tratamientos por PEAI aplicados.....	<b>128</b>
<b>Figura nº 26.</b> Regresión lineal de los valores logarítmicos de reducción decimal ( $\log D$ ) respecto al campo eléctrico (kV/cm).....	<b>132</b>
<b>Figura nº 27.</b> Degradación del ácido ascórbico ( $C/C_0$ ) con la energía ( $W$ ) aplicada durante el tratamiento.....	<b>133</b>
<b>Figura nº 28.</b> Cromatograma de la bebida de zumo de naranja y leche sin tratar a $\lambda=450\text{ nm}$ y $\lambda=290\text{ nm}$ .....	<b>135</b>
<b>Figura nº 29.</b> Variación en las concentraciones de fenoles solubles totales( $C/C_0$ ) con la aplicación de los diversos tratamientos por PEAI.....	<b>150</b>
<b>Figura nº 30.</b> Proceso de extracción de grasa de la bebida de zumo y leche enriquecida.....	<b>168</b>
<b>Figura nº 31.</b> Cromatograma (CG) del perfil de ácidos grasos de la bebida de zumo de naranja y leche sin tratar.....	<b>172</b>
<b>Figura nº 32.</b> Cinéticas de decadencia de la Fluorescencia en presencia de concentraciones crecientes de Trolox.....	<b>184</b>
<b>Figura nº 33.</b> Curva de decadencia de la intensidad de fluorescencia inducida por el radical AAPH para una muestra de leche semidesnatada pasterizada y las fracciones séricas de ésta.....	<b>185</b>
<b>Figura nº 34.</b> Variación en los valores de $\text{ORAC}_{\text{FL}}$ en función del contenido en grasa de la leche.....	<b>188</b>
<b>Figura nº 35.</b> Curva de decaimiento de la fluorescencia durante el ensayo ORAC en presencia de zumo de naranja, zumo de naranja-leche y leche.....	<b>200</b>
<b>Figura nº 36.</b> Evolución de los valores de capacidad antioxidante (TEAC, mmol TE/L) para zumo de naranja y leche desnatada a medida que avanza el tiempo de reacción.....	<b>202</b>
<b>Figura nº 37.</b> Curva de decadencia de la fluoresceína (FL) en presencia de una muestra de zumo de naranja y una muestra de leche desnatada.....	<b>203</b>
<b>Figura nº 38.</b> Variación de la capacidad antioxidante (TEAC, $\mu\text{M TE}$ ) en función del porcentaje de zumo de naranja (A) o leche (B) en la bebida.	<b>204</b>

<b>Figura nº 39.</b> Variación de la capacidad antioxidante ORAC <sub>FL</sub> ( $\mu$ M TE) en función del porcentaje de zumo de naranja o leche en la bebida.....	<b>205</b>
<b>Figura nº 40.</b> Degradación del ácido ascórbico en las bebidas almacenadas a 4°C y 10°C tratadas por PEAI y pasterización.....	<b>214</b>
<b>Figura nº 41.</b> Vitamina C. Interacciones tiempo de almacenamiento-temperatura (a) y temperatura-tratamiento de conservación (b).....	<b>216</b>
<b>Figura nº 42.</b> Cromatogramas a $\lambda=450$ nm y $\lambda=290$ nm de la bebida de zumo de naranja y leche fresca.....	<b>219</b>
<b>Figura nº 43.</b> Degradación del $\alpha$ -caroteno durante el periodo de almacenamiento.....	<b>227</b>
<b>Figura nº 44.</b> Degradación de la antheraxantina durante el periodo de almacenamiento.....	<b>227</b>
<b>Figura nº 45.</b> Degradación de la 9-cis-violaxantina durante el periodo de almacenamiento.....	<b>228</b>
<b>Figura nº 46.</b> Formación de la mutatoxantina durante el periodo de almacenamiento.....	<b>228</b>
<b>Figura nº 47.</b> Cinética de degradación de carotenoides totales (C/C0) en las bebidas de zumo y leche durante el almacenamiento a 4 y 10°C.....	<b>230</b>
<b>Figura nº 48.</b> Cinética de degradación de la vitamina A en las bebidas de zumo y leche durante el almacenamiento a 4 y 10°C.....	<b>231</b>
<b>Figura nº 49.</b> Compuestos fenólicos. Interacciones temperatura-tiempo de almacenamiento (a), temperatura-tratamiento de conservación (b) y tiempo de almacenamiento-tratamiento de conservación (c).....	<b>235</b>
<b>Figura nº 50.</b> Capacidad antioxidante (TEAC). Interacciones tiempo-temperatura (a) y tiempo-tratamiento de conservación aplicado (b).....	<b>239</b>
<b>Figura nº 51.</b> Capacidad antioxidante (ORAC). Interacciones tiempo-temperatura (a), temperatura-tratamiento de conservación (b).....	<b>242</b>
<b>Figura nº 52.</b> pH. Interacción temperatura-tratamiento de conservación aplicado.....	<b>244</b>
<b>Figura nº 53.</b> pH. Interacción tiempo de almacenamiento-temperatura (a) y tiempo - tratamiento de conservación (b).....	<b>245</b>
<b>Figura nº 54.</b> °Brix. Interacción temperatura-tratamiento de conservación.....	<b>247</b>
<b>Figura nº 55.</b> °Brix. Interacciones tiempo de almacenamiento-temperatura (a) y tiempo de almacenamiento-tratamiento de conservación.....	<b>248</b>
<b>Figura nº 56.</b> Cambios en la densidad de las bebidas durante el periodo de almacenamiento.....	<b>250</b>

<b>Figura nº 57.</b> Variaciones en el índice de turbidez durante el periodo de almacenamiento de las bebidas de zumo de naranja y leche.....	<b>251</b>
<b>Figura nº 58.</b> Interacciones temperatura-tiempo de almacenamiento para los parámetros $a^*$ (a) y $b^*$ (b).....	<b>255</b>
<b>Figura nº 59.</b> Interacciones temperatura-tiempo de almacenamiento (a) y temperatura-tratamiento de conservación aplicado (b) para el parámetro $L^*$ .....	<b>255</b>
<b>Figura nº 60.</b> Interacción tiempo-tratamiento de conservación para los parámetros $a^*$ (a) y $b^*$ (b).....	<b>257</b>
<b>Figura nº 61.</b> HMF. Interacción temperatura-tiempo de almacenamiento...	<b>260</b>
<b>Figura nº 62.</b> HMF. Interacción tiempo de almacenamiento-tratamiento de conservación aplicado.....	<b>261</b>

## INDICE DE ABREVIATURAS/ List of Abbreviations

- A:** absorbancia/ *absorbance*
- AA:** ácido ascórbico/ *ascorbic acid*
- AcA:** acetato amónico/ *amonium acetate*
- Ag:** Plata/ *Silver*
- AgCl:** Cloruro de Plata/ *Silver chloride*
- AGMI:** ácidos grasos monoinsaturados/ *monounsaturated fatty acids*
- AGPI:** ácidos grasos poliinsaturados/ *polyunsaturated fatty acids*
- AGS:** ácidos grasos saturados/ *saturated fatty acids*
- ANOVA:** Análisis de la Varianza/ *Analysis of variance*
- AUC:** área bajo la curva/ *area under curve*
- BHT:** Butil-hidroxitolueno/ *Butil hydroxytoluene*
- CLAR:** cromatografía líquida de alta resolución.
- DHA:** ácido docosahexaenoico/ *docosahexaenoic acid*
- DHAA:** ácido dehidroascórbico/ *dehydroascorbic acid*
- DKA:** ácido diquetogulónico/ *diketogulonic acid*
- DME:** Electrodo de Gotas de Mercurio/ *Dropping Mercury Electrode*
- DPP:** Polarografía Diferencial de Impulsos/ *Differential Pulse Polarography*
- E:** campo eléctrico (kV/cm)/ *electric field (kV/cm)*
- E<sup>1%</sup>:** coeficiente de extinción/ *coefficient of extinction*
- EPA:** ácido eicosapentaenoico/ *eicosapentaenoic acid*
- EtOH:** Etanol.
- FAO:** *Food and Agriculture Organization/*
- FDA:** *Food and Drug Administration.*
- FL:** fluoresceína/ *fluorescein*
- FST:** fenoles solubles totales/ *total phenolic soluble compounds*
- GAE:** *gallic acid equivalents*
- H<sub>2</sub>O:** Agua/ *wáter*
- HHP:** *high hydrostatic pressure*
- HPLC:** *high performance liquid chromatography*
- HPP:** *high pressure processing*
- IATA:** instituto de agroquímica y tecnología de los alimentos
- IF:** intensidad de fluorescencia/ *fluorescence intensity*
- IOM:** *institute of medicine*
- IU:** *international units*
- KCl:** Cloruro de potasio/ *Potassium chloride*
- kV:** kilovoltios, *kilovolts*
- LC:** límite de cuantificación/ *limit of quantification*

**LD:** limite de detección/ *limit of detection*  
**LDL:** lipoproteína de baja densidad/ *low density lipoprotein*  
**MAPA:** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.  
**MeOH:** Metanol.  
**MPa:** megapascuales, megapascals  
**MUFA:** *monounsaturated fatty acids*  
**N<sub>2</sub>:** Nitrógeno/ *nitrogen*  
**ORAC:** *oxygen radical antioxidant capacity*  
**p:** Nivel de significancia/ *significant level*  
**Past:** pasterizado/ *pasteurized*  
**PEAI:** pulsos eléctricos de alta intensidad  
**PEF:** *pulsed electric fields*  
**PI:** Patrón Interno  
**PM:** Peso Molecular.  
**PME:** Pectinmetilesterasa.  
**PUFA:** *polyunsaturated fatty acids*  
**r:** Coeficiente de correlación/ *correlation coefficient*  
**RAE:** *retinol activity equivalents*  
**RDA:** *recommended dietary allowances*  
**RDI:** recomendaciones de ingesta diarias  
**SFA:** *saturated fatty acids*  
**T:** temperature (°C)/ *temperature (°C)*  
**t:** tiempo (μs)/ *time (μs)*  
**TCA:** Ácido tricloroacético/ *Trichloroacetic acid*  
**TE,** *trolox equivalent*  
**TEAC,** *trolox equivalent antioxidant capacity*  
**Tr:** trazas/ *trace*  
**TRAP,** *total reducing antioxidant power*  
**UHT:** *Ultra High Temperature*  
**USA,** *United States of America*  
**W:** *energy input (J/mL)*  
**WHO:** *World Health Organization*  
**β-PE:** beta-ficoeritrina/ *beta-ficoerithrin*  
**σ:** conductividad (S/m) /*conductivity(S/m)*  
**τ:** longitud del pulso (s)/ *pulse length (s)*



## RESUMEN

En los últimos años, el consumo de zumos de fruta se ha incrementado en la población española situándose según los últimos datos en 18 litros anuales per cápita (MAPA, 2007). A su vez, han aparecido en el mercado nuevas bebidas, combinación de zumos de fruta y leche con una buena aceptación por parte de los consumidores. El aumento en el consumo de este tipo de bebidas, se ha visto acompañado por una reducción en el consumo de fruta fresca y vegetales. Es por ello que, se debe garantizar la máxima calidad nutricional de estos nuevos alimentos.

Tradicionalmente, los alimentos líquidos como zumos de fruta y/o vegetales, así como la leche, han sido conservados mediante técnicas por calor como la pasteurización o esterilización. Sin embargo, estos procesos, dañan tanto a microorganismos y enzimas, como a nutrientes y otros compuestos químicos responsables de la calidad nutricional y organoléptica de los alimentos. Una práctica común entre los fabricantes de zumos y bebidas de fruta para corregir la pérdida de nutrientes tras el proceso térmico de conservación, es adicionar vitaminas sintéticas, como la vitamina C y carotenoides, con objeto de poder suplir las recomendaciones diarias de ingesta. Sin embargo, diversos estudios científicos han demostrado que las vitaminas sintéticas son menos efectivas y más susceptibles a posibles cambios durante la comercialización de los alimentos que las que se encuentran de manera natural por lo que, la preservación de las mismas resulta de especial interés.

En la última década, investigadores y tecnólogos, demandado por la industria alimentaria, han estudiado la aplicación de tecnologías de conservación alternativas al calor como los pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI). La aplicación de los PEAJ es una técnica desarrollada para la conservación de alimentos líquidos a través de la exposición de éstos a un campo eléctrico de determinada intensidad durante un tiempo del orden de

microsegundos, basándose en la propiedad que tienen los alimentos líquidos (principalmente, compuestos por agua y nutrientes) de ser buenos conductores eléctricos. La tecnología de PEAI es capaz de destruir microorganismos e inactivar enzimas preservando en mayor grado las características nutricionales y organolépticas de los alimentos tratados.

En la presente tesis doctoral, se estudian los efectos de la aplicación de los PEAI sobre las características nutricionales y organolépticas de una bebida mezcla de zumo de naranja y leche y éstos se comparan con los efectos que produce la aplicación de un tratamiento tradicional por pasterización. Posteriormente, se evalúa la variación de dichas propiedades nutricionales y organolépticas durante el almacenamiento de la bebida a 4 y 10°C.

## RESUM

En els darrers anys, el consum de suc de fruita s'ha incrementat en la població espanyola situant-se actualment en 18 litres anuals per càpita (MAPA, 2007). Al mateix temps, han aparegut al mercat noves begudes, combinats de suc de fruita i llet amb una bona acceptació per part dels consumidors. L'augment del consum d'aquest tipus de begudes s'ha vist acompanyat d'una reducció en el consum de fruita fresca i vegetals. És per això que s'ha de garantir la màxima qualitat nutricional d'aquest nou aliment.

Tradicionalment, els aliments líquids com ara els suc de fruita i/o vegetals, o la llet, han sigut conservats mitjançant tècniques per calor com són la pasteurització o l'esterilització. Malgrat tot, aquests processos danyen tant a microorganismes i enzims com nutrients i d'altres compostos químics responsables de la qualitat nutricional i organolèptica dels aliments. Una pràctica comú entre els fabricants de suc i begudes de fruita per tal de corregir la pèrdua de nutrients després del procés tèrmic de conservació, és addicionar vitamines sintètiques, com ara la vitamina C i els caroteneoides, amb l'objectiu de poder suplir les recomanacions diàries d'ingesta. Tot i això, diversos estudis científics han demostrat que les vitamines sintètiques són menys efectives i més susceptibles a possibles canvis durant la comercialització dels aliments que les que es troben de manera natural, pel que la preservació d'aquestes resulta d'especial interès.

A l'última dècada, investigadors i tecnòlegs, a demanda de la indústria alimentària, han estudiat l'aplicació de tecnologies de conservació alternatives al calor com ara els pulsos elèctrics d'alta intensitat (PEAI). L'aplicació dels PEAi és una tècnica desenvolupada per a la conservació d'aliments líquids a través de l'exposició a un camp elèctric de determinada intensitat durant un temps de l'ordre de microsegons, basant-se en la propietat que tenen els aliments líquids (principalment compostos per aigua i nutrients) de ser bons conductors elèctrics. La tecnologia de PEAi és capaç de destruir microorganismes e inactivar enzims

preservant en major grau les característiques nutricionals i organolèptiques dels aliments tractats.

En aquesta tesi doctoral s'estudien els efectes de l'aplicació dels PEAI sobre les característiques nutricionals i organolèptiques d'una beguda composta de suc de taronja i llet, i se comparen amb els efectes que produeix l'aplicació d'un tractament tradicional per pasteurització. Posteriorment, s'avalua la variació d'aquestes propietats nutricionals i organolèptiques durant l'emmagatzematge de la beguda a 4 i 10°C.

## SUMMARY

Nowadays, the consumption of fruit juices has been increased in the Spanish population being the last date annual consumption of 18 liters per capita at year (MAPA, 2007). Moreover, new ready-to-drink beverages, combination of fruit juices and milk, have been appeared in the market based on consumer claims for convenience and health. However, simultaneously to the increase in the consumption of these beverages, a reduction in the consumption of fresh fruit and vegetables has been found. Therefore, it's extremely important to guarantee the nutritional quality of these beverages in order to get consumers with the maximum concentration of nutrients.

Traditionally, liquid foods such as fruit juices, vegetables soups or milk, has been treated by thermal treatments such as pasteurization or sterilization in order to prolong their shelf-life. The application of these treatments causes a reduction on microorganisms and enzymes, but also a reduction of nutrients and other substances related to product quality. A common practice among manufacturers is to add sintetic vitamins such as vitamin C and carotenoids with the objective to correct vitamin losses after thermal treatments. However, some studies demonstrated that sintetic vitamins were less effective than natural ones. Therefore, natural food vitamins preservation is an important research topic.

In the last decades, owing to consumer demands for safe but high-quality natural foods (with minimal or no chemical preservatives), producers have been exploring innovative processing methods with minimal heat treatment such as pulsed electric fields (PEF). PEF is a novel and innovative non-thermal minimal processing technology which has the potential to pasteurize several foods via exposure to high-voltage short pulses ( $\mu\text{s}$ ). PEF technology is able to destroy microorganisms and enzymes preserving the nutritional and quality characteristics of the product treated.

The current doctoral thesis have been developed in order to study the effect of PEF on the nutritional and physico-chemical characteristics of an

orange juice-milk beverage comparing these effects with that obtained after a traditional thermal treatment (pasteurization). Additionally, the shelf-life of this beverage treated by PEF was evaluated during storage at 4 and 10°C.

## RIASSUNTO

Negli ultimi anni, si è registrato un notevole aumento del consumo di succhi di frutta nella popolazione spagnola attestandosi secondo gli ultimi dati ad 18 litri pro capite per anno (MAPA, 2007). Inoltre, si sono affermati nel mercato nuove bevande caratterizzate dalla combinazione di succhi di frutta e latte che godono di un buon grado di accettazione da parte dei consumatori. Nel tempo, si è visto che l'aumento nel consumo di questo tipo di bevande è accoppiato alla riduzione nel consumo di frutta fresca e alimenti vegetali, quindi è di particolare rilevanza nei confronti dei consumatori garantire la massima qualità nutrizionale di queste bevande.

Tradizionalmente le modalità di conservazione di alimenti liquidi come succhi di frutta, sostanze vegetali o latte venivano condotte mediante processi termici quali la pastorizzazione o sterilizzazione. Tuttavia, queste tecniche comportano un danno sia per i microorganismi sia per i nutrienti ed altri composti chimici responsabili della qualità del prodotto. Una pratica comune da parte dell'industria è quella di aggiungere vitamine sintetiche dopo il trattamento termico. Comunque, diversi studi hanno segnalato che le vitamine sintetiche sono meno efficienti da quelle naturali. Perciò, gli studi di nuovi metodi di conservazione delle vitamine naturali sono sommamente importanti.

In questo contesto, negli ultimi anni la domanda da parte dei consumatori di alimenti più simili al prodotto fresco è notevolmente aumentata. Per questo motivo l'industria e la ricerca sinergicamente hanno concentrato i propri sforzi nello studio di tecnologie di conservazione alternative al calore. L'applicazione degli impulsi elettrici ad alta intensità (IEAI) è una tecnica sviluppata per la conservazione degli alimenti mediante un processo che consiste nel sottoporre gli alimenti ad impulsi elettrici di determinata intensità durante un tempo dell'ordine di microsecondi basandosi sulla proprietà che hanno gli alimenti fluidi (soprattutto composti da acqua e nutrienti) di essere dei buoni conduttori elettrici.

Durante questa tesi di dottorato sono condotti studi sull'effetto degli impulsi elettrici sulle caratteristiche nutrizionali ed organolettiche di una bevanda combinata di succo di arancia e latte, comparandolo all'effetto che produce un trattamento tradizionale per pastorizzazione. Infine sono condotti ulteriori studi sulle proprietà nutrizionali e organolettiche durante la conservazione della bevanda.



# **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---

## **LITERATURE REVIEW**



### 1.1. TRENDS IN READY TO DRINK BEVERAGES.

In recent years, a large quantity of new fruit juice, vegetables, tea and milk beverages mixes have appeared on the European market. They are produced from food ingredients of very different natures, leading to complex compositions. These products have been appeared based on consumer claims for convenience, health and new lifestyles that has prompted the industry to become involved in the need for food products which could satisfied these requirements. According to Stagnito's New Products Magazine (Penn, 2005) beverages development focus will be heavily dominated by health (40%), followed by convenience (37%), taste (26%), and low in fat content (12%).

Over the past two decades scientific advances have led to a better understanding of the relationship between diet, dietary compounds and human health. The International Food Technology (IFT) Expert Panel defines "functional foods" as foods and food components that provide a health benefit beyond basic nutrition (for the intended population). Examples may include conventional foods; fortified, enriched or enhanced foods; and dietary supplements. These substances provide essential nutrients often beyond quantities necessary for normal maintenance, growth, and development, and/or other biologically active components that impart health benefits or desirable physiological effects.

Mixed fruit juice and milk beverages fortified with vitamins, minerals, and fibers are among the most widely consumed functional foods (Pszczola, 2005) and their market potential is growing (Cook, 2003; Sharma, 2005). Shukla *et al.* (2003) studied the development of beverages based on the combination of fruit and milk products to make best use of Indian fruit due to their seasonality, taking advantage of the nutritious properties of milk. These authors found a good acceptability and quality of this beverage.

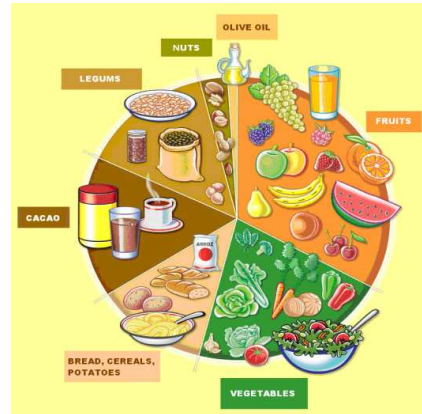
Market trends indicate that milk-based beverages are ideal vehicles for newly discovered bioactive food ingredients targeting lifestyle diseases. Among the recent trends, low-fat milk is commonly used for delivery of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), phytosterols and various kinds of probiotic

bacteria (Michaelidou & Steijns, 2006; de Moreno de LeBlanc *et al.* 2008; Plana *et al.* 2008). The presence of n-3 PUFA-enriched foods on the market and the promotion on their consumption may significantly increase the level of n-3 PUFA intakes (Wallace *et al.* 2000; Baró *et al.* 2003).

Fruit and milk is one such mixture in which the health benefits of fruit constituents can be delivered in combination with the health benefits of milk. Recently, Wegrzyn *et al.* (2008) observed that the antioxidant capacity of an apple polyphenol-milk model system was better in combination of this two food systems than those arising from individual components. Fruits are rich in minerals such as K, Mg, Ca and P (Topuz *et al.* 2005) and contain vitamins C, E, carotenoids, and phenolic compounds which have antioxidant properties (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). Its biological activity has been tested *in vitro*, *ex vivo* and by human intervention (Kurowska *et al.* 2000; Slattery *et al.* 2000; Simon *et al.* 2001; Sánchez-Moreno *et al.* 2003; Brandt *et al.* 2004). On the other hand, milk is a good source of proteins and calcium and also contains substances with antioxidant capacity such as urate, proteins, carotenoids and vitamins (Lindmark-Mansson & Akesson, 2000; Chen *et al.* 2003; Calligaris *et al.* 2004; Hernández-Ledesma *et al.* 2005).

Imbalance between formation of reactive oxygen species and levels of antioxidants *in vivo* has been suggested to play a role in the development of various diseases, such as atherosclerosis, diabetes, rheumatoid arthritis, cancer and neurodegenerative diseases (Halliwell & Gutteridge, 2006). Some studies show that nutritional antioxidants can decrease oxidative damage in human body and may have beneficial effects on disease prevention (Huxley & Neil, 2003; Astley *et al.* 2004). This framework has led to a growing interest in antioxidants from natural products and for the measurement of the antioxidant capacity of food products since it may provide a variety of information such as resistance to oxidation, quantitative contribution of antioxidant substances, or the antioxidant activity that they may present inside the organism when ingested (Huang *et al.* 2005; Serrano *et al.* 2007). The highest antioxidant capacity foods

in the Mediterranean diet are fruit and vegetables (Figure nº1). Wu *et al.* (2004) reported that fruit provides the largest contributions of antioxidants in the diet, mainly because of its abundance of vitamins, phenolic compounds, and carotenoids and Pulido *et al.* (2003) calculated that fruit juices contribute approximately 5–6% to the total antioxidant capacity in the Spanish diet.



**Figure nº 1.** “Wheel of antioxidant foods”. Source: SEDCA (*Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación*).

Since the 90's, several international organizations have recommended increasing the consumption of fruits and vegetables to five or more daily servings, in order to provide a desirable intake of antioxidants and to improve human health (WHO, 1990; World Cancer Research Foundation and American Institute for Cancer Research, 1997). Nowadays, the recommendation of 3 items of fruit per day is not achieved by the Spanish population (1.7 items a day). However, the recommended intake is attained if consumption of fresh or canned juice is taken into account, and it is important, therefore, to achieve high quality of these beverages and to ascertain their nutritional value. In Spain, the annual per capita consumption of fruit juice is around 11.27 L (MAPA, 2006). This quantity has increased in the last few years corresponding to a reduction in the consumption of fresh fruit. Therefore, nutritional quality of fruit juices is extremely important in order to provide vitamins, minerals and fiber to satisfy dietary recommendations.

To prolong juices shelf life, pasteurization is the commonest method to inactivate microorganism and enzymes. However, loss of representative flavour compounds, colour and vitamins has been evidenced (Yeom *et al.* 2000).

In recent years consumers have increasingly sought so-called “fresh” products stored in refrigeration. It is thought that the trend in consumption of this products will increase in the next few years, partly owing to the application of emerging non-thermal technologies, such as high hydrostatic pressure (HHP) and pulsed electric fields (PEF), which find an interesting field for application in liquid foods because they allow cold pasteurization while at the same time preserving their nutritional and quality characteristics (Yeom *et al.* 2000; Ayhan *et al.* 2001; Min *et al.* 2003; Cortés *et al.* 2005; 2006; Sánchez-Moreno *et al.* 2005; Torregrosa *et al.* 2005; 2006, Rivas *et al.* 2007).

## **1.2. BIOACTIVE COMPOUNDS IN ORANGE JUICE**

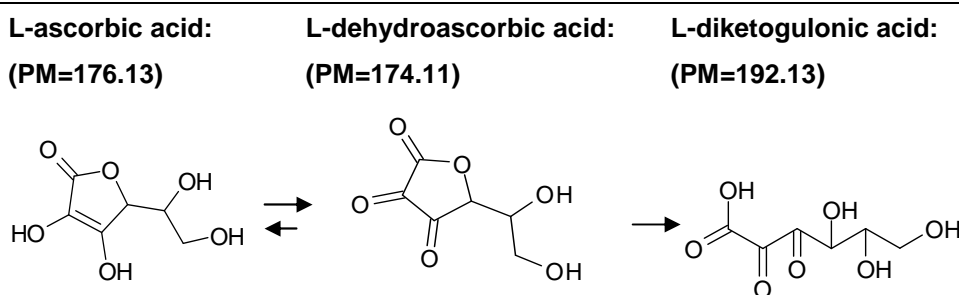
Orange juice is one of the most nutrient-dense fruit juice commonly consumed in developed countries. According to McGill *et al.* (2004) an 8-oz serving provides 110 cal and contains 72 mg of vitamin C (120% of RDA), 450 mg of potassium (13% of RDA), 60 mg of folate (15% of RDA) and 0.15 mg of thiamine (10% RDA). Orange juice is fat free and cholesterol free and is also either sodium free (not-from-concentrate juices) or low in sodium (from-concentrate juices have 15 mg/serving). Other nutrients found in orange juice are vitamin B<sub>6</sub> (6% of RDA), niacin (4% RDA), riboflavin (4% RDA), and magnesium (6%, RDA). In addition to these nutrients, orange juice contains more than 60 plant phytochemicals, specifically flavonoids that function as antioxidants, potential anti-inflammatory agents, and may also have other physiological actions.

### **1.2.1. Ascorbic acid**

Ascorbic acid, the accepted name for vitamin C, is a six-carbon lactone that is synthesized from glucose in the liver of most mammalian species, but not by humans, rendering its ingestion from exogenous supplement or diet

necessary.

Ascorbic acid was first isolated in 1928, by the Hungarian biochemist and Nobel Prize winner Szent-Gyorgyi. It is an unstable, easily oxidized acid and can be destroyed by oxygen, alkali and high temperature. Ascorbic acid is available in reduced form, L-ascorbic acid (AA) and oxidized form, L-dehydroascorbic acid (DHA). At physiological pH, DHAA is hydrolyzed to diketogulonate (DKG) (Figure nº 2). AA and DHAA are antiscorbutic; however, DKG is not (Penny *et al.* 1945).



**Figure nº 2.** Chemical structure of ascorbic acid and their derivatives.

Ascorbic acid is a water soluble antioxidant since it is an electron donor and therefore it is a reducing agent. All known physiological and biochemical actions of vitamin C are due to its action as an electron donor (Padayatty *et al.* 2003). Ascorbic acid donates two electrons from a double bond between the second and third carbons of the 6-carbon molecule. Vitamin C is called an antioxidant because, by donating its electrons, it prevents other compounds from being oxidized. The species formed after the loss of one electron is a free radical, semidehydroascorbic acid or ascorbyl radical. As compared to other free radicals, ascorbyl radical is relatively stable with a half-life of  $10^{-5}$  seconds and is fairly unreactive (Bielski *et al.* 1975). Upon loss a second electron, the compound formed is dehydroascorbic acid. Once formed, ascorbyl radical and dehydroascorbic acid can be reduced back to ascorbic acid by at least three separate enzyme pathways as well as by reducing compounds in biological

systems such as glutathione. In humans, there is only partial reduction back to AA, therefore, all the AA that is oxidized is not recovered. If DHAA is not reduced back to AA it is hydrolyzed irreversibly to 2,3 diketogulonic acid. This compound is formed by irreversible rupture of the lactone ring structure losing its vitamin activity.

Ascorbic acid is found in citrus fruits, green peppers, red peppers, strawberries, tomatoes, broccoli, Brussels sprouts, turnip and other leafy vegetables. Fish and milk also contain small amounts of vitamin C. As foods age, there is a gradual decline in the amount of vitamin C (Platt *et al.* 1963). Vitamin C is thermolabile and therefore in fruit and vegetables it provides an indication of the loss of other vitamins and acts as a valid criterion for other organoleptic or nutritional components degradation such as natural pigments and aromatic substances. Its concentration decreases during storage, depending on storage conditions such as temperature, oxygen content, and light (Esteve *et al.* 1996; Polydera *et al.* 2003; Blasco *et al.* 2004). Therefore, retention studies of this vitamin are of great importance to food technologist and consumers.

Body requires vitamin C for normal physiological functions. It helps in the metabolism of tyrosine, folic acid and tryptophan. It helps to lower blood cholesterol (McRae, 2006) and contributes to the synthesis of the amino acids carnitine (Anderson *et al.* 1987; Gershoff, 1993) and catecholamine that regulates nervous system (Gershoff, 1993). It is needed for tissue growth and wound healing (Davey *et al.* 2000). It helps in the formation of neurotransmitters and increases the absorption of iron in the gut. Being an antioxidant, it protects the body from the harmful effects of free radicals and pollutants (Agudo *et al.* 2007).

Deficiency of this vitamin can lead to anaemia, scurvy, infections, bleeding gums, muscle degeneration, poor wound healing, atherosclerotic plaques, capillary haemorrhaging and neurotic disturbances. Infections deplete the body stores of vitamin C, thus making the body immune system weak.

The Recommended Dietary Allowance (RDA) for vitamin C was recently revised upward from 60 mg daily for men and women. The RDA continues to be



based primarily on the prevention of deficiency disease, rather than the prevention of chronic disease and the promotion of optimum health. The recommended intake for smokers is 35 mg/day higher than for nonsmokers, because smokers are under increased oxidative stress from the toxins in cigarette smoke and generally have lower blood levels of vitamin C (IOM, 2000).

**Table nº 1.** Recommended Dietary Allowance for vitamin C.

Life Stage	Age	Males (mg/day)	Females (mg/day)
Infants	0-6 months	40 (AI)	40 (AI)
Infants	7-12 months	50 (AI)	50 (AI)
Children	1-3 years	15	15
Children	4-8 years	25	25
Children	9-13 years	45	45
Adolescents	14-18 years	75	65
Adults	19 years and older	90	75
Smokers	19 years and older	125	110
Pregnancy	18 years and younger	-	80
Pregnancy	19-years and older	-	85
Breastfeeding	18 years and younger	-	115
Breastfeeding	19 years and older	-	120

AI: adequate intake

As shown in the table below different fruits and vegetables vary in their vitamin C content, but five servings (2½ cups) of fruits and vegetables should average out to at least 200 mg of vitamin C (United State Department of Agriculture, Food Composition Database).

**Table nº 2.** Vitamin C contribution of different fruits and vegetables servings.

<b>Food</b>	<b>Serving</b>	<b>Vitamin C (mg)</b>
Orange juice	¾ cup (170 g)	75
Grapefruit juice	¾ cup (170 g)	60
Orange	1 medium	70
Grapefruit	½ medium	44
Strawberries	1 cup, whole	82
Tomato	1 medium	23
Sweet red pepper	½ cup, raw chopped	141
Broccoli	½ cup, cooked	58
Potato	1 medium, baked	26

*Sources: Oregon State University's Linus Pauling Institute, Medline Plus, University of Maryland Medical Center; 2006.*

According to García-Closas *et al.* (2004), vitamin C intakes in Spanish diet were 138.1 mg/d and nearly 50% of vitamin C intake was provided by fresh fruits followed by fruiting vegetables (especially tomato and sweet pepper) and juices. Among them, orange was the main source of vitamin C (Table nº 2). De Ancos *et al.* (2005) found that the intake of fruit juices led to 21% of the RDA for vitamin C and the total daily intake of fruit and vegetables contributed to 45% of the RDA.

**Table nº 3.** Spanish diet contribution to vitamin C.

<b>Food group</b>	<b>Median intake (g/d)</b>	<b>Vitamin C (%)</b>
Potatoes	70.4	3.9
Green leafy vegetables	54.5	6.7
Fruiting vegetables	89.5	20.3
Root vegetables	3.9	0.4
Cruciferous vegetables	1.2	2.9
Grain and pod vegetables	0.8	0.2
Onion and garlic	18.3	1.0
Stalk vegetables	1.2	0.9
Pulses (legumes)	45.1	2.1
Citrus fruits	37.1	29.6
Non-citrus fruits	210.2	21.5
Juices	0.6	6.3
Nuts and seeds	0.0	0.0
Milk and dairy products	272.4	2.4
Grains (cereals)	213.8	0.0
Meats and poultry	118.7	0.3
Fish and shellfish	54.5	0.0
Eggs	21.9	0.0
Added fats	28.0	0.0
Condiment and sauces	8.3	1.0

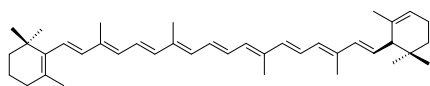
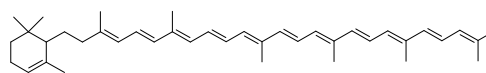
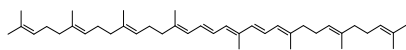
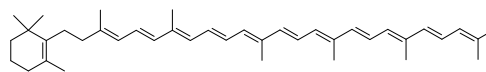
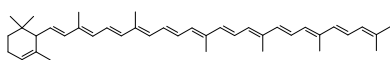
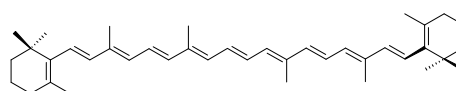
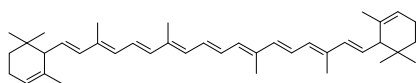
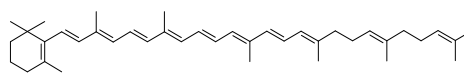
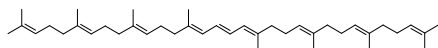
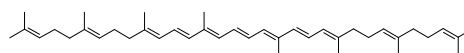
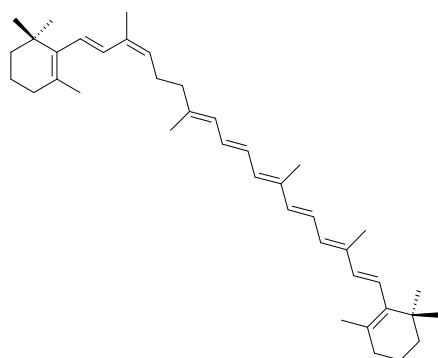
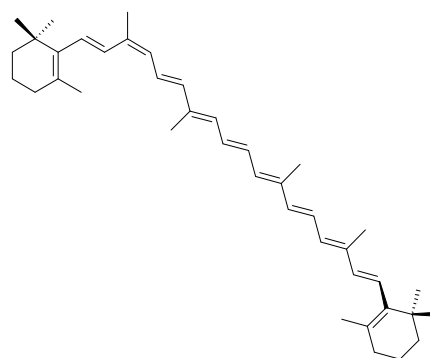
Source: *García-Closas et al. (2004)*

### 1.2.2. Carotenoids

The citrus fruits and their products in general are a complex source of carotenoid pigments, with the largest number of them reported for any fruit (Gross, 1987).

Carotenoids are usually yellow-red isoprenoid polyene pigments widely distributed in nature (Burns *et al.* 2003). The majority are tetraterpenes (they contain 40 carbon atoms) formally composed of eight isoprene units. Carotenoids with molecules containing oxygen, such as lutein and zeaxanthin, are known as xanthophylls. The unoxygenated carotenoids such as  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and lycopene are known as carotenes. Elements other than carbon, hydrogen and oxygen are not directly attached to the carbon skeleton in naturally occurring carotenoids.

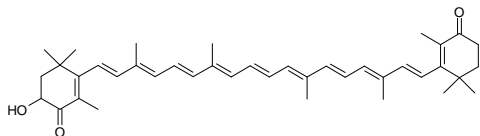
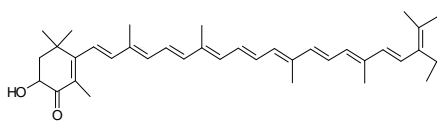
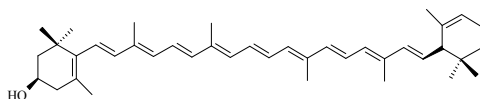
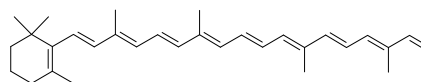
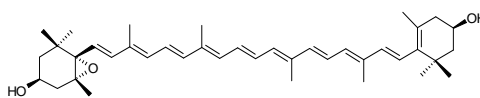
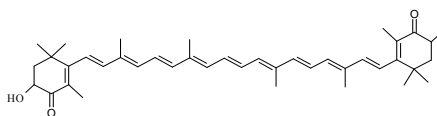
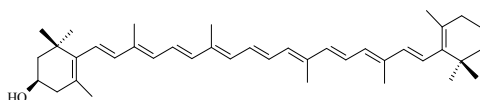
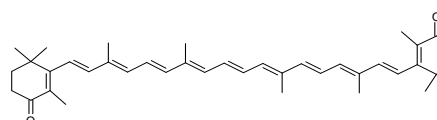
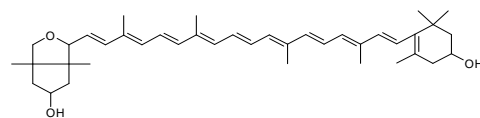
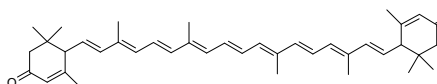
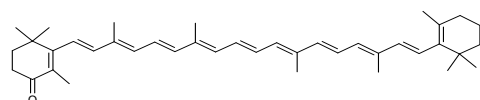
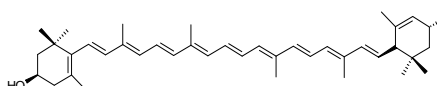
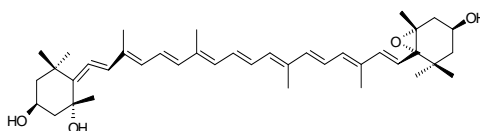
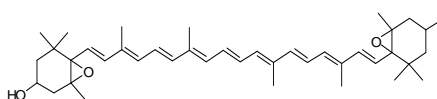
Structures of common orange juice carotenoids are shown in Figure nº 3 (Straub, 1987; Furr *et al.* 1992; Olmedilla *et al.* 1992; Britton, 1995; Mínguez-Mosquera, 1997; Mercadante *et al.* 1998). Depending on the substituents position and the double bonds C-C, carotenoids have two chemical configurations called E/Z or cis/trans stereoisomers. Carotenoids predominantly occur in their all-trans configuration which is the thermodynamically more stable isomer (von Doering *et al.* 1995). However, there is a presence of cis-isomers in plants, especially in chlorophyll-containing tissues (Edelenbos *et al.* 2001; Humphries & Khachick, 2003), but also in a number of fruits (Godoy & Rodriguez-Amaya, 1994). Apart from naturally occurring in plants, cis-isomers have also been demonstrated to be formed as a consequence of food processing (Chen & Chen, 1993). Heat, light, and the presence of triplett sensitizers, especially chlorophyll, and electrophilic compounds, e.g. quinones (De Rigal *et al.* 2000), are the factors that mostly affect isomerization of carotenoids in foods. The conversion to *cis* isomers affects the biological properties of carotenoids. Mínguez-Mosquera *et al.* (2002) found considerably lower relative provitamin A activities of 53 and 38% for 13-*cis*- $\beta$ -carotene and 9-*cis*- $\beta$ -carotene compared with all-*trans*- $\beta$ -carotene.

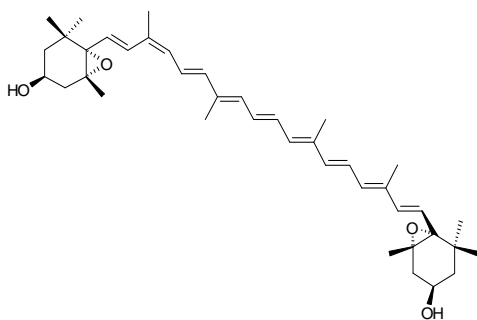
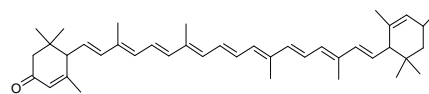
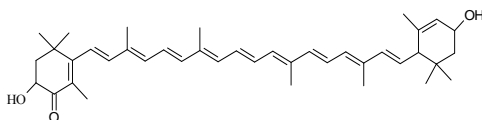
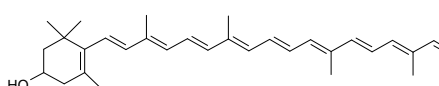
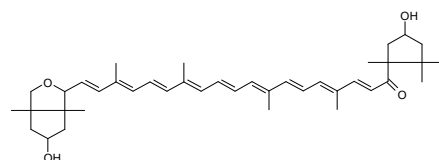
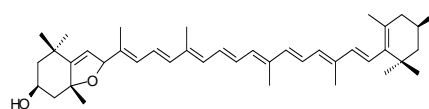
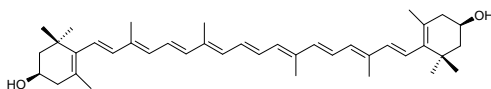
**CAROTENES** **$\alpha$ -carotene: (PM=536.89)** **$\delta$ -carotene: (PM=536.89)****Phytofluene: (PM=542.94)****Torulene: (PM=534.88)** **$\gamma$ -carotene: (PM=536.89)** **$\beta$ -carotene: (PM=536.89)** **$\epsilon$ -carotene: (PM=536.89)** **$\beta$ -zeacarotene: (PM=538.91)****Phytoene: (PM=544.96)** **$\zeta$ -carotene: (PM=540.92)****9-cis- $\beta$ -carotene: (PM=536.89)****9-cis- $\alpha$ -carotene: (PM=536.89)**

---

**XANTOPHYLL**


---

**3-hydroxi-echinenone: (PM=566.88)****Adonirubine: (PM= 580.86)** **$\alpha$ -criptoxanthin: (PM=552.89)** **$\beta$ -apo-8'-carotenal: (PM=416.65)****Antheraxanthin: (PM= 584.89)****Astaxanthin: (PM= 596.86)** **$\beta$ -cryptoxanthin: (PM= 552.89)****Cantaxanthin: (PM= 564.86)****Capsanthin: (PM=584.89)** **$\epsilon,\epsilon$ -caroten-3,3-dione:  
(PM=564.86)****Echinenone: (PM=550.88)****Lutein: (PM=568.89)****Neoxanthin: (PM=600.89)****Violaxanthin: (PM=600.89)**

**9-cis-violaxanthin: (PM=600.89)****3'-hidroxi-e,e-caroten-3-one  
(PM=566.88)** **$\alpha$ -doradexanthin: (PM=582.87)** **$\beta$ -citraurin: (PM=432.65)****Capsorubin: (PM=600.89)****Mutatoxanthin: (PM= 584.89)****Zeaxanthin: (PM=568.89)****Figure nº 3.** Structure of carotenoids: carotenes and xanthophylls.

Different dietary sources of vitamin A have different potencies. For example,  $\beta$ -carotene is less easily absorbed than retinol and must be converted to retinal and retinol by the body. The most recent international standard of measure for vitamin A is retinol activity equivalents (RAE). The term "retinol activity equivalent" (RAE) was introduced by the U.S. Institute of Medicine (IOM, 2001) to replace "retinol equivalent" (RE) used by FAO/WHO (1988) in order to take into account new research on the vitamin A activity (bioefficacy) of carotenoids. The IOM deemed carotenoid bioefficacy in mixed foods eaten by

healthy people in developed countries to be half the required amount set by FAO/WHO. Bioefficacy may, in fact, be even lower in populations in developing countries.

Two micrograms of  $\beta$ -carotene in oil provided as a supplement can be converted by the body to 1  $\mu\text{g}$  of retinol giving it an RAE ratio of 2:1. However, 12  $\mu\text{g}$  of  $\beta$ -carotene from foods are required to provide the body with 1  $\mu\text{g}$  of retinol, giving dietary  $\beta$ -carotene an RAE ratio of 12:1. Other provitamin A carotenoids in foods are less easily absorbed than  $\beta$ -carotene, resulting in RAE ratios of 24:1. The RAE ratios for  $\beta$ -carotene and other provitamin A carotenoids are shown in Table n° 4. An older international standard, still commonly used, is the international unit (IU). One IU is equivalent to 0.3  $\mu\text{g}$  of retinol.

**Table n° 4.** Retinol activity equivalents (RAE) ratios for  $\beta$ -carotene and other provitamin A carotenoids

Quantity Consumed	Quantity Bioconverted to Retinol	RAE ratio
1 $\mu\text{g}$ of dietary or supplemental vitamin A	1 $\mu\text{g}$ of retinol	1:1
2 $\mu\text{g}$ of supplemental $\beta$ -carotene	1 $\mu\text{g}$ of retinol	2:1
12 $\mu\text{g}$ of dietary $\beta$ -carotene	1 $\mu\text{g}$ of retinol	12:1
24 $\mu\text{g}$ of dietary $\alpha$ -carotene	1 $\mu\text{g}$ of retinol	24:1
24 $\mu\text{g}$ of dietary $\beta$ -cryptoxanthin	1 $\mu\text{g}$ of retinol	24:1

The latest RDA of vitamin A is based on the amount needed to ensure adequate stores (four months) in the body to support normal reproductive function, immune function, gene expression, and vision (IOM, 2001). The Table n° 5 lists the RDA values in both micrograms ( $\mu\text{g}$ ) of Retinol Activity Equivalents (RAE) and international units (IU).



**Table nº 5.** Recommended Dietary Allowance (RDA) for vitamin A as preformed vitamin A (RAE).

Life Stage	Age	Males: µg/day (IU/day)	Females: µg/day (IU/day)
Infants (AI)*	0-6 months	400 (1,333 IU)	400 (1,333 IU)
Infants (AI)*	7-12 months	500 (1,667 IU)	500 (1,667 IU)
Children	1-3 years	300 (1,000 IU)	300 (1,000 IU)
Children	4-8 years	400 (1,333 IU)	400 (1,333 IU)
Children	9-13 years	600 (2,000 IU)	600 (2,000 IU)
Adolescents	14-18 years	900 (3,000 IU)	700 (2,333 IU)
Adults	19 years and older	900 (3,000 IU)	700 (2,333 IU)
Pregnancy	18 years and younger	-	750 (2,500 IU)
Pregnancy	19 years and older	-	770 (2,567 IU)
Breast-feeding	18 years and younger	-	1200 (4,000 IU)
Breast-feeding	19 years and older	-	1300 (4,333 IU)

\*AI: adequate intake

Vitamin A deficiency among children in developing nations is the leading preventable cause of blindness (Underwood & Arthur, 1996). The earliest evidence of vitamin A deficiency is impaired dark adaptation or night blindness. Mild vitamin A deficiency may result in changes in the conjunctiva (corner of the eye) called Bitot's spots. Severe or prolonged vitamin A deficiency causes a condition called xerophthalmia (dry eye), characterized by changes in the cells of the cornea (clear covering of the eye) that ultimately result in corneal ulcers, scarring, and blindness (Brody, 1999; Semba, 2001).

According to García-Closas *et al.* (2004) the primary contributors in the Spanish diet to intakes of  $\alpha$ -carotene were root vegetables (carrots) (82%). The richest sources of  $\beta$ -carotene were green leafy, root and fruiting vegetables, each contributing approximately 25% to total intake. As individual foods, carrots, tomatoes and spinach were the three main sources of  $\beta$ -carotene. Fruiting

vegetables were the major contributors to lycopene intake: fresh tomatoes provided 72% and tomato sauce 24 %, whereas ketchup supplied, 1%. Green leafy vegetables (mainly spinach, chard and lettuce) ranked first as a source of lutein (64 %); fruiting vegetables made a moderate contribution. Citrus fruits accounted for most of the  $\beta$ -cryptoxanthin intake, and major contributors to zeaxanthin intake were, in descending order, citrus fruits, green leafy and fruiting vegetables.

### **1.2.3. Phenolic compounds.**

Phenolic compounds or polyphenols belong to a class of phytochemicals found in fruit, vegetables, herbs and a wide variety of plants. The term phenolic is used to define substances that possess one or more hydroxyl (OH) substituents bonded onto an aromatic ring. Nowadays, there are at least 8000 identified phenolic compounds being classified in a dozen of chemical sub-categories according to their structural skeleton which can range from simple molecule to highly polymerized compounds. In fruits, they are responsible of brightly coloured pigments (together with carotenoids) and protect plants from diseases and ultraviolet light.

Over the years, the intake of polyphenols have been related with cardiovascular disease and cancer prevention, anti-inflammatory and antimutagenic function (Hertog *et al.* 1995; Galati *et al.* 2000; Gandini *et al.* 2000; Middleton *et al.* 2000; Hollman, 2001; Manach *et al.* 2004). In general, polyphenols are thought to deliver health benefits by several mechanisms, including: (1) direct free radical quenching, (2) protection and regeneration of other dietary antioxidants, and (3) chelation of metal ions (Cieslik *et al.* 2006)

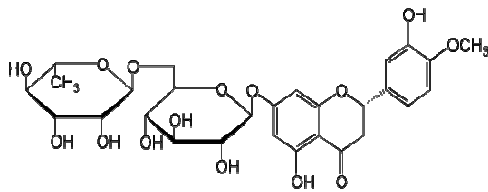
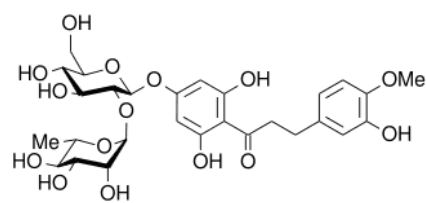
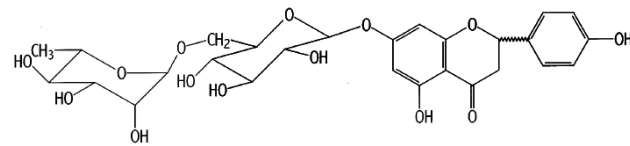
Pure phenolic compounds are powerful free radical scavengers in vitro, and this property has been demonstrated both with synthetic free radicals (ABTS, DPPH) and with physiologically relevant peroxy radicals, hydroxyl radicals, and superoxide (Rice-Evans *et al.* 1996; Prior *et al.* 2005).

Plant phenolics could be used as phytochemicals and nutraceuticals in the dried and powderized form from fruits or fruits by-product sources.

Flavanones are the main phenolic compounds present in orange. Proteggente *et al.* (2002) reported hesperidin as the major phenolic component in orange extracts, accompanied by appreciable amounts of narirutin and neohesperidin (Figure n° 4).

It was found that hesperidin acts as an antioxidant *in vitro* (Hirata *et al.* 2005). It has been demonstrated that hesperidin reduced cholesterol and blood pressure in rats (Ohtsuki *et al.* 2003) and in a mouse study large doses of the glucoside hesperidin decreased bone density loss (Chiba *et al.* 2003) and protects against sepsis (Kawaguchi *et al.* 2004).

---

**Hesperidin****Neohesperidin****Narirutin**

**Figure n° 4.** Structure of main flavanones in orange.

### 1.3. BIOACTIVE COMPOUNDS OF MILK.

Milk is considered as a healthful beverage and consumption of dairy products is associated with overall diet quality. Milk provides an easily accessible matrix, rich in a large variety of essential nutrients like minerals, vitamins and easy digestive proteins with balanced amino acid profiles, and is therefore important to support overall body function (Drewnowski, 2005; Miller *et al.* 2007; Steijns, 2008). Today, dietary recommendations acknowledge the dairy contribution to a healthy diet, yet it is often stressed to preferentially use the low fat or skimmed versions. The main reason for this consumer message is the relatively high amount of saturated fatty acids contained in the dairy fats and their impact on the risk for developing chronic diseases (Joint FAO/WHO Expert consultation, 2003).

A classification of the principal constituents of milk is given in Table n° 6.

**Table n° 6.** Approximate composition of Milk.

<b>Compound (g/100 mL)</b>	<b>Average Content in Milk (% w/w)</b>	<b>Range (% w/w)</b>	<b>Average Content in Dry Matter (% w/w)</b>
Water	87.1	85.3-88.7	–
Solids-not-fat	8.9	7.9-10.0	–
Fat in dry matter	31	22-38	–
Lactose	4.6	3.8-5.3	36
Fat	4.0	2.5-5.5	31
Protein*	3.3	2.3-4.4	25
Mineral substances	0.7	0.57-0.83	5.4
Organic acids	0.17	0.12-0.21	1.3
Miscellaneous	0.15	–	1.2

\* Nonprotein nitrogen compounds not included. Source: Walstra P, Wouters, J, Geurst, T. 2004. *Dairy Science and technology* (2nd ed.) CRC press.

As can be seen, protein constitutes around 3.3 (w/w) of milk. About 80% of these proteins consist of casein, actually a mixture of four proteins:  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein (Table n° 7). The remainder consists, for the most part, of the milk serum proteins, the main one being  $\beta$ -lactoglobulin. Moreover, milk contains numerous minor proteins, including a wide range of enzymes.

**Table n° 7.** Protein concentration of milk.

	Milk (g/kg)	Protein content (g/100 g)
<b>Casein</b>	26	78.5
$\alpha$ -S <sub>1</sub> -casein	10	31
$\alpha$ -S <sub>2</sub> -casein	2.6	8
$\beta$ -casein	9.3	28
$\kappa$ -casein	3.3	10
$\gamma$ -casein	0.8	2.4
<b>Serum proteins</b>	6.2	19
$\alpha$ -lactoalbumin	3.2	9.8
$\beta$ -lactoglobulin	1.2	3.7
albumin	0.4	1.2
Protease-peptone	0.8	2.4
Inmunoglobuline	0.8	2.4
Lactoferrin	0.1	-
Transferrin	0.1	-
Proteins of the globule fat membrane	0.6	2

Source: Walstra P, Geurts TJ, Normen A, Jellema A, Van Boekel M. *Dairy Technology*. Marcel Dekker, Inc. New York, 1999.

In recent years, protein fraction of milk has gained interest because of its antioxidant properties (Chen *et al.* 2003). Milk casein subunits ( $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein) were evaluated in liposomal models (Cervato *et al.* 1999), all the subunits of casein showed good antioxidant capacity since they were able to inhibit Fe-induced peroxidation of arachidonic acid. Additionally, various authors have shown that lactoferrin and peptides obtained from caseins, using proteolytic enzymes (pepsin, trypsin), and from  $\beta$ -lactoglobulin (corolase PP) also have antioxidant properties (Steijns and Hooijdonk, 2000; Suetsuna *et al.* 2000; Kitts and Weiler, 2003; Hernandez-Ledesma *et al.* 2005). Whey proteins

have also been implicated for improving conditions of muscle weight loss such as sarcopenia in the elderly (Schaafsma, 2006a).

On the other hand, the fat is large made up of triglycerides, constituting a very complicated mixture. The component fatty acids vary widely in chain length (2 to 20 carbon atoms) and in saturation (0 to 4 double bonds). Other lipids that are present include phospholipids, cholesterol, free fatty acids, monoglycerides, and diglycerides. Non-enzymatic antioxidants, such as vitamin E, carotenoids and ubiquinol, can act as radical scavengers in the lipidic phase (Lindmark-Mansson and Akesson, 2000). These antioxidant components are active in preventing lipid peroxidation and maintaining milk quality, and may also be used as ingredients in foods and pharmaceuticals to provide products for enhancing consumer health.

Moreover, dairy products are a good source of calcium for healthy and strong bone and teeth. The specific combination of calcium, phosphorous and protein, along with good availability of vitamin D, makes the dairy matrix an almost indispensable part of the diet to build and maintain strong bones (Bonjour, 2005) and may be associated with other areas of health such as hypertension, cancer and weight control/ body composition (Huth *et al.* 2006; Layman, 2004; Schaafsma, 2006b).

Although milk is the most complete single food, unfortunately, it has to be treated to be marketable. Treatments currently used consist of applying heat as low (63°C, 30 min) or high pasteurization (72-80°C, 10-20 s), in bottle sterilisation (110-120°C, 20-30 min) or UHT sterilization (135-140°C, 2-4 s). All these thermal treatments affect the nutrients originally present in raw milk, especially, water-soluble vitamins which are more sensitive to heat treatments than fat-soluble vitamins (Rechcigl, 1982). Riboflavin is the most thermostable and only a 10% destruction was found when milk was sterilized (Ford *et al.* 1969; Haddad & Loewenstein, 1983; Lavigne, 1989). Ascorbic acid is the most heat-sensitive vitamin. Losses of 20-40% ascorbic acid in milk after UHT treatments have been reported (van Eekelen & Heijne, 1965; Ford *et al.* 1969; Mottar & Noudts, 1979; Bendicho *et al.* 2002). Since semi-skimmed and

skimmed milk has a low fat content, it contains less fat-soluble vitamins than other milk despite it contains all the protein, minerals and water soluble vitamins (Table n° 8).

**Table n° 8.** Milk nutrient contribution depending on fat content.

Nutrient	Whole milk	Low-fat milk	Non-fat milk
	3.5% fat	1.5% fat	0.1% fat
Protein (g)	3.1	3.5	3.6
Vitamin A (µg)	43	21	Tr.
Vitamin C (mg)	1	1	1
Ca (mg)	119	120	122
Fe (mg)	0.1	0.1	0.1
Zn (mg)	0.4	0.5	0.4
P (mg)	93	94	97
K (mg)	150	170	150
Vitamin B1 (mg)	0.04	0.04	0.04
Vitamin B2 (mg)	0.18	0.18	0.18
Vitamin B3 (mg)	0.1	0.1	0.1
Vitamin B6 (mg)	0.06	0.06	0.06
Vitamin B12( mg)			
Vitamin D (µg)	0.03	0.01	Tr
Vitamin E (mg)	0.08	0.03	Tr
SFA (g)	2.11	0.89	0.14
MUFA (g)	1.10	0.47	0.05
PUFA (g)	0.12	0.08	0.01

Tr: trace quantities.

SFA: saturated fatty acids.

MUFA: monounsaturated fatty acids.

PUFA: polyunsaturated fatty acids.

## **1.4. PRESERVATION METHODS FOR LIQUID FOODS.**

Seasonality and perishability of foods explain the necessity of applying preservation technologies in order to extend their shelf life. To prolong shelf life, thermal processing is the commonest method in order to inactivate enzymes and destroy microorganisms. However, loss of representative flavour, colour and vitamins has been evidenced after different heat processing (Rodrigo *et al.* 1997, 2006; Esteve *et al.* 1998; Prochaska *et al.* 2000; Yeom *et al.* 2000; Alwaazeer *et al.* 2003; Lee *et al.* 2003; Blasco *et al.* 2004; Polydera *et al.* 2003; 2004; Sánchez-Moreno *et al.* 2006).

The aim of alternative non-thermal technologies such as High Hydrostatic Pressures (HPP) or Pulsed Electric Fields (PEF) is to combine shelf life extension with maintenance of sensory and nutrient characteristics.

### **1.4.1. Traditional thermal technologies.**

#### **1.4.1.1. Sterilization.**

Heat sterilization of food is a drastic heat treatment applied industrially to obtain products which are safe and have a long shelf life. The aim is to thermally destroy microorganisms which cause the spoilage of the food or which can pose a danger to consumer's health. However, heat treatment during sterilization also produces substantial changes in the nutritional and sensory quality of the food.

Sterilization implies high temperatures (from 135°C to 150°C) for short treatment times (4-15 s). The resulting product has a shelf life of two or more years. Any change during this period is due to the changes in flavour, texture and so on but not from microbial contamination (Vaclavik, 1998; Bello, 2000).

The main advantage of sterilization is that food preserved by this technology could be store at room T.



#### **1.4.1.2. Pasteurization.**

Pasteurization is one of the most important steps in food preservation and is essential for food safety. It keeps product quality by effectively destroying virtually all disease-producing and most other bacteria. Pasteurization is defined as a “mild heat treatment” to inactivate enzymes and kill heat-sensitive microorganisms, which cause spoilage, with minimal changes in sensorial and nutritional food properties.

It is used to extend the shelf life of food at low temperatures, usually 4°C for several days (e.g. milk) or for several months (e.g. juices). The severity of the heat treatment and the resulting extension of shelf life are determined mostly by the pH of the food. In fruit juices and fruit juices-milk beverages with pH<4.5 the destruction of spoilage microorganisms or enzyme inactivation (pectinmethylesterase and polygalacturonase) is usually more important than low-acid foods (pH>4.5) (Ramesh, 2007). Pasteurization needs to be conducted at such temperature and for such time that yeast and molds are destroyed.

In commercial practice pasteurization of orange juice is carried out at 90–99°C for 15–30 s (Braddock, 1999).

#### **1.4.2. Innovative non-thermal technologies.**

In recent years, there has been a considerable increase in the demand for high-quality fruits and vegetables, couple with convenience and safety. High quality implies fresh-like quality characteristics of flavour, texture, colour, aroma and overall appearance. Therefore, interest in a new area of food preservation is being promoted, i.e., minimally or lightly processed products.

#### **1.4.2.1. High Intensity Pulsed Electric Fields (PEF)**

The application of PEF as a food processing tool is gaining popularity, since it represents a non-thermal alternative to conventional pasteurization and sterilization methods. The PEF approach, which does not involve the use of added preservatives, is expected to be more appealing to consumers who are sceptical about the use of chemicals in foods. Furthermore, the PEF treatment, being a non-thermal process, may also have no significant detrimental effect on heat-labile components present in foods such as vitamins.

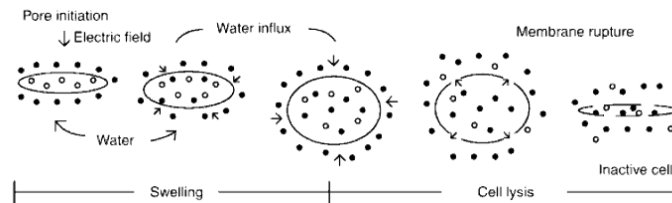
Pulsed electric field processing is a technique consisting on place a food between two electrodes and exposed to a pulsed high voltage field (typically 20-80 kV/cm) and treatment times of the order of less than 1 s.

Inactivation of microorganisms and enzymes contained in food products by electric discharge began in the 1920s with the Electropure process for milk (Fetterman, 1928) which consisted of passing an electric current through carbon electrodes and heating milk to 70°C to inactivate *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli*. Beattie and Lewis (1925) demonstrated a lethal effect of electrical discharges on microorganisms when the applied voltage used to treat food was increased to 3000-4000 V. The electrohydraulic treatment was introduced in the 1950s to inactivate microorganisms suspended in liquid foods. The inactivation of microorganisms was attributed to a shock wave generated by an electric arc that prompted the formation of highly reactive free radicals from chemical species in food (Sitzman, 1995). Gilliland and Speck (1967) applied pulsed electric discharges at different energy levels for the inactivation of *E.coli*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus cremoris* and *Micrococcus radiodurans* suspended in sterile distilled agua as well as for trypsin and a protease from *B.subtilis*. Sale and Hamilton (1967) demonstrated the nonthermal lethal effect of homogeneous electric fields on bacteria and yeast such as *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*.

In general, an increase in the electric field intensity and number of pulses led to an increase in the inactivation of microorganisms. Other factors

that influence the microbial inactivation by PEFs are the treatment temperature, pH, ionic strength and conductivity of liquid food.

Coster and Zimmermann (1975) by the Electroporation's Theory elucidated that the destruction of microorganisms by PEF is due to the formation of pores on cell membranes. This theory explains the formation of pores in the cellular membrane, which is able to generate cellular lysis with subsequent leakage out of intracellular compounds due to the induced electric field (Sale *et al.* 1967). However, this phenomenon has demonstrated to be reversible or irreversible, depending on the level of electric fields intensity (Barbosa-Cánovas *et al.* 1999) and/or the membrane organizational changes (Weaver *et al.* 1988; Tsong, 1990). Mild electric fields intensity conditions, form reversible pores in the cellular membrane, whereas drastic electric field intensity conditions lead to the irreversibility of this phenomenon, which results in cellular death (Zimmerman, 1986; Calderón-Miranda *et al.* 1999).



**Figure nº 5.** Mechanism of cell inactivation by pulsed electric fields (Source: T.Y. Tsong. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 24, 271-295, 1990)

#### **1.4.2.1.1. PEF Equipment Design.**

The essential components of a PEF processing system are: a) a high-voltage power supply, (b) an energy storage capacitor, (c) a pulse generator and switching system, (d) a treatment chamber, containing two electrodes, through which liquid food is pumped, (e) a cooling system, and (f) a unit for control and monitoring of voltage, current, and electric field strength. A crucial prerequisite for an economic and efficient production is a continuous operability with high flow rate capacity, which led to the development of continuous treatment

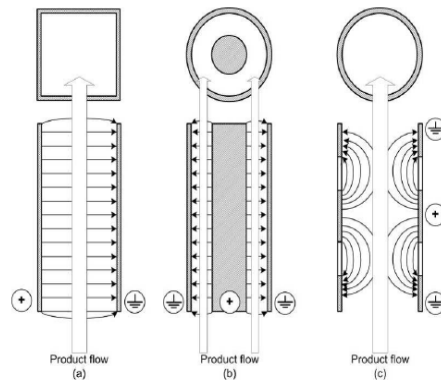
chambers, where the food is pumped through while being exposed to the electric field at ambient or refrigerated as well as elevated temperatures. An example of a PEF equipment is shown in Figure nº 6.



**Figure nº 6.** OSU-4D Equipment located at the Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA, CSIC).

**a) High Voltage Pulse Generator:** is the component in charge of supplying the high-voltage pulses of the shape, duration and intensity required. This could be achieved by the pulse-forming networks (PFN) which consists of a series of high voltage energy storage capacitors and inductors that accumulate electrical energy, then releases the stored energy in the form of a relatively square pulse of comparatively short duration for various pulsed power applications (Góngora-Nieto *et al.* 2002)

**b) Treatment chamber:** wherein the food is exposed to the electric field pulses consists of at least two electrodes, one on high voltage and the other on ground potential, separated by insulating material in different geometric configurations. Parallel plates, coaxial or co-linear cylinders have been commonly used (Figure nº 7).



**Figure nº 7.** Configurations of treatment chambers for continuous PEF-treatment (a) parallel plate, (b) coaxial and (c) co-linear configuration. (Barbosa-Cánovas *et al.* 1998).

**c) Fluid-Handling System:** they are the piping and pumps needed to bring liquid or semi-liquid product being treated from the raw-product tank to the treated-product tank. Continuous or pulseless pumps are preferred to ensure treatment homogeneity.

**d) Control and Monitoring Devices:** the system is usually hooked up to a central computer that controls the operation of the high-voltage pulse generator, setting the proper conditions of voltage and pulsing frequency, and also controlling the operation of pumps and electric valves in the system (Kreuger, 1989).

**e) Cooling coils:** In continuous treatment chambers to achieve high flow rate as required for industrial applications, the pulses have to be applied with high repetition rate, leading to a fast temperature increase of the media. Maintaining constant temperature could be achieved by intermediate cooling between multiple treatment zones.



liquid and liquid-solid interfaces more readily than in homogeneous liquids (Zhang *et al.* 1994)

**b) Treatment time:** apart from the peak electric field strength the product of pulse width and the average number of pulses applied has often been used to evaluate treatment intensity. Increasing treatment time results in higher microbial inactivation (Sale & Hamilton, 1967). The pulse width is defined as the time where the peak field is maintained for square wave pulses or the time until decay to 37% for exponential decay pulses. Typically increasing the number of pulses causes increase in treatment time, as the pulse width is fixed by the impulse generation setup. In general increasing inactivation has been found when treatment time is increased, but in some cases saturation has been reported after a certain amount of pulses.

**c) Treatment temperature:** Treatment temperature has a highly synergetic effect on treatment efficacy, as it has significant influence on cell membrane fluidity and stability. Whereas at low temperatures the phospholipid structure is packed in a gel-like structure their order decreases with increasing temperature. The temperature dependent phase shift from gel to a liquid crystalline structure affects cell membrane stability (Stanley, 1991). The effect of increasing efficiency of PEF application at elevated treatment temperatures has been reported in several studies (Evrendilek & Zhang, 2003; Heinz *et al.* 2003; Li *et al.* 2005). On the other hand, the chemical and physical characteristics of treated products play an important role in defining the applied treatment and its effectiveness. Most characteristics of treated products depend on its intrinsic properties such as its electrical conductivity, dielectric strength, pH, ionic strength, nutrient content, presence of suspended solids and viscosity.

**d) Conductivity and Ionic Strength:** The conductivity of a medium refers to its ability to conduct electric current and increases as a consequence of increased ionic strength (Barbosa-Cánovas *et al.* 1999). Conductivity depends on the ionic strength of the media. Generally, lowering the conductivity reduces the temperature and applied power, thus increasing the electric field intensity and overall effectiveness. An increase in temperature increases the mobility of ions

throughout the solution, causing an increase in the conductivity (Heinz *et al.* 2002). It has been reported that conductivity for skim milk is 0.323 and that for orange juice is 0.427 (S/m) (Barbosa-Cánovas *et al.* 1999).

The presence of components such as fat and proteins has been related to a protective effect on microorganisms against PEF (Zhang *et al.* 1994; Ho *et al.* 1995; Sampedro *et al.* 2007) and even to a higher retention of vitamins (Bendicho, 2002). Some hypotheses in this regard were developed, for example, considering the capacity of some substances to “shield” microorganisms from the applied electric field or assuming the ability of some chemical species to stabilize or prevent ion migration. A protective effect of casein for microorganisms and enzymes against inactivation was also reported by Goff and Hill (1993) and Vega-Mercado *et al.* (1996). Furthermore, some results show that fat could protect the microorganisms when foods were treated by pulsed electric fields (Min *et al.* 2002) However, due to the contradictory findings, more evidence is needed to define the effect of such components on the effectiveness of PEF treatment (Mañas *et al.* 2001).

Wouters *et al.* (2001) pointed out that when one parameter is changed other parameters may also be affected and can in turn affect the effect of PEF treatment. A change in conductivity will affect the pulse energy (J/mL) given by the formula:

$$W \text{ (J/mL)} = E^2 \sigma \tau$$

Where  $E$  is the electric field strength (V/  $\mu\text{m}$ ),  $\sigma$  is the electrical conductivity of the product (S/cm) calculated for each process temperature and  $\tau$  is the pulse length ( $\mu\text{s}$ ). When  $\tau$  and  $E$  are constant,  $W$  will depend only on  $\sigma$  and as a result the application of the same number of pulses will generate more energy input ( $Q$  (J/mL)) when  $\sigma$  is higher:

$$Q \text{ (J/mL)} = nW$$

Where  $n$  is the number of pulses obtained by the product between the frequency (Hz) and the mean residence time in the treatment chamber ( $\mu\text{s}$ ).



Many studies about the effects of PEF on microorganisms inactivation was being accompanied by calculation of the energy applied (Abram *et al.* 2003; Álvarez *et al.* 2003; Heinz, 2003; Pérez and Pilosof, 2004; Sampedro *et al.* 2007) which makes it possible to assess their possible applicability in the industry by comparison with the energy cost of traditional heat treatments, and it can also be useful for comparing PEF treatments carried out by different research groups and in various conditions.

#### **1.4.2.1.3. Current status of PEF technology**

At present there are approximately 25 research groups working on PEF applications for food production (Toepfl, 2006). Though the technology has been explored almost 50 years ago, only a limited amount of technical or industrial scale prototypes or commercial applications is available. A transfer of successful results from laboratory to industrial scale showed to be a difficult task.

Research work is performed on microbial and enzyme inactivation mainly, PEF applications as disintegration technique for plant or animal tissue are limited to France, Canada and Germany at present. Solid state pulse modulators for PEF preservation and treatment chambers have been developed by Thomson CSF, France as well as Diversified Technologies Inc, USA (Gaudreau *et al.* 2001; 2004), still active in this field. These OSU-called systems are also installed in Europe at the Universities of Salerno (Italy), Lleida and Valencia (Spain) as well as Budapest (Hungary). In 2003 the installation of a technical scale system at Stork Food Systems in the Netherlands was reported for preservation of fruit juices (Braakman, 2003). The costs for investment have been estimated to be in between 1 and 2 Million of Euro for an industrial installation, resulting in extra production costs of 1 to 2 Euro-cents per liter of product. The treatment costs for preservation applications have been estimated in between 1 and 2 Euro-cents per liter, whereas the treatment of fruit or vegetable mashes results in total costs of approximately 30 cents per ton of product (Braakman, 2003; Toepfl, 2006). In addition to significant costs of operation, other challenges and pitfalls of a PEF application for liquid food preservation have been identified. Distribution of treatment intensity was shown

to be dependent on many product and processing parameters, such as medium conductivity and constitution, presence of particles, treatment chamber geometry and flow pattern (Fiala *et al.* 2001; Lindgren 2001, 2002; Heinz *et al.* 2002). The presence or formation of air bubbles by electrolysis also was shown to have a detrimental impact on treatment homogeneity and product safety (Góngora-Nieto *et al.* 2003).

Since 2005 the first commercial PEF application has been reported (Clark 2006) for fruit juice preservation in the US. In a scale of 200 l/h premium quality juices are treated at Genesis, Eugene, US, a fruit juice cooperative using an OSU system. Genesis used to distribute unpasteurized, premium fruit juices, but in 2003 a warning letter of FDA was published (FDA, 2003), initiating the quest for a non-thermal preservation technique. After a PEF pasteurization a shelf life of four weeks is obtained, clearance of FDA is available since 1996, indicating the potential of the technique for safe and gentle preservation. In Europe an approval is still pending, but the Novel Food legislative opens a possibility to commercialize PEF-treated products if substantial equivalence to a commercially available, conventionally processed product is proven by the manufacturer.



**Figure nº 9.** Juices pasteurized by PEF marketed by Genesis Juice Coop. in the Portland Oregon area.

In recent years, different research groups have been investigated about the effect of PEF on the quality factors of fruit juices and milk. Some of these works are summarized in Table nº 9.

Table nº 9. Review of effects of PEF treatment on nutritional and physico-chemical parameters of orange juice and milk.

Source	Product	Type of study	Results	Equipment process conditions
Qiu <i>et al.</i> (1998)	Freshly squeezed juice	Vitamin C	Loss heat 7-15%, PEF 4-5%, retention in storage heat/PEF 46/68%.	Exponential 60 kV/cm, W=0.85 $\mu$ s, t=35 $\mu$ s. Pilot plant PEF system, aseptic packaging (200 mL), 12 cofield chambers, tubular electrodes, $\varnothing$ = 0.48, 800 Hz, 75-200 L/h.
Yeom <i>et al.</i> (2000)	Freshly squeezed single strength orange juice, $10^7$ CFU/mL.	Shelf life Vitamin C, colour, flavour, browning index, °Brix, pH, particle	112 days, 4°C, 22°C, and 37°C. 4°C, smaller particle sizes, less browning index, more vitamin C, flavour, and colour with PEF than heat	Co-field tubular treatment system, six co-field chambers, $\varnothing$ = 0.635, d= 1 cm, E= 35 kV/cm, t= 59 $\mu$ s, T= 4°C, 22°C, 37°C
Ayhan <i>et al.</i> (2001)	Single-strength orange juice.	Shelf-life, pH, °Brix and flavour	112 days, 4, 22°C, no changes in pH and °Brix, losses in octanal and ethyl butylate.	Pilot plant-scale OSU and glove box packaging system, 35 kV/cm, 59 $\mu$ s.
Bendicho <i>et al.</i> (2002)	Milk and simulated skim milk ultrafiltrated (SMUF)	Agua soluble vitamins (thiamine, riboflavin, ascorbic acid) and fat soluble vitamins (colecalfiferol and $\alpha$ -tocopherol)	No changes for vitamin content after PEF treatment was found except for AA. Milk retained more AA after PEF than after low (63°C, 30 min, 49.7% retained) or high (75°C, 15 s, 86.7% retained) heat pasteurization treatments.	Exponential decay pulse TG-70 multiple trigger generator. Electrode gap= 1.5 cm, 12.4 mL. E=18.3-27.1 KV/cm, t= 47, 91, 174, 252, 327 $\mu$ s.
Min <i>et al.</i> (2003)	Freshly squeezed orange juice.	Colour, flavour, vitamin C, texture.	PEF retain more flavour, AA, and less browning index than heat.	OSU-6, sterile bottles 50 ml, continuous commercial scale equipment, 40 kV/cm, W=2.6 $\mu$ s, t=95 $\mu$ s.
Cortés <i>et al.</i> (2005)	Horchata (a Spanish vegetable beverage)	pH, total fat, peroxide index, TBARs, Formol index, peroxidase activity	After PEF treatment only peroxidase activity was significantly reduced.	OSU-4D, continuous, square bipolar, 60 mL/min, four cofield chambers, d= 0.293 cm, 20, 25, 35 KV/cm, W= 2.5 $\mu$ s, t=100-475 $\mu$ s.

Sánchez-Moreno <i>et al.</i> (2005)	Orange juice		Antioxidant capacity (DPPH), vitamin C, carotenoids, flavanones	PEF did not modify individual or total carotenoids, flavanones or antioxidant activity and losses of vitamin C were lower than 9%	OSU-4F, continuous, square pulses, bipolar, 200 mL/min, eight cofield treatment chambers, Ø=0.29 cm, E=35 kV/cm, W=4 µs, t=750 µs.
Torregrosa <i>et al.</i> (2005)	Fresh and pasteurised orange-carrot juice (80 :20)		β-carotene, α-carotene, β-cryptoxanthin, 13-cis-β-carotene	PEF: no changes in carotene content. PEF processing generally caused a significant increase in the concentrations of the carotenoids identified as treatment time increased	OSU-4D, continuous, square bipolar, 60 mL/min, six cofield treatment chambers connected in parallel, d= 0.293 cm, E=25-40 KV/cm, W= 2.5 µs, t=30-340 µs.
Cortés <i>et al.</i> (2006)	Fresh orange juice stored at 2 and 10°C		Total carotenoids, Vitamin A  Storage at 2 and 10°C. Comparison between PEF and pasteurized treated juices.	At time 0, pasteurization cause a 12.6% carotenoid reduction and for PEF it was only 6.7%. PEF had less effect than pasteurization on the concentrations of total carotenoids and vitamin A during the storage at both T.	OSU-4D, continuous, square wave bipolar pulses, 60 mL/min, four cofield treatment chambers, Ø=0.23 and d= 0.293 cm, E=20, 25, 35, 40 KV/cm, W= 2.5 µs, t=30-340 µs.
Rivas <i>et al.</i> (2006)	Orange-carrot juice frozen at -40°C		pH, °Brix, HMF, color and sensorial analysis	No changes in pH, °Brix or HMF were found after PEF treatment. The hue angle increased after PEF treatment. Sensorial characteristics similar to untreated juice and better than HTST-pasteurized juice.	OSU-4D, continuous, square bipolar, 60 mL/min, eight cofield chambers, d= 0.293 cm, 25-40 KV/cm, W= 2.5 µs, t=30-340 µs
Cserhalmi <i>et al.</i> (2006)	Orange juice		pH, °Brix, HMF, non-enzymatic browning, color, vitamin C	Physicochemical parameters did not change excepted for °Brix which decreases slightly and vitamin C decreases around 8.8% respect to untreated juice.	OSU-4B, six cofield treatment chambers, Ø=0.29 cm, 84 mL/min, E=28 kV/cm, t= 100 µs.

Elez-Martínez <i>et al.</i> (2006)	Orange juice	pH, color, acidity, °Brix, vitamin C, antioxidant capacity (DPPH)	<p>No differences between PEF and heat treated samples in CIELab parameters. Physicochemical parameters remained constant after treatment and throughout storage pH decreases.</p> <p>Vitamin C decreased around 9% after PEF treatment.</p> <p>No significant changes were found for antioxidant capacity.</p>	OSU-4F, continuous, square mono and bipolar, 60 mL/min, eight cofield treatment chambers, Ø=0.29 cm, E=35 kV/cm, W=4 µs, t=1000 µs.
Floury <i>et al.</i> (2006)	Raw skim milk and ultrafiltrated milk	Viscosity, pH, calcium, casein.	<p>After PEF no changes in pH were found however, PEF affected proteinic components of milk such as casein micelles, since viscosity of PEF-treated milk decreased and coagulation properties were enhanced for high field levels.</p>	Europulse, continuous PEF. E=45 kV/cm for 500 ns and E= 55 kV/cm for 250 ns.
Odrizola-Serrano <i>et al.</i> (2006)	Whole milk	Acidity, pH, free fatty acid content, whey proteins.	<p>PEF did not affect acidity, pH or free fatty acid and no proteolysis and lipolysis were observed during 1 week of storage at 4°C. The whey proteins (albumin, β-lactoglobulin and α-lactoalbumin) were retained at 75.5, 79.9 and 60%, respectively, similarly to heat pasteurized milk (75°C, 15 s).</p>	OSU-4F, continuous PEF, monopolar and bipolar squared wave pulses, eight collinear treatment chambers, 60 mL/min, Ø=0.29 cm, E=35 kV/cm, 1000 µs.

Plaza <i>et al.</i> (2006)	Orange juice	Vitamin C Antioxidant activity (DPPH)	After treatment no changes in antioxidant activity were observed and vitamin C decreased around 8%. At the end of storage period (4°C, 40 days) the antioxidant capacity of PEF juices decreased around 20% and vitamin C around 33%	OSU-4F, continuous, square pulses, bipolar, 200 mL/min, eight cofield treatment chambers, Ø=0.29 cm, E=35 kV/cm, W=4 µs, t=750 µs.
Rivas <i>et al.</i> (2007)	Orange juice-milk beverage	Agua soluble vitamins: biotin, folic acid, panthotenic acid and riboflavin	Agua soluble vitamins affected by PEF at least in the same way as mild heat treatment (84°C) and better than high intensity thermal treatments (95°C, 45 s).	OSU-4D, continuous, square wave bipolar pulses, 60 mL/min, six cofield treatment chambers, d=0.293 cm, Ø=0.29, E=15-40 KV/cm, W= 2.5 µs, t=40-700 µs.
Élez-Martínez <i>et al.</i> (2007)	Orange juice	Vitamin C Antioxidant Capacity (DPPH)	Vitamin C retention of PEF better than heat-pasteurized and no differences for antioxidant capacity between PEF and untreated products, whereas heat products showed lower values of antioxidant capacity.	OSU-4F, continuous, square mono and bipolar pulses, 60 mL/min, eight cofield treatment chambers, Ø=0.29 cm, E=15, 25, 35 kV/cm, W=4 µs, t=100, 400, 1000 µs.
Cortés <i>et al.</i> (2008)	Orange juice	Colour, HMF During storage at 2 and 10°C. Comparison between PEF treated and pasteurized juices.	PEF treated juice shows a more similar colour to untreated juice than pasteurized juice (during storage at 2 and 10°C, and no significant variations in HMF were found	OSU-4D, continuous, square wave bipolar pulses, 60 mL/min, four cofield treatment chambers, Ø=0.23 and d= 0.293 cm, E=20, 25, 35, 40 KV/cm, W= 2.5 µs, t=30-340 µs.

#### **1.4.2.2. High Pressure Processing**

High-pressure (HP) processing, also sometimes known as UHP (Ultra High Pressure) or HHP (High Hydrostatic Pressure) is a relatively novel non-thermal technology which involves subjecting foods to pressures on the order of hundreds of mega Pascals, normally from 100 to 1000 MPa, (equivalent to about 1000-10000 times atmospheric pressure) with temperatures from -20°C to 60°C and at treatment times from seconds to up to 60 min. The pressure-temperature-time combination induces destruction of microorganisms (Cheftel, 1995) and has hence been applied as a pasteurization technique for a broad range of food products.

HP processing technique is based on Le Chatelier's principle which states that any phenomenon (phase transition, change in molecular configuration, chemical reaction) accompanied by a decrease in volume will be enhanced by pressure and vice versa. Consequently, at a relatively low temperature (0-40°C) pressure has a limited effect on the disruption of covalent bonds (Tauscher, 1995; Balny *et al.* 1997). Small molecules such as vitamins, pigments and volatile compounds are less affected by high hydrostatic pressure processing compared to proteins/enzymes which are often characterized by a complex three-dimensional structure stabilized by various covalent and non-covalent interactions. Some studies on vitamin stability under HP (at moderate temperature) have shown that HP does not significantly affect the vitamin content of fruit and vegetables products (Sancho *et al.* 1999; Fernández-García *et al.* 2001; Butz *et al.* 2004) except at extreme pressure-temperature combinations (Van den Broeck *et al.* 1998).

Research on high-pressure processing has demonstrated effects on (i) phase transitions of water and lipids, (ii) cell wall and membrane disruption processes, (iii) inactivation of vegetative microorganisms, (iv) toxins, (v) modification of biopolymers including both enzyme activation and enzyme inactivation, protein denaturation and gel formation, (vi) enzyme catalyzed conversion processes and, (vii) chemical reactions.

Recently, HP processing at elevated temperatures (initial temperatures >70°C) referred to "High pressure Sterilization (HPS)" have been introduced and

suggested as food preservation technology for spore inactivation to reach commercially sterile conditions (Meyer, 2000a, 2000b; Wilson *et al.* 2000; Van Schepdael, 2002; Black *et al.* 2007). High Pressure Sterilization takes the advantage of adiabatic heating during pressure build up either through single or multiple pressure cycle/pulses. Pressurization takes place at high initial temperatures (<70°C) to achieve a final temperature up to 110-120°C during the associated adiabatic heating and in general the treatment is conducted for a short duration (max 3 min).

In a typical HPP process, the product to be treated is packaged in a flexible container (e.g. a pouch or a plastic bottle) and is placed in a pressure vessel, submerged in a liquid (normally agua), which acts as a pressure-transmitting medium. The liquid in the chamber is pressurized with a pump, and this pressure is transmitted through the package into the food itself. After a treatment time, normally from 1 min to 20 min, pressure is decreased and the product has been treated. An increase or a decrease of pressure is associated with a proportional temperature change of the vessel contents, respectively, due to adiabatic heating or cooling temperature gradient. The effectiveness of HP is influenced by extrinsic (process) factors such as treatment time, pressurization/decompression rate, pressure/ temperature levels and the number of pulses, and by intrinsic factors of the treated food such as food composition and the physiological states of microorganisms (Smelt *et al.* 2002). Some photographs of pilot high pressure equipment located at the “Katholieke Universiteit of Leuven” are shown in Figure n° 10.



**Figure n° 10.** HPP equipment located at the Katholieke Universiteit of Leuven.



Some advantages of using HPP are:

- (i) HPP is not dependent of size and shape of the food.
- (ii) HPP is independent of time/mass, i.e., it acts instantaneously thus reducing the processing time.
- (iii) It does not break covalent bonds; therefore, the development of flavours alien to the products is prevented, maintaining the natural flavour of the products.
- (iv) It can be applied at room temperature thus reducing the amount of thermal energy needed for food products during conventional processing.
- (v) Since high pressure processing is isostatic (uniform throughout the food) the food is preserved evenly throughout without any particles escaping the treatment.
- (vi) The process is environment friendly since it requires only electric energy and there are no waste products.

However, there are some limitations of HPP such as:

- (i) Food enzymes and bacterial spores are very resistant to pressure and require very high pressure for their inactivation or a combination with heat (HPS).
- (ii) The residual enzyme activity and dissolved oxygen results in enzymatic and oxidative degradation of certain food components.
- (iii) Most of the pressure-processed foods need low temperature storage and distribution to retain their sensory and nutritional qualities.

Investigation of effects of HPP on food and microorganisms began in 1899 where it was used to increase the shelf life of milk (Hite, 1899). In the 80's, the Japanese industry supported by the Ministry of Agriculture, was the first one to use HPP in the food industry. In 1992, the first HPP-treated product was commercialized and at the end on 1995, seven different companies commercialized HPP-treated products such as jam, fruit juices and rice cake. The interest of this technology was extended to Europe and USA and nowadays,

HPP-treated products are being commercialized in different parts of the world (Table n° 10).

**Table n° 10.** HPP treated products commercialized in recent years.

PRODUCT	COUNTRY	COMPANY	TREATMENT
Fruit products	Japan	Meidi-Ya	400 MPa/10-30 min/20°C
Mandarin juice	Japan	Wakayama Food Int.	300-400 MPa/2-3 min/20°C
Fruit juices	Japan	Takansi	unknown
	France	Pampryl	400 MPa/20°C
	Portugal	Frucalba	unknown
	USA	Odwalla	unknown
Orange juice	Japan	Pon	Unknown
	U.K.	Orchard House Foods	500 MPa/20°C
	Italia	Ortogel	Unknown
	Mexico	Jumex	Unknown
Rice products	Japan	Echigo Seika	400-600 MPa/10 min/45-70°C
Sake	Japan	Chiyonosono	Unknown
Guacamole	USA	Avomex	700 MPa/10-15 min/20°C
Cured ham	Japan	Fuji Chiku Mutterham	250 MPa/3h/20°C
Meat products	Spain	Esteban Espuña S.A	400-500 MPa/20°C
	Spain	Campofrío Alimentación S.A	Unknown
Roast beef	Japan	Itoh Ham Corp	Unknown
Fish products	Japan	Yaizu Fisheries	400 MPa
Oysters	USA	Motivatit, Nisbet Oyster Co.	300-400 MPa/10 min/20°C

A commercial scale equipment is available from Avure Technologies (Kent, WA, USA) which have a capacity of 215-liter. A 215-liter batch system is able to produce about 10 million pounds of food per year. The price of this commercial scale, high-pressure vessel is around 500.000\$ to 2.5\$ million dollars depending upon equipment capacity and extent of automation. As a new processing technology with a limited market, pressure-processed products may cost 3 to 10 cents per pound more to produce than thermally processed products. High throughput is accomplished by using multiple pressure vessels. Nowadays, the demand of HPP equipments is growing with a consequent decrease in its prices.

---

## 1.5. REFERENCES

- ABRAM, F., Smelt, J.P.P.M., Bos, R. W., Wouters, P.C. **2003**. "Modeling and optimization of inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric field treatment". *Journal of Applied Microbiology*, 94, 571-579.
- AGUDO, A., Cabrera, L., Amiano, P., Ardanaz, E., Barricarte, A., Berenguer, T., Chirlaque, M.D. *et al.* **2007**. "Fruit and vegetable intakes, dietary antioxidant nutrient, and total mortality in Spanish adults: findings from the Spanish cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Spain)". *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 1634-1642.
- ÁLVAREZ, I., Pagan, R., Condon, S., Raso, J. **2003**. "The influence of process parameters for the inactivation of *L. monocytogenes* by pulsed electric fields". *International Journal of Food Microbiology*, 87, 87-95.
- ANDERSON, P., Lukey, P.T. **1987**. A biological role for ascorbate in the selective neutralization of extracellular phagocyte-derived oxidants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 489:229-247.
- 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.
- ASTLEY, S.B., Elliott, R.M., Archer, D.B., Southon, S. **2004**. "Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes". *British Journal of Nutrition*, 91, 63-72.
- AYHAN, Z., Zhang, Q.H., Min, D.B. **2002**. "Effects of pulsed electric field processing and storage on the quality and stability of single-strength orange juice". *Journal of Food Protection*, 65, 1623-1627.
- BALNY, C., Mozhaev, V.V., Lange, R. **1997**. "Hydrostatic pressure and proteins: Basic concepts and new data". *Comparative Biochemistry and Physiology*, 11, 299-304.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., Góngora-Nieto, M.M, Pothakamury, U.R., Swanson, B.G. **1999**. "Preservation of foods with pulsed electric fields". London: Academic Press.
- BARBOSA-CÁNOVAS, G.V., Palou, E., Pothakamury, U.R., Swason, B.G. **1998**. "Nonthermal preservation of foods", pp. 9-20. 53-110, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- BARÓ, L., Fonollá, J., Peña J.L., Martínez-Férez, A, Lucena, A., Jiménez, J., Boza, J.J., López-Huertas, E. **2003**. "N-3 fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans". *Clinical Nutrition*, 22, 175-182.
- BEATTIE J.M., Lewis, F.C., **1925**. "The electric current (apart from the heat generated). A bacteriological agent in the sterilization of milk and other fluids". *Journal of Hygiene*, 24, 123-137.
- BELLO, J. **2000**. "Ciencia Bromatológica. Principios Generales de los Alimentos". Editorial Díaz de Santos, S. A.

- BENDICHO, S., Espachs, A., Arántegui, J., Martín, O. **2002**. "Effects of high pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk". *Journal of Dairy Research*, 69, 113-123.
- BIELSKI, B.H., Richter, H.W., Chan, P.C. 1975. "Some properties of the ascorbate free radical". *Annals of New York Academic Science*, 258, 231-237.
- BLACK, E.P., Setlow, P., Hocking, A.D., Stewart, C.M., Kelly, A., Hoover, D. **2007**. "Response of spores to high-pressure processing". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, 103-119.
- 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 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.
- BONJOUR, J.P. **2005**. "Dietary protein: An essential nutrient for bone health". *Journal of the American College of Nutrition*, 24, 526S-536S.
- BOYKO, N. I., Tur, A. N., Evdoshenko, L. S., Zarochentsev, A. I., Ivanov, V. M. **1998**. "A high-voltage pulse generator with mean power up to 50kW for the treatment of foodstuffs". *Instruments and Experimental Techniques*, 41, 111-117.
- BRAAKMAN, L. **2003**. "Breakthrough in Pasteurisation - Pulsed Electric Fields". *Food Engineering and Ingredients*, 34-38.
- BRADDOCK, R.J. **1999**. "Single strength orange juices and concentrate". In J. Wiley (Ed.), *Handbook of Citrus by-products and Processing Technology*. New York., pp. 53-83.
- BRANDT K., Christensen L. P., Hansen-Moller J., Hansen S. L., Haraldsdottir J., Jespersen L., *et al.* **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.
- BRODY, T. **1999**. "Nutritional Biochemistry". 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press.
- 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.
- BUTZ, P., Serfert, Y., Fernández-García, A., Dieterich, S., Lindauer, R., Bognar, A., *et al.* **2004**. "Influence of high-pressure treatment at 25°C and 80°C on folates in orange juice and model media". *Journal of Food Science*, 69, 117-121.
- 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, 31-39.
- CALLIGARIS, S., Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C. **2004**. "Effect of heat treatment on the antioxidant and prooxidant activity of milk". *International Dairy Journal*, 14, 421-427.

- CERVATO G., Cazzola, R., Cestaro, B. **1999**. Studies on the antioxidant activity of caseins. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 50, 291-296.
- CHEFTEL, C. **1995**. "Review: High pressure, microbial inactivation and food preservation". *Food Science and Technology International*, 1, 75-90.
- 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, 1315-1320.
- CHEN, J., Lindmark-Mansson, H., Gorton L., Akesson, B. **2003**. "Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods". *International Dairy Journal*, 13, 927-935.
- CHIVA, H., Uehara, M., Wu, J., Wang, X., Masuyama, R., Suzuki, K., Kanazawa, K., Ishimi, Y. **2003**. "Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice". *Journal of Nutrition*, 133, 1892-1897.
- CIESLIK, E., Gregda, A., Adamus, W. **2006**. Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chemistry*, 94, 135-142.
- CLARK, P. **2006**. "Pulsed Electric Field Processing". *Food Technology*, 60, 66-67.
- COOK, R. **2003**. "Globalization and fresh produce marketing; challenges and opportunities". University of California, Davis. Mintel. Beverages. Vol II, The Marketplace- US.
- 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.
- CORTÉS, C., Esteve, M.J., Rodrigo, D., Torregrosa, F., Frígola, A. **2006**. "Changes of colour and carotenoids contents during high intensity pulsed electric field treatment in orange juices". *Food and Chemical Toxicology*, 1932-1939.
- CORTÉS, C., Esteve, M.J., Frígola, A. **2008**. "Color of orange juice treated by High Intensity Pulsed Electric Fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice". *Food Control*, 19, 151-158.
- COSTER, H.G., Zimmermann, U. **1975**. "The mechanism of electric breakdown in the membranes of *Valonia utricularis*". *Journal of Membrane Biology*, 22, 73-90.
- CSERHALMI, Zs., Sass-Kiss, A., Toth-Markus, M., Lechner, N. **2006**. Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 49-54.
- DE RIGAL, D., Gaillard, F., Richard-Forget, F. **2000**. "Changes in the carotenoid content of apricot (*Prunus armeniaca*, var Bergeron) during enzymatic browning:  $\beta$ -carotene inhibition of chlorogenic acid degradation". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 763-768.
- DREWNOSKI, A. **2005**. "Concept of a nutritious food: Towards a nutrient density score". *American Journal of Clinical Nutrition*, 82, 721-732.
- EDELENBOS, M., Christensen, L.P., Grevsen, K. **2001**. "HPLC determination of chlorophyll and carotenoid pigments in processed green pea cultivars (*Pisum sativum* L.)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4768-4774.

- ÉLEZ-MARTÍNEZ, P., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. **2006**. "Comparative study on shelf life of orange juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat treatment". *European Food Research and Technology*, 222, 321-329.
- ÉLEZ-MARTÍNEZ, P., Martín-Belloso, O. **2007**. Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, 102, 201-209.
- 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., 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
- EVRENDILEK, G. A., Zhang, Q. H. **2003**. "Effects of pH, temperature, and pre-pulsed electric field treatment on pulsed electric field and heat inactivation of *Escherichia coli* O157:H7". *Journal of Food Protection*, 66, 755-759.
- FAO/ WHO Joint Expert Consultation. **1988**. "Requirements of vitamin A, iron, folate and vitamin B<sub>12</sub>".
- FDA (Food and Drug Administration). **2003**. Genesis Warning Letter. Bothell, USA.
- FERNANDEZ-GARCIA, A., Butz, P., Tauscher, B. **2001**. Effects of high-pressure processing on carotenoid extractability, antioxidant activity, glucose diffusion, and water binding of tomato puree (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of Food Science*, 66, 1033-1038.
- FETTERMAN, J.C **1928**. "The electrical conductivity method of processing milk". *Agricultural Engineering*, 9, 107.
- FIALA, A., Wouters, P. C., van den Bosch, E. and Creyghton, Y. L. M. **2001**. "Coupled electrical-fluid model of pulsed electric field treatment in a model food system". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2, 229-238.
- FLOURY, J., Grosset, N., Leconte, N., Pasco, M., Madec, M.N., Jeantet, R. 2006. Continuous raw skim milk processing by pulsed electric field at non-lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *Lait*, 86, 43-57.
- FORD, J.E., Porter, J.W.G., Thompson, S.W., Toothill, J., Edward-Webb, J. **1969**. "Effects of ultra-high-temperature (UHT) processing and of subsequent storage on the vitamin content of milk". *Journal of Dairy Research*, 36, 447-454.
- 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.
- GALATI, G., Teng, S., Moridani, M.Y., Chan, T.S., O'Brien, P.G. **2000**. "Cancer chemoprevention and apoptosis mechanisms induced by dietary polyphenolics". *Drug and Metabolism Drug Interaction*, 17, 311-349.
- GANDINI, S., Merzenich, H., Robertson, C., Boyle, P. **2000**. "Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients". *European Journal Cancer*, 36, 636-646.
- GARCÍA-CLOSAS, R., Berenguer, A., Tormo, M.J., Sánchez, M.J., Quirós, J.R., Navarro, C., Arnaud, R., Dorronsoro, M., Chirlaque, M.D., Barricarte, A., Ardanaz, E.,

- Amiano, P., Martínez, C., Agudo, A., González, C.A. **2004**. "Dietary sources of vitamin C, vitamin E and specific carotenoids in Spain". *British Journal of Nutrition*, 91, 1005-1011.
- 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.
- GAUDREAU, M. P. J., Hawkey, T., Petry, J., Kempkes, M. **2004**. "Design considerations for pulsed electric field processing". *2nd European Pulsed Power Symposium*, Hamburg, Shaker, Aachen.
- GAUDREAU, M. P. J., Hawkey, T., Petry, J., Kempkes, M. A. **2001**. "A solid state pulsed power system for food processing". *24th Pulses Power Plasma Science Conference*, Las Vegas, USA.
- GERSHOFF, S.N. **1993**. "Vitamin C (ascorbic acid): new roles, new requirements?" *Nutrition Reviews*, 51, 313-326.
- GILLILAND, S.E., Speck, M.L. **1967**. "Mechanism of the bactericidal action produced by electrohydraulic shock". *Applied Microbiology*, 15, 1038.
- GODOY, H.T., Rodriguez-Amaya, D. B. **1994**. "Ocurrence of cis-isomers of provitamin A in Brazilian fruits". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1306-1313.
- GOFF, H. D., Hill, A. R. **1993**. *Chemistry and Physics*. In *Dairy Science and Technology Handbook. Vol 1. Principles and Properties* (Ed. Y. H. Hui) 1 pp. 182, VHC Publ., New York.
- GÓNGORA-NIETO, M. M., Pedrow, P. D., Swanson, B. G., Barbosa-Cánovas, G. V. **2003**. "Impact of air bubbles in a dielectric liquid when subjected to high electric field strengths". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 57-67.
- 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 Technologie*, 35, 375-388.
- GROSS, J. **1987**. "Carotenoids: Pigments in Fruits". Academic Press, London.
- HADDAD, G.S., Loewenstein, M. **1983**. "Effect of several heat treatments and frozen storage on thiamine, riboflavin and ascorbic acid content of milk". *Journal of Dairy Science*, 66, 1601-1606.
- HALLIWELL, B. Gutteridge, J.M. **2006**. "Free radicals in biology and medicine". 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2006.
- HEINZ, V., Álvarez, I., Angersbach, A., Knorr, D. **2002**. "Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design". *Trends in Food Science and Technology*, 12, 103-111.
- HEINZ, V., Phillips, S. T., Zenker, M., Knorr, D. **1999**. "Inactivation of *Bacillus subtilis* by high intensity pulsed electric fields under close to isothermal conditions". *Food Biotechnology*, 13, 155-168.
- HEINZ, V., Knorr, D. **2000**. "Effect of pH, ethanol addition and high hydrostatic pressure on the inactivation of *Bacillus subtilis* by pulsed electric fields". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 151-159.

- HEINZ, V., Toepfl, S., Knorr, D. **2003**. "Impact of temperature on lethality and energy efficiency of apple juice pasteurization by pulsed electric fields treatment". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 167-175.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L. **2005**. "Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 588-593.
- HERTOG, M.G., Kromhout, D., Aravinis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Fidanza, F., Giampaoli, S., *et al.* **1995**. "Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study". *Archives of Internal Medicine*, 155, 381-386.
- HIRATA, A., Murakami, Y., Shoji, M., Kadoma, Y., Fujisawa, S. **2005**. "Kinetics of radical-scavenging activity of hesperitin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression". *Anticancer research*, 25, 3367-3374.
- HITE, B.H. **1899**. "The effect of pressure on the preservation of milk". *West Virginia Agricultural Experimental Station Bulletin*, 58, 15-35.
- HO, S. and Mittal, G. S. **2000**. High voltage pulsed electrical field for liquid food pasteurization. *Food Reviews International*, 16, 395-434.
- HOLLMAN, P.C.H. **2001**. "Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?" *Journal of Science of Food and Agriculture*, 81, 842-852.
- HUANG, D., Ou, B., Prior, R.L. **2005**. "The chemistry behind antioxidant capacity assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- HÜLSHEGER, H., Potel, J., Niemann, E. G. **1983**. "Electric field effects on bacteria and yeast cells". *Radiation and Environmental Biophysics*, 22, 149-162.
- HUMPHRIES, J.M., Khachick, 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.
- HUTH, P.J., DiRienzo, D.B., Miller, G.D. **2006**. "Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health". *Journal of Dairy Science*, 89, 1207-1221.
- HUXLEY, R.R., Neil, H.A. **2003**. "The relation between dietary flavonol intake and coronary heart disease mortality: A meta-analysis of prospective cohort studies". *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 904-908.
- INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **2000**. "Vitamin C. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids". Food and Nutrition Board. Washington D.C.: National Academy Press; 95-185.
- INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **2001**. "Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc". Washington, D.C.: National Academy Press.
- 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.
- Joint FAO/WHO Expert Consultation. **2003**. "Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases". *WHO technical report series 916*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, pp. 3-108.



- KAWAGUCHI, K., Kikuchi, S., Hasunuma, R., Maruyama, H., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y. **2004**. "A citrus flavonoid hesperidin suppresses infection-induced endotoxin shock in mice". *Biology and Pharmacology Bulletin*, 27, 679-683.
- KITTS, D.D., Weiler, K. **2003**. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309-1323.
- KREUGER, F. H. **1989**. "Partial discharge detection in high voltage equipment". London: Butterworths.
- 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.
- LAVIGNE, C., Zee, J., Simard, R.E. Beliveau, B. **1989**. "Effect of processing and storage conditions on the fate of vitamins B1, B2, and C and on the shelf-life of goat's milk". *Journal of Food Science*, 54, 30-34.
- LAYMAN, D.K. **2004**. "Protein quantity and quality at levels above the RDA improves adult weight loss". *Journal of the American College of Nutrition*, 23, 631S-636S.
- LEE, H. S., Coates, G. A. **2003**. "Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments". *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, 36, 153-156.
- LI, S. Q., Zhang, Q. H., Tony, Z. J., Turek, E. J., Lau, M. H. **2005**. "Elimination of *Lactobacillus plantarum* and achievement of shelf stable model salad dressing by pilot scale pulsed electric fields combined with mild heat". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 6, 125-133.
- LINDGREN, M. **2001**. "Pulsed electric field food treatment and low frequency bioelectromagnetics". Electromagnetics Department. Gotenburg, Sweden, Chalmers University of Technology.
- LINDGREN, M., Aronsson, K., Galt, S., Ohlsson, T. **2002**. "Simulation of the temperature increase in pulsed electric field (PEF) continuous flow treatment chambers". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3, 233-245.
- LINDMARK-MÅNSSON, H., Akesson, B. **2000**. "Antioxidative factors in milk". *British Journal of Nutrition*, 84, suppl. 1, S103-S110.
- MANACH, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. **2004**. "Polyphenols: food sources and bioavailability". *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- MAÑAS, P., Barsotti, L., Cheftel, J. **2001**. "Microbial inactivation by pulsed electric fields in a batch treatment chamber: effects of some electrical parameters and food constituents". *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 239-249.
- MCDONALD, C. J., Lloyd, S. W., Vitale, M. A., Petersson, K., Innings, F. **2000**. "Effect 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.
- MCGILL, C., Wilson, A., Papanikolaou, Y. **2004**. "Health benefits of citrus fruits". In: *Beverages in Nutrition and Health*. Humana Press. Totowa, New Jersey, US, pp. 63-78.

- MCRAE, M. **2006**. "The efficacy of vitamin C supplementation on reducing total serum cholesterol in human subjects: a review and analysis of 51 experimental trials". *Journal of Chiropractic Medicine*, 5, 2-12.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A., Vicario, I.M., Heredia, F.J. **2007**. "Review: Analysis of carotenoids in orange juice". *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 638-649.
- 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.
- MEYER, R.S. **2000**. "Ultra high pressure high temperatura food preservation process". US Patent, 6, 017, 572.
- MEYER, R.S., Cooper, K.L., Knorr, D., Lelieveld, H.L.M. **2000**. "High pressure sterilization of foods". *Food Technology*, 54, 3352-3357.
- MICHAELIDOU, A. Steijns, J. **2006**. "Nutritional and technological aspects of minor bioactive components in milk whey: Growth factors, vitamins and nucleotides". *International Dairy Journal*, 16, 1421-1426.
- MIDDLETON, E., Kandaswami, C., Theoharides, TC. **2000**. "The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer". *Pharmacology Review*, 52, 673-751.
- MILLER, G.D., Jarvis, J.K., McBean, L.D. **2007**. "Contribution of dairy foods to health throughout the life cycle". In Handbook of dairy foods and nutrition (3<sup>rd</sup> ed). Boca Raton, Florence, USA. CRC Press, pp. 339-399.
- MIN, S., Jin, Z.T., Min, S.K., Yeom, H., Zhang, Q.H. **2003**. "Commercial-scale pulsed electric field processing of orange juice". *Journal of Food Science*, 68, 1265-1271.
- MIN, S., Reina L., Zhang, H. **2002**. "Aqua activity and the inactivation of *Enterobacter cloacae* inoculated in chocolate liquor and a model system by pulsed electric field treatment". *Journal of Food Processing and Preservation*, 26, 323-337.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA M. I. **1997**. "Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos". Sevilla: Universidad de Sevilla. Serie: Ciencias, 47.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA M.I., Hornero-Mendez D, Perez-Galvez A. **2002**. "Carotenoids and provitamin A in functional foods". In: Hurst WJ, editor. Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals. Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press. pp. 101-57.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) of Spain. **2003**. "Spain total citric transformation". 2002-2003 campaign.
- MORENO (de) le Blanc (de), A., Chaves, S., Carmuega, E., Weill, R., Antóine, J., Perdígón, G. **2008**. "Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages". *Inmunobiology*, 213, 97-108.
- MOTTAR, J., Naudts, M. **1979**. "Quality of UHT milk compared with pasteurised and in-bottle sterilised milks". *Lait*, 56, 476.
- ODRIOZOLA-SERRANO, I., Bendicho-Porta, S., Martín-Belloso, O. **2006**. "Comparative study on shelf life of whole milk processed by high-intensity pulsed electric field or heat treatment". *Journal of Dairy Science*, 89, 905-911.

- ÖHRVIK, V., Witthöft, C. **2008**. "Orange juice is a good folate source in respect to folate content and stability during storage and simulated digestion". *European Journal of Nutrition*, 47, 92-98.
- OHTSUKI, K., Abe, A., Mitsuzumi, H., Kondo, M., Uemura, K., Iwasaki, Y., Kondo, Y. **2003**. "Glucosyl hesperidin improves serum cholesterol composition and inhibits hypertrophy in vasculature". *Journal of Nutrition and Science Vitaminology*, 46, 447-450.
- 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.
- PADAYATTY, S.J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S., Levine, M. **2003**. "Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention". *Journal of the American College of Nutrition*, 22, 18-35.
- PENN C. **2005**. 5<sup>th</sup> annual new products survey. Part 1. *Stagnito's New Products Magazine*, January, 38-44.
- PENNY, J.R., Zilva, S.S. **1945**. *Biochemistry Journal*, 39, 1.
- PÉREZ, O.E., Pilosof, A.M.R. **2004**. "Pulsed electric effects on the molecular structure and gelation of  $\beta$ -lactoglobulin concentrate and egg white". *Food Research International*, 37, 102-110.
- PLANA, N., Nicolle, C., Ferre, R., Camps, J., Cos, R., Villoria, J., Masana, L. **2008**. "Plant-sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects". *European Journal of Nutrition*, 47, 32-39.
- PLATT, B.S., Eddy, T.P., Pellet, P.L. **1963**. "Food in Hospitals". Anonymous. Nuffield Provincial Hospitals Trust and Oxford University Press, London.
- PLAZA, L., Sánchez-Moreno, C., Élez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., Cano, M.P. **2006**. "Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity of orange juice processed by high-pressure or pulsed electric fields with regard to low pasteurization". *European Food Research and Technology*, 223, 487-493.
- 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.
- POLYDERA, A.C., Galanou, E., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. **2004**. "Inactivation Kinetics of pectin methylsterase of greek Navel orange juice as a function of high hydrostatic pressure and temperature process conditions". *Journal of Food Engineering*, 62, 291-298.
- PRIOR, R.L., Wu, X., Schaich, K. **2005**. "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- 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 data base survey". *Medical Hypotheses*, 54, 254-262.
- PROTEGGENTE, A.R., Pannala, A.S., Paganga, G., van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., van de Put, F. et al. **2002**. "The antioxidant activity of regularly

- consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition". *Free Radical Research*, 36, 217-233.
- PSZCZOLA, D.E. **2005**. "Ingredients, Making fortification". *Food Technology*, 59, 44-61.
- PULIDO, R., Hernández-García, M., Saura-Calixto, F. **2003**. "Contribution of beverages to the intake of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the Spanish diet". *European Journal of Clinical Nutrition*, 57, 1275–1282.
- QIU, X., Sharma, S., Tuhela, L., Jia, M., Zhang, Q.H. **1998**. "An integrated PEF pilot plant for continuous nonthermal pasteurization of fresh orange juice". *Transactions of the American Society of Agricultural Engineers*, 41, 1069-1074.
- RAMESH, M.N. **2007**. "Pasteurization and Food Preservation". In Handbook of food preservation. Ed. Shafiur Rahman, CRC Press, pp.571-584
- RECHCIGL, M. **1982**. "Food for humans use". In Handbook of nutritive value of processed food (Volumen I). CRC Series in Nutrition and Food.
- RICE-EVANS, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. **1996**. "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids". *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933-956.
- RIVAS, A., Rodrigo, D., Company, B., Sampedro, F., Rodrigo, M. **2007**. "Effects of pulsed electric fields on agua-soluble vitamins and ACE inhibitory peptides added to a mixed orange juice and milk beverage". *Food Chemistry*, 104, 1550-1559.
- RIVAS, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Rodrigo, M. **2006**. "Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice". *LWT- Food Science and Technology*, 39, 1163-1170.
- RODRIGO, C., Rodrigo, M., Fiszman, S.M. **1997**. "The impact of high temperature, short time thermal treatment on texture and weight loss of green asparagus". *Zeitschrift fuer Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung A*, 205, 53–58.
- RODRIGO, D., Cortés, C., Clynen, E., Schoofs, L., Van Loey, A., Hendrickx, M. **2006**. "Thermal and high pressure stability of purified Polygalacturonase and Pectinmethylesterase from four different tomato processing varieties". *Food Research International*, 39, 440-448.
- SALE, A.J.H., Hamilton, W.A. **1967**. "Effect of high electric fields on microorganisms. I. Killing of bacteria and yeast". *Biochemistry and Biophysics Acta*, 148, 781.
- SAMPEDRO, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Rodrigo, M. **2007**. "Pulsed electric fields inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice- milk based beverages: Effects of process parameters". *Journal of Food Engineering*, 80, 931-938.
- 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.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. **2006**. "Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity". *Food Chemistry*, 98, 749-756.

- SÁNCHEZ-MORENO, C., Plaza, L., Élez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., Cano, M.P. **2005**. Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Food Protection*, 67, 2596-2602.
- SANCHO, F., Lambert, Y., Demazeau, G., Largeteau, A., Bouvier, J.M., Narbonne, J.F. **1999**. "Effect of ultra-high hydrostatic pressure on hydrosoluble vitamins". *Journal of Food Engineering*, 39, 247-253.
- SCHAAFSSMA, G. **2006a**. "Health issues of whey proteins: 1. Protection of lean body mass". *Current Topics in Nutraceutical Research*, 4, 113-122.
- SCHAAFSSMA, G. **2006b**. "Health issues of whey proteins: 2. Weight managements". *Current Topics in Nutraceutical Research*, 4, 123-126.
- 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.
- SEMBA, R.D. **2001**. "Impact of vitamin A on immunity and infection in developing countries". In: Bendich, A., Decklebaum, R.J., eds. *Preventive Nutrition: The Comprehensive Guide for Health Professionals*. 2<sup>nd</sup> ed. Totowa: Humana Press Inc., pp. 329-346.
- SERRANO, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. **2007**. "Food antioxidant capacity determined by chemical methods may underestimate the physiological antioxidant capacity". *Food Research International*, 40, 15-21.
- SHARMA, R. **2005**. "Market trends and opportunities for functional dairy beverages". *Australian Journal of Dairy Technology*, 60, 196-199.
- SHUKLA, F.C., Sharma, A., Singh, B. **2003**. "Studies on the development of beverages using fruit juice/ pulp, separated milk and reconstituted milk". *International Journal of Dairy Technology*, 56, 243-246.
- 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.
- SITZMANN, W. **1995**. "High voltage pulse techniques for food preservation". *New Methods of Food Preservation* (G.W. Gould, ed.), Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall, New York, p. 236.
- 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.
- SMELT, J.P., Hellemons, J.C., Patterson, M. **2002**. "Effects of high pressure on vegetative microorganisms". In M. Hendrickx and D. Knorr (Eds.) *Ultra high pressure treatments of foods*. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp. 55-76.
- STANLEY, D. W. **1991**. "Biological membrane deterioration and associated quality losses in food tissues". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. F. M. Clydesdale. New York, CRC Press.
- STEIJNS, J.M. **2000**. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *British Journal of Nutrition*, 84, S11-S17.

- STEIJNS, J.M. **2008**. "Dairy products and health: focus on their constituents or on the matrix?" *International Dairy Journal*, 18, 425-435.
- STRAUB, O. **1987**. "Key to carotenoids". 2nd Edition. Edited by: Pfander H., Gerspacher M., Rychener M. & Schwabe R., Birkhäuser Verlag, Basel, Boston.
- SUETSUNA, K., Ukeda, H., Occhi, H. **2000**. Isolation and characterisation of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128-131.
- TAUSCHER, B. **1995**. "Pasteurization of food by hydrostatic high pressure: chemical aspects". *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 200, 3-13.
- TOEPFL, S., Mathys, A., Heinz, V., Knorr, D. **2006**. "Review: potential of high hydrostatic pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friendly food processing". *Food Reviews International*, 22, 405-423.
- 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.
- TORREGROSA, F., Cortés, C., Esteve, M.J., Frígola, A. **2005**. "Effect of High-intensity pulsed electric fields processing and conventional heat treatment on orange-carrot juice carotenoids". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9519-9525.
- TORREGROSA, F., Esteve, M.J., Frígola, A., Cortés, C. **2006**. "Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice". *Journal of Food Engineering*, 73, 339-345.
- TSONG, T.Y. **1990**. "On electroporation of cell membranes and some related phenomena". *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 24, 271-295.
- UNDERWOOD, B.A., Arthur, P. **1996**. "The contribution of vitamin A to public health". *FASEB Journal*, 10, 1040-1048.
- VACLAVIK, V. A. **1998**. "Essentials of Food Science". Editorial Chapman & Hall.
- VAN DER BROECK, I., Ludikhuyze, L., Weemaes, C., Van Loey, A., Hendrickx, M. **1998**. "Kinetics for isobaric-isothermal degradation of L-ascorbic acid". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 2001-2006.
- VAN EEKELLEN, M., Heijne, J.J.L.G. **1965**. "Nutritive value of sterilised milk". *Food Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, Italy, 33-41.
- VAN SCHEPDAEL, L.J.M.M., De Heij, W.B.C., Hoogland, H. **2002**. "Method for high pressure preservation". European Patent WO 02/45528.
- VEGA-MERCADO, H., Pothakamury, U.R., Chang, F., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. **1996**. "Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles". *Food Research International*, 29, 117-121.
- WALLACE, J.M.W., McCabe, A.J., Robson, P.J., Keogh, M.K., Murray, C.A., Kelly, P.M., Marquez-Ruiz, G., McClynn, H., Gilmore, W.S., Strain, J.J. **2000**. "Bioavailability of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in foods enriched with microencapsulated fish oil". *Annals of Nutrition and Metabolism*, 44, 157-162.
- WALSTRA, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. **2004**. "Dairy Science and Technology". Ed. CRC. New York.

- 
- WALSTRA, P., Geurts, T.J, Normen, A., Jellema, A., Van Boekelm M. **1999**. "Dairy Technology". Marcel Dekker, Inc. New York,
- WEAVER, J.C., Harrison, G.I., Bliss, J.G., Mourant, J.R., Powell, K.T. **1988**. "Electroporation: high frequency of occurrence of a transient high-permeability state in erythrocytes and intact yeast". *FEBS Letters*, 229, 30-34.
- WEGRZYN, T.F., Farr, J.M., Hunter, D.C., Au, J., Wohlers, M.W. **2008**. "Stability of antioxidants in an apple polyphenol-milk model system". *Food Chemistry*, 109, 310-318.
- WILSON, M.J., Baker, R. **2000**. "High pressure/ultra-high pressure sterilization of foods". US Patent, 6, 207, 215.
- WOUTERS, P.C., Alvarez, I., Raso, J. **2001**. "Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric fields food processing". *Trends in Food Science and Technology*, 12, 112-121.
- WU, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. **2004**. "Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.
- YEOM, H.W., Streaker, C.B., Zhang, Q.H., Min, D.B. **2000**. "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.
- ZHANG, L.X., Chang, F.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. **1994**. "Inactivation of microorganisms in a semisolid model food using high voltage pulsed electric fields". *LWT- Food Science and Technology*, 27, 538-543.
- ZIMMERMANN, U. **1986**. "Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion". *Reviews on Physiological Biochemical Pharmacology*, 105, 175–256.
- ZIMMERMANN, U. **1996**. "The effect of high intensity electric field pulses on eukaryotic cell membranes: fundamentals and applications". *Electromanipulation of cells*. U. Zimmermann and G.A. Neil. Boca Raton, CRC Press, pp. 1-106.





## **2. OBJETIVOS**

---

### **OBJECTIVES**



## 2. OBJETIVOS.

El aumento de la demanda por parte de los consumidores de alimentos seguros, procesados, y cuya preparación ocupe el menor tiempo posible, ha llevado a la industria alimentaria a aumentar la producción de este tipo de productos. Para ello, se requiere la valoración y seguimiento de aquellos parámetros microbiológicos y nutricionales que directa o indirectamente pueden afectar a la salud de los consumidores y de aquellos otros que pueden afectar a la calidad de los alimentos elaborados.

El **objetivo general** de la presente investigación es estudiar la posible variación de diferentes parámetros nutritivos y de calidad en una bebida de zumo de naranja y leche tratada por una tecnología no térmica, los pulsos eléctricos de alta intensidad, comparándola con las variaciones producidas cuando se aplica un tratamiento térmico convencional (pasterización) y estudiando su comportamiento durante el almacenamiento en refrigeración.

Para alcanzar este objetivo general se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

- Caracterización nutricional y físico-química de bebidas de zumo de fruta/s y leche comerciales.
- Optimización de la preparación de una bebida de zumo de naranja y leche.
- Puesta a punto y validación de los diversos métodos de análisis.
- Evaluación del efecto del tratamiento por PEAI (a distintos campos y tiempos) sobre determinados parámetros nutritivos (vitamina C, carotenoides, vitamina A, fenoles solubles totales, capacidad antioxidante y perfil de ácidos grasos) y de calidad (pH, °Brix y color) en la bebida de zumo de naranja y leche.
- Evolución de las características nutricionales y físico-químicas de la bebida de zumo y leche tratada por PEAI y pasterización durante su almacenamiento a 4 y 10°C.



# **3. PLAN DE TRABAJO**

---

**WORK PLAN**



### 3. PLAN DE TRABAJO

Para la consecución de los objetivos planteados se propone un plan de trabajo (Figura nº 11) que consta de las siguientes fases.

**1. Caracterización nutricional y físico-química de bebidas a base de zumo de fruta y leche comerciales.** Con objeto de conocer la composición nutricional de este tipo de bebidas presentes en el mercado, se analizan una serie de parámetros nutricionales y de calidad. El contenido de vitamina C se determina mediante un método polarográfico. El perfil y concentración de carotenoides se determina mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). El análisis de compuestos fenólicos totales se realiza por espectrofotometría, aplicando el método de Folin-Ciocalteu. La capacidad antioxidante total se evalúa por el método TEAC utilizado en trabajos previos. Los parámetros físico-químicos pH, °Brix y densidad se determinan con los métodos oficiales de análisis, mientras el color se determina por colorimetría. Este último, es un parámetro de especial importancia por su influencia en la elección del producto por parte de los consumidores.

**2. Optimización y puesta a punto del método de preparación de una bebida a base de zumo de naranja y leche desnatada.** La muestra objeto de estudio es una bebida a base de zumo de naranja y leche (50:20, v/v), que se prepara directamente en el laboratorio. Para conseguir preservar la mayor cantidad de nutrientes y compuestos antioxidantes naturales, se realizan una serie de pruebas encaminadas a conseguir la mayor estabilidad de los mismos durante la preparación de la bebida. Entre los diferentes nutrientes presentes en la bebida, el ácido ascórbico es el más lábil y se toma como indicador de la correcta preparación. Tras la optimización de la elaboración de la bebida se analiza el perfil nutricional y las características físico-químicas del producto.

**3. Efecto del tratamiento por diferentes técnicas de conservación en la composición físico-química, nutricional y capacidad antioxidante total de la bebida de zumo de naranja y leche.** Con objeto de analizar los efectos de la nueva tecnología no térmica, pulsos eléctricos de alta intensidad

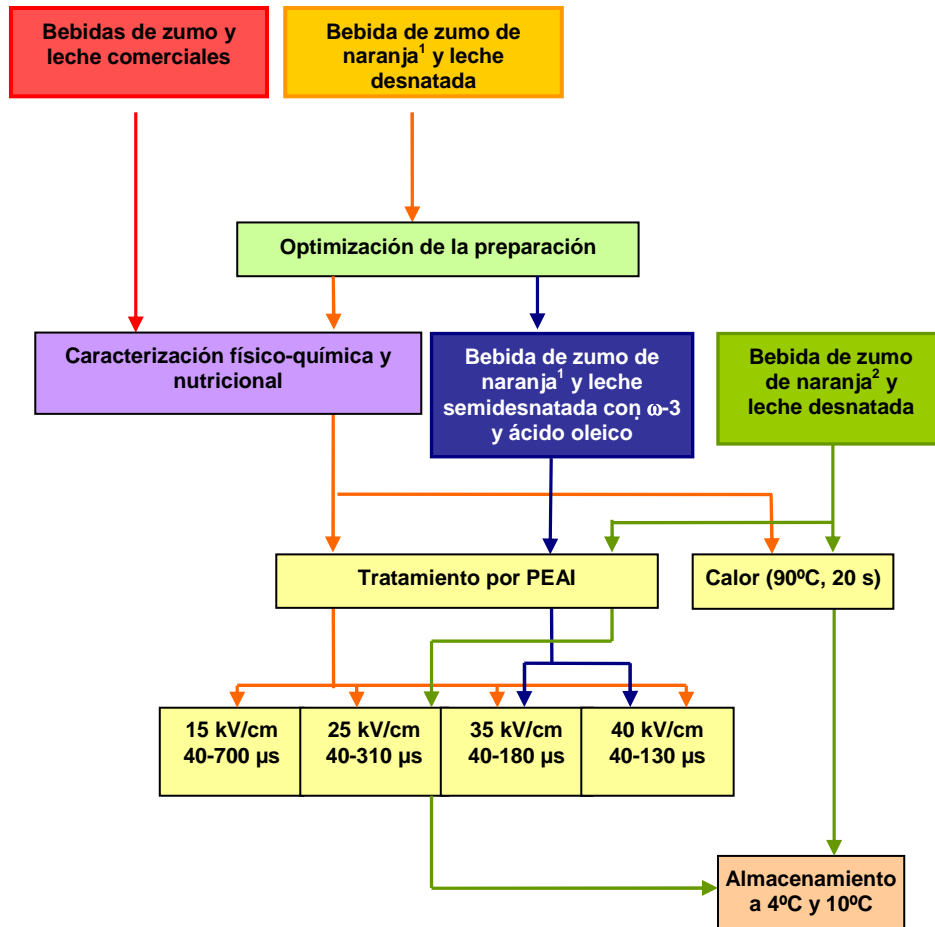
(PEAI), y evaluar el uso alternativo de la misma frente a los tratamientos tradicionales por calor (pasterización), se evalúa el efecto de ambos tratamientos sobre los parámetros nutricionales (vitamina C, vitamina A, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante total) y físico-químicos (pH, °Brix y color).

**4. Influencia del tratamiento por PEAJ sobre el perfil de ácidos grasos de una bebida de zumo de naranja y leche enriquecida con ácidos omega-3 y oleico.** Entre los alimentos funcionales de mayor consumo se encuentran aquellas bebidas enriquecidas con ácidos grasos omega-3 y oleico debido a las deficiencias encontradas en la población. A pesar de que diversos estudios muestran que el calor no afecta prácticamente a la concentración de ácidos grasos en los alimentos, no existen estudios sobre el efecto de los PEAJ sobre los mismos. Por ello, se prepara la bebida de zumo de naranja y leche, utilizando una leche enriquecida con estos ácidos grasos y se evalúa el impacto del tratamiento por la nueva tecnología no térmica sobre el perfil en ácidos grasos de la misma. Paralelamente se determinan diversos parámetros físico-químicos: pH, °Brix, densidad, hidroximetilfurfural e índice de peróxidos así como contenido total de grasa.

**5. Puesta a punto de dos métodos para la determinación de la capacidad antioxidante en leche y bebidas de zumo de naranja y leche.** Debido a la falta de métodos oficiales para la determinación de la capacidad antioxidante total, a las enormes discrepancias halladas en la literatura para comparar resultados, y a los problemas encontrados en etapas previas para la determinación de dicho parámetro, se realizó una estancia de tres meses en el Departamento de “Medicina Interna, Sezione di Biochimica Applicata e Science Della Nutrizione” de la Università di Perugia (Italia) que permitió el aprendizaje del método ORAC aplicado a diversas matrices. Posteriormente, se contrastó la idoneidad de los métodos TEAC y ORAC para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de zumo y leche en los laboratorios del área de Nutrición y Bromatología.



**6. Variación de la composición nutricional, capacidad antioxidante total y parámetros físico-químicos durante el almacenamiento en refrigeración de la bebida de zumo de naranja y leche.** Para finalizar, se evalúa la variación del perfil nutricional y físico-químico del producto tratado por PEAI y pasterización durante su almacenamiento a 4 y 10°C con objeto de determinar la vida útil de la bebida. Los parámetros físico-químicos analizados son pH, °Brix, densidad, hidroximetilfurfural, índice de turbidez y color. Los parámetros nutricionales evaluados son vitamina C, vitamina A y carotenoides, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante total, esta última determinada tanto por el método TEAC como ORAC.



1: zumo de naranja procedente de la industria, 2: zumo de naranja recién exprimido (variedad Navel)

Figura nº 11. Plan de trabajo desarrollado.

# **4. PARTE EXPERIMENTAL**

---

## **EXPERIMENTAL SECTION**



# **CAPÍTULO 1. Caracterización físico-química y nutricional de bebidas de zumo y leche del mercado.**

## **1.1. INTRODUCCION**

Previamente a la elaboración de la bebida de zumo de naranja y leche objeto de estudio de la presente tesis, se realiza un análisis de mercado de las diferentes marcas comerciales de bebidas a base de zumo de fruta/s y leche para conocer las características de los productos que actualmente se encuentran a disposición de los consumidores. Los análisis están encaminados a determinar el perfil nutricional de estos alimentos así como a conocer las posibles diferencias entre muestras según el porcentaje y la composición de fruta y leche.

## **1.2. MATERIAL Y METODOS**

### **1.2.1. Muestras**

La muestra se compone de dos lotes distintos de diecisete bebidas de zumo de fruta y leche (Cuadro nº 11) procedentes de 5 fabricantes distintos (A, B, C, D y E). Todas ellas se comercializan en envases de Tetra-Brick®. Once de las bebidas se comercializan a temperatura ambiente ( $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por haber sido sometidas a tratamiento UHT y poseen una vida media de 12 meses y, seis de ellas se comercializan a temperatura de refrigeración ( $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) al estar pasterizadas y, poseen una vida media de 2 meses, según se indica en la etiqueta.

Todas las bebidas se encuentran dentro de su periodo de vida útil y se establece como criterio, la realización de los análisis a mitad de dicho periodo.

**Cuadro nº 11.** Composición de las bebidas de zumo y leche del mercado.

	<b>Composición</b>	<b>Zumo de frutas</b>
1A*	Zumo 25%, Leche 20% Agua, azúcar, calcio, estabilizante (pectina), acidulante (ácido cítrico, vitamina C, aromas y vitamina A)	Naranja y piña
2A*	Zumo 25%, Leche desnatada 20% Agua, azúcar, calcio, estabilizante (pectina), acidulante (ácido cítrico, vitamina C, aromas y vitamina A)	Naranja y mango
3A*	Zumo 25%, Leche desnatada 20% Agua, azúcar, calcio, estabilizante (pectina), acidulante (ácido cítrico, vitamina C, aromas, y vitamina A), colorante (rojo allura)	Fresa, plátano y naranja
4A*	Zumo 25%, Leche desnatada 20% Agua, azúcar, calcio, estabilizante (pectina), acidulante (ácido cítrico, vitamina C, aromas, y vitamina A)	Melocotón y albaricoque
5A	Zumo, Leche desnatada Azúcar, fibra, pectina, acidulante (ácido cítrico), vitaminas A, C, y E, y aromas.	Naranja, manzana, piña y limón
6A	Zumo, Leche desnatada Azúcar, fibra, pectina, acidulante (ácido cítrico), vitaminas A, C, y E, y aromas.	Melocotón, albaricoque, manzana y limón
7A	Zumo, Leche desnatada Azúcar, fibra, pectina, acidulante (ácido cítrico), vitaminas A, C, y E, y aromas.	Naranja, mango, piña y limón
8A	Zumo, Leche desnatada Azúcar, fibra, pectina, acidulante (ácido cítrico), vitaminas A, C, y E, y aromas.	Naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guava, albaricoque y papaya
9B*	Zumo 25.6%, Leche desnatada 16.5% Agua, azúcar, calcio, pectina, acidulante (ácido cítrico), vitamina C, aroma, y colorante (β-caroteno)	Melocotón y albaricoque
10B*	Zumo 25.6%, Leche desnatada 16.5% Agua, azúcar, calcio, pectina, acidulante (ácido cítrico), vitamina C, aroma, y colorante (β-caroteno)	Naranja y piña
11C	Zumo 20%, Leche 3-5%	Manzana
12C	Zumo 20%, Leche 3-5%	Mango y melocotón
13D	Zumo 33.7%, Leche desnatada Sacarosa, dextrosa, fibra (pera, soja, naranja, manzana), pectina, aromas naturales y aromas sintéticos, vitaminas A, C, y E	Naranja, zanahoria, limón, albaricoque, maracuyá, piña y acerola.
14D	Zumo 42.5%, Leche desnatada Sacarosa, dextrosa, pectina, aroma natural y sintético idéntico a los naturales, vitaminas A, C, y E, colorantes (extracto de clorofilas y curcúma)	Manzana, kiwi, naranja y lima
15D	Zumo 7%, Leche desnatada Sacarosa, dextrosa, pectina, aroma natural y sintético idéntico a los naturales, vitaminas A, C, y E, colorante (E-160a)	Mango y piña
16D	Zumo 35%, Leche desnatada Sacarosa, dextrosa, pectina, aroma natural y sintético idéntico a los naturales, vitaminas A, C, y E, colorante (E-100)	Manzana (20%), naranja (10%), plátano (5%)
17E	Zumo, Leche desnatada Aceite vegetal (rico en ácido linoleico conjugado, 0.6%), ácido cítrico, estabilizantes (E-440, E-471), edulcorantes (E-950, E-951, E-959), y aroma natural.	Naranja

A-E indica los diversos fabricantes de las bebidas de zumo de fruta y leche.

\*bebidas refrigeradas

## **1.2.2. Parámetros físico-químicos**

La determinación de los parámetros físicoquímicos en las bebidas de zumo y leche es muy importante por su elevado impacto en la evaluación sensorial.

### **1.2.2.1. pH**

El pH de un alimento es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante su procesado, almacenamiento y distribución. El bajo pH de los zumos hace que, solamente las levaduras, los mohos y las bacterias lácticas y acéticas puedan proliferar en su interior. Zemel *et al.* (1990) afirman que existe una correlación entre el pH y la estabilidad de los zumos, ya que este parámetro ejerce una influencia significativa sobre el crecimiento microbiano limitando el posible desarrollo de numerosos gérmenes patógenos. Por ello, en los zumos comerciales suelen añadirse acidulantes (ej. ácido cítrico) que provocan la disminución del pH para prolongar su conservación. Si a este parámetro se suma el efecto del tratamiento térmico a que se someten y el tipo de envasado, se pueden considerar a los zumos como productos seguros desde el punto de vista de la alteración microbiana por gérmenes patógenos (Cardona *et al.* 1992). Sin embargo, las levaduras, son capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis, son muy tolerantes a una elevada acidez (pueden crecer a valores de pH entre 2.0 y 1.5) y son capaces de degradar los ácidos orgánicos, con el consecuente aumento del pH (Arranz, 2000).

#### 1.2.2.1.1. Instrumentación y Material.

- pH-metro Crison micro pH 2001 (Crison, España).
- Agitador magnético, SBS® (SBS, España).
- Material de uso corriente en el laboratorio.

#### 1.2.2.1.2. Reactivos.

- Disoluciones amortiguadoras Crison: solución a pH 7.02 y solución a pH 4.00.

#### 1.2.2.1.3. Modo operatorio.

La determinación del pH se basa en una medición potenciométrica a 20°C. Se toman 25 mL de la muestra problema y se procede a la medida del pH. Las medidas se realizan por triplicado.

#### **1.2.2.2. °Brix**

Los grados Brix se definen como la concentración en sólidos solubles de las bebidas. En las disoluciones azucaradas, está relacionado el índice de refracción, con la densidad y con los grados Brix, ya que al aumentar la concentración del soluto aumenta la densidad y el índice de refracción.

##### 1.2.2.2.1. Instrumentación y material

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

##### 1.2.2.2.2. Modo operatorio

Se añaden un par de gotas de la muestra homogeneizada sobre el porta cuidando que se reparta la muestra uniformemente por toda la superficie de éste. Se cierra el prisma, se enfoca y se anota la medida. Posteriormente se lava el prisma con agua destilada y se seca con papel, sin frontar. Cada medida se realiza por duplicado.

#### **1.2.2.3. Densidad**

La densidad de los zumos de fruta, está relacionada directamente con la cantidad de azúcares presentes en los mismos. Una disminución de la densidad indica la posible fermentación de la bebida ocasionada por levaduras que crecen debido a un tratamiento de conservación insuficiente o a condiciones de almacenamiento del producto deficientes.



#### 1.2.2.3.1. Instrumentación y material

- Picnómetro de 50 mL.
- Material de uso corriente en el laboratorio.

#### 1.2.2.3.2. Modo operatorio

Para la determinación de la densidad de las bebidas, se sigue el método descrito en los métodos oficiales de análisis españoles (MOAE, 1988).

Se limpia y seca en estufa el picnómetro vacío y posteriormente se enfría colocándolo en un desecador. Se pesa previamente el picnómetro vacío ( $P_1$ ). A continuación, se llena el picnómetro de agua destilada hasta el enrase y, se vuelve a pesar ( $P_2$ ). Por último, el picnómetro se enjuaga con la muestra y se llena con esta hasta el enrase, teniendo especial cuidado de que no entren burbujas y, se pesa ( $P_3$ ).

La determinación de la densidad se realiza aplicando la siguiente expresión:

$$\rho \text{ (g/cm}^3\text{)} = \frac{P_3 - P_1}{P_2 - P_1} \cdot \rho_a$$

Donde  $P_1$  es el peso del picnómetro vacío,  $P_2$  es el peso del picnómetro lleno de agua,  $P_3$  es el peso del picnómetro conteniendo la muestra y  $\rho_a$  es la densidad del agua.

#### **1.2.2.4. Color**

La determinación del color de los alimentos es un parámetro de especial relevancia ya que es uno de los principales atributos que determinan la elección del alimento por parte de los consumidores (Calvo *et al.* 2001; Baker y Gunter, 2004). El color de las frutas se debe a los pigmentos localizados en los plastos, vacuolas y en el líquido citoplasmático de las células. Los pigmentos más característicos pertenecen a cuatro grandes grupos: las clorofilas, los flavonoides, las antocianinas y los carotenoides. Estos últimos son los responsables del color amarillo, naranja y rojo de las frutas. Se encuentran en

forma libre, disueltos en lípidos, como ésteres, o combinados con azúcares o proteínas y generan diferentes colores según la manera en que interaccionen.

#### 1.2.2.4.1. Instrumentación y material

- Colorímetro Hunter Labscan II (Hunter associates laboratory, INC. Reston. Virginia. USA)
- Cubeta de cuarzo.
- Programa informático Universal Software v.4.0.

#### 1.2.2.4.2. Descripción del método.

El color se mide utilizando un colorímetro conectado a un ordenador que calcula las coordenadas de color mediante el programa Universal Software v. 4.0. Los resultados se expresan de acuerdo con el sistema CIELAB con referencia a un iluminante D65 y un ángulo visual de 10°. Los parámetros que se determinan automáticamente son: L\* (luminosidad)= de negro (0) a blanco (100), a\*= color desde rojo (positivo) a verde (negativo) y b\*= color desde amarillo (positivo) a azul (negativo)

#### 1.2.2.4.3. Modo operatorio.

Se seleccionan las siguientes condiciones de lectura en el equipo:

- Rueda lateral del equipo: Se sitúa en la posición nº25. Determina la proximidad de la luz a la muestra.
- Portamuestras: agujero central de diámetro intermedio. Nos permite seleccionar el haz de luz que pasa por la muestra.
- En el ordenador se conecta el programa Universal Software v. 4.0. y se seleccionan los siguientes parámetros:
  - Area view: 1.00"
  - Port size: 1.20"

Una vez calibrado el equipo, se procede a la medida de color de las muestras. Se coloca la muestra en la cubeta y se cubre con la placa blanca

(standard white plate no. LS 13681 11/86, X = 78.50, Y = 83.32, Z = 87.94) debido a que las muestras son semi-transparentes y dejan pasar la luz incidente.

En cada determinación, se realizan tres medidas de cada muestra. Para tomar cada medida, la cubeta debe rotarse ligeramente entre medida y medida.

A partir de los parámetros calculados automáticamente por el colorímetro ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ), se pueden calcular la saturación del color ( $C^*$ , chroma) y el ángulo de color ( $h^\circ$ , hue-angle). Para ello se aplican las siguientes ecuaciones:

$$h^\circ (\text{hue-angle}) = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

$$C^* (\text{chroma}) = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

La Figura nº 12 muestra el diagrama de color y las respectivas medidas definidas.

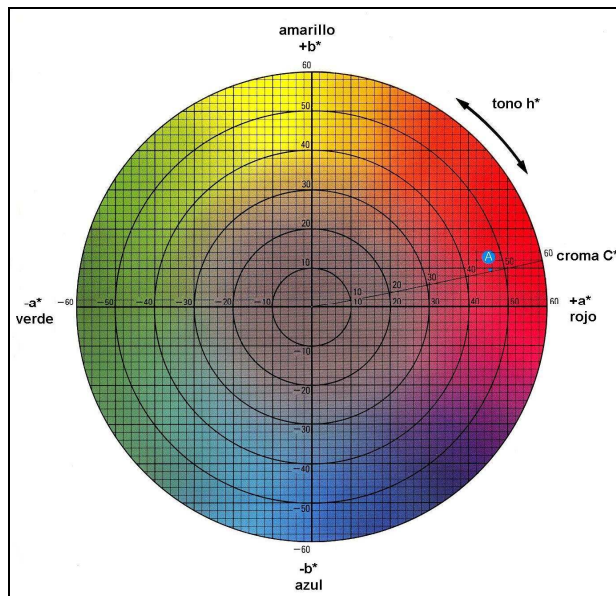


Figura nº 12. Diagrama de color CIE Lab.

### **1.2.3. Compuestos bioactivos.**

#### **1.2.3.1. Vitamina C. (Aparicio *et al.* 1992)**

El método elegido para la determinación de ácido ascórbico en las bebidas de zumo y leche es la polarografía diferencial de impulsos, según el procedimiento utilizado por Aparicio *et al.* (1992) adaptado a la muestra objeto de estudio. Las principales ventajas del método son: su especificidad, elevada sensibilidad y sencillez de realización así como su bajo coste.

##### 1.2.3.1.1. Material y reactivos

- Ácido ascórbico, Merck (Darmstadt, Alemania)
- Ácido tricloroacético, J.T. Baker (Deventer, Holanda)
- Sulfato sódico, J.T. Baker (Deventer, Holanda)
- Ácido oxálico, Panreac (Barcelona, España)
- Ácido acético, Panreac (Barcelona, España)
- Acetato sódico, Panreac (Barcelona, España)
- Material de uso corriente en el laboratorio.

##### 1.2.3.1.2. Instrumentación.

- Polarógrafo con electrodo de goteo de mercurio Metrohm 746/647 V.A. Stand Trace Analyzer, acoplado a Dosimat Metrohm 685.

##### 1.2.3.1.3. Preparación de los reactivos.

- Disolución amortiguadora de pH: ácido acético/acetato sódico 2M pH 4.8 en agua desionizada. Se disuelven 41.01 g de acetato sódico anhidro en agua desionizada, se añaden 28.8 ml de ácido acético glacial y se lleva a 250 ml con agua desionizada.
- Ácido oxálico 1% (p/v): se disuelven 14 g de ácido oxálico-2-hidrato en un litro de agua desionizada.

- Solución extractante: ácido oxálico al 1% (p/v); ácido tricloroacético al 2% (p/v) y sulfato sódico al 1% (p/v).

#### 1.2.3.1.4. Preparación de las Muestras

Se toman 5 mL de la bebida de zumo-leche y se diluyen y enrasan a 25 mL con la solución extractante. La disolución se agita vigorosamente y posteriormente se filtra a través papel Whatman nº 1.

En la cubeta polarográfica se añaden 9.5 mL de una disolución de ácido oxálico al 1 % (p/v), 2 mL de una disolución amortiguadora ácido acético/acetato sódico 2M (pH= 4.8) y 0.5 mL del filtrado anterior.

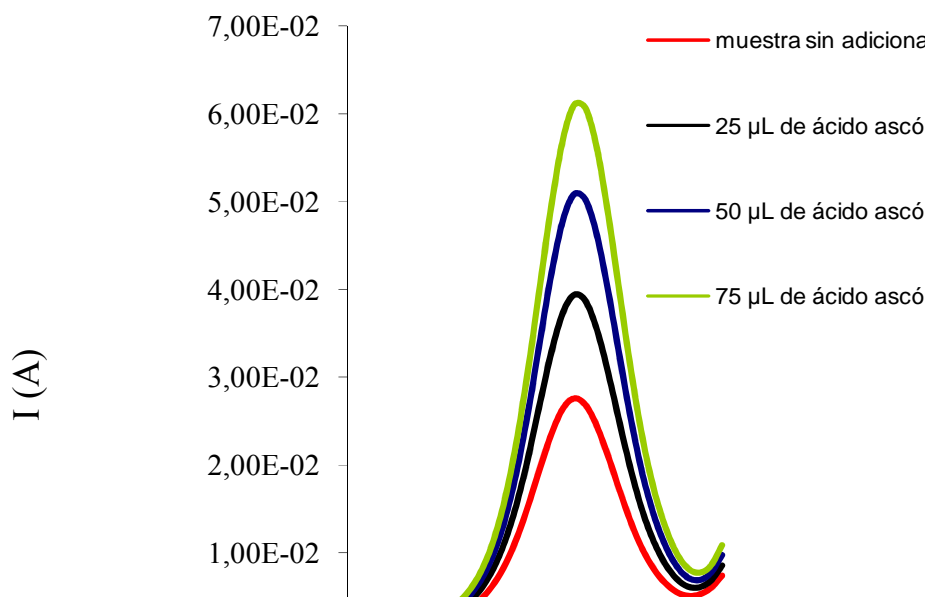
#### 1.2.3.1.5. Preparación de la Disolución Patrón de Ácido Ascórbico

Como patrón de medida se prepara una disolución de ácido ascórbico de 1 mg/mL en ácido oxálico al 1% (p/v). Se guarda en refrigeración y bajo condiciones de oscuridad.

#### 1.2.3.1.6. Condiciones Polarográficas

Para la determinación 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 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 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, de modo que se adicionan 25  $\mu$ L del patrón ácido ascórbico (1 mg/mL) a la muestra y después de cada adición se registra el polarograma obteniendo una curva polarográfica como la que se muestra en la Figura nº 13.



**Figura nº 13.** Polarograma de una muestra de zumo de naranja y leche con sus respectivas adiciones de ácido ascórbico.

#### 1.2.3.1.7. Parámetros analíticos.

La exactitud del método se determina mediante ensayos de recuperación. A la bebida mezcla de zumo de naranja y leche se le añade una cantidad conocida de ácido ascórbico (200, 100 y 50 µg/mL) y se procede a la extracción y posterior determinación polarográfica. Las recuperaciones se encuentran en el intervalo de 92.7 a 96.8%. La precisión instrumental y del método se expresa mediante el coeficiente de variación de nueve determinaciones consecutivas de una misma alícuota y seis determinaciones de alícuotas independientes de una misma muestra, respectivamente, siendo los resultados obtenidos de 2.8% y 2.9% respectivamente.

### 1.2.3.2. Carotenoides. (Cortés et al. 2004)

#### 1.2.3.2.1. Material y reactivos

- $\beta$ -caroteno, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
- all-trans palmitato de retinol, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
- Luteína, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania)
- Zeaxantina, Fluka, (Steinheim, Alemania)
- Terbutil-hidroxitolueno (BHT) (calidad para análisis) de Sigma (Steinheim, Alemania)
- Acetato amónico (calidad HPLC), Scharlau (Barcelona, España)
- Éter de petróleo, Scharlau (Barcelona, España)
- Hexano (calidad HPLC), Scharlau (Barcelona, España)
- Hidróxido potásico (85%), Scharlau (Barcelona, España)
- Terbutil-metil-éter (TBME) (calidad HPLC), Scharlau (Barcelona, España)
- Hidroxicarbonato magnésico (40-45%), Panreac (Barcelona, España)
- Acetonitrilo (calidad para análisis)
- Etanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda)
- Dietil éter, J.T.Baker (Deventer, Holanda)
- Metanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda)
- Cloruro sódico (calidad para análisis), J.T.Baker (Deventer, Holanda)
- Cloroformo, Merck (Darmstadt, Alemania)

#### 1.2.3.2.2. Preparación de patrones

Para preparar las disoluciones “madre” de los cuatro patrones de referencia se pesan por separado, 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  $N_2$ , en refrigeración (2°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 colocan en un frasco topacio, 100  $\mu$ l de cada una de las disoluciones madre de los patrones

preparados anteriormente ( $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina y palmitato de retinol), se evaporan con  $N_2$  y se redisuelve cada uno de ellos con 10 mL del disolvente adecuado (véase Cuadro nº12) para su posterior medida espectrofotométrica, previa filtración de la disolución (Hart y 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  $\mu$ l de  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina y palmitato de retinol, respectivamente, se evapora el cloroformo con  $N_2$  y se redisuelve con 1 mL de una disolución 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 la concentración; A, la absorbancia y  $E^{1\%}$  es el coeficiente de extinción. Los datos del coeficiente de extinción se muestran en el Cuadro nº12.

**Cuadro nº 12.** Coeficientes de extinción de los patrones.

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

#### 1.2.3.2.3. 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.



- Termostatizador 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.

#### 1.2.3.2.4. Extracción y Saponificación de los Carotenoides

El método aplicado para la determinación de los carotenoides en las bebidas de zumo de fruta y leche es el descrito por Cortés *et al.* (2004) con algunas modificaciones para adaptarlo a la muestra de zumo-leche de modo que, se aumenta el tamaño de muestra a 30-35 g de la bebida, se le añade BHT (0.1%, p/v), 100 µl de patrón interno (palmitato de retinol), 0.05 g de hidroxicarbonato magnésico y 35 mL de etanol/hexano (4:3, v/v). Se estudian varios tiempos de agitación (15, 30, 45, 60 min) obteniendo los mejores resultados con un tiempo de 45 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 varias veces con 12.5 mL de etanol y finalmente con 12.5 mL de hexano (hasta no obtener color y no quedar residuo en el filtro). Se unen todos los líquidos del 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). Posteriormente, se añaden 10 mL de éter dietílico y 10 mL de KOH metanólica (0.5 M) con un 0.1% de BHT (p/v) dejando en reposo durante 30-45 min a temperatura ambiente, protegido de la luz, y bajo atmósfera inerte (N<sub>2</sub>). 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 y se recoge sobre un matraz topacio que se lleva a rotaevaporar a 45°C. Si se observan restos de agua se añaden 10 mL de etanol siendo incluso necesario en algunas muestras añadir otros 5 mL posteriormente

para conseguir la sequedad. El residuo obtenido se disuelve con 4 mL de éter dietílico y se pasa a un vial de vidrio topacio, evaporando el disolvente con N<sub>2</sub> y conservando a -20°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 14 se muestra un esquema del proceso de extracción.

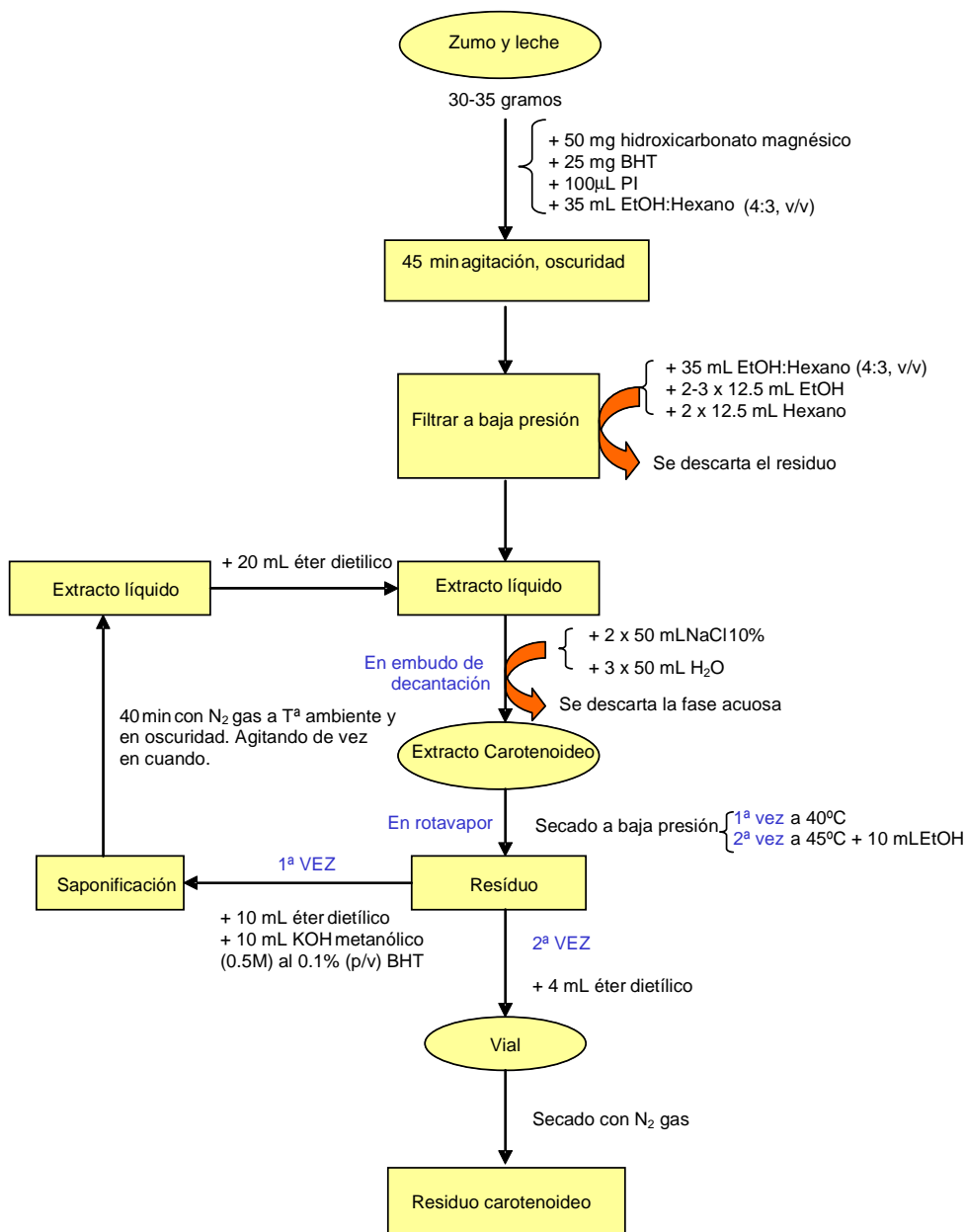


Figura nº 14. Esquema de extracción de pigmentos carotenoides.

1.2.3.2.5. 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 la correcta separación de los carotenoides presentes en las bebidas se aplica el gradiente de fase móvil que se detalla en el Cuadro nº13 y se aplica un gradiente de temperatura (0 min, 20°C; 6 min, 30°C; 22 min, 20°C) con objeto de evitar posibles fluctuaciones en la resolución de los picos cromatográficos por variaciones en la temperatura ambiental.

**Cuadro nº 13.** Gradiente de fase móvil para la determinación de carotenoides por CLAR.

Tiempo (min)	MeOH + AcA (%)	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

**AcA:** Acetato amónico 0.1M **TBME:** Tert-butil-metileter **MeOH:** metanol

1.2.3.2.6. Identificación y Cuantificación de Carotenoides

Debido fundamentalmente a la falta de patrones comerciales de carotenoides, sobretodo de isómeros *cis* de los mismos, 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.* 1998a; Psomiadou y 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 y Scott, 1995; Rouseff *et al.* 1996; Taungbodhitham *et al.* 1998; Oliver y 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 y Tan, 1991; Chen y Chen, 1994; Chen *et al.* 1995.

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

- A las muestras se añade palmitato de retinol como patrón interno (a excepción de las muestras comerciales donde no se descarta que el palmitato de retinol se adicione como vitamina A por parte del fabricante). Para el palmitato se elige como su máximo de absorción 350 nm.

- Se separa el cromatograma en tres partes de modo que, todos los carotenoides hasta la luteína, incluida ésta, se cuantifican como tal, y el resto de xantofilas se cuantifican como zeaxantina. Los carotenos se cuantifican como  $\beta$ -caroteno.
- Cada carotenoide se cuantifica según su  $\lambda_{\max}$  se aproxima a 290, 350, 430 ó 450 nm. El contenido de cada carotenoide en  $\mu\text{g}/100$  g de muestra se determina tras aplicar la siguiente ecuación:

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

donde PI= Patrón Interno.

### **1.2.3.3. Fenoles solubles totales (Singleton y Rossi, 1965).**

#### 1.2.3.3.1. Reactivos

- Carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), J.T. Baker.
- Folin-Ciocalteu (molibdotungstato de amonio), Sigma.
- Ácido gálico, calidad para análisis, UCB.

#### 1.2.3.3.2. Instrumentación

- Material de uso común en el laboratorio.
- Espectrofotómetro UV/Vis. Perkin-Elmer Lambda 2.
- Centrífuga Jouan Mod. GT 422.

#### 1.2.3.3.3. Preparación de los reactivos

- Disolución de carbonato sódico al 2%: Se disuelven 2 g de carbonato sódico en 100 mL de agua desionizada. Se almacena a temperatura ambiente.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu: Se prepara una disolución del reactivo de Folin al 50% en agua desionizada. La solución se mantiene un mes en botella opaca en la nevera.

- Disolución patrón de ácido gálico: Se prepara una disolución madre de ácido gálico (10 mg/mL) y se almacena en la nevera. La disolución de trabajo se prepara diariamente a partir de la madre. Para ello, la disolución madre se ultrasonica durante 1 min ya que se forma un precipitado durante su almacenamiento y posteriormente se toma 1 mL de esta y se lleva a 10 mL con agua desionizada.

#### 1.2.3.3.4. Modo operatorio

Se introducen en tubos de ensayo 100  $\mu$ L de muestra, y se adicionan 3 mL de una disolución de carbonato sódico al 2%. A continuación se añaden 100  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu al 50% (v/v), se mezcla por inversión y se deja en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a  $\lambda=750$  nm.

La determinación cuantitativa se efectúa por interpolación de los valores en una recta de calibrado preparada con ácido gálico en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.1 y 1.0 mg/mL. Muestras con contenido superior se diluyen con agua desionizada.

### **1.2.4 Capacidad Antioxidante Total (Rice-Evans y Miller, 1994)**

#### 1.2.4.1. Material y reactivos

- Metamioglobina equina, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Peróxido de Hidrógeno, 97%, Panreac (Barcelona, España)
- Fosfato sódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Panreac (Barcelona, España).
- Fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), Panreac (Barcelona, España).

#### 1.2.4.2. Instrumentación

- Espectrofotómetro Perkin-Elmer UV/Vis Lambda 2 (Perkin-Elmer, Jügesheim, Germany)

#### 1.2.4.3. Preparación de los reactivos

- Metamioglobina equina (70 $\mu$ M): se pesan 0.132 g de mioglobina y se llevan a 100 mL con tampón fosfato pH= 7.4
- ABTS (5mM): se pesan 0.280 g de ABTS y se llevan a 100 mL con tampón fosfato pH= 7.4.
- Peróxido de hidrógeno (450  $\mu$ M): se toman 43.7  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada mL de tampón fosfato.
- Tampón fosfato (0.1 M) pH= 7.4: El tampón resulta de la mezcla de dos diluciones previas:
  - Fosfato disódico (0.2 M): se pesan 2.84 g de Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y se llevan a 100 mL con agua destilada.
  - Fosfato monosódico (0.2 M): se pesan 2.76 g de NaPO<sub>4</sub> y se llevan a 100 mL con agua destilada.

Para preparar 200 mL de tampón se mezclan 81 mL de fosfato disódico (0.2 M), 19 mL de fosfato monosódico (0.2 M) y 100 mL de agua desionizada.

- Disolución patrón de Trolox (2.5 mM): se pesan 62.6 mg de Trolox y se llevan a 100 mL con tampón fosfato para conseguir una disolución 2.5M. A partir de esta disolución se realizan diluciones seriadas para conseguir concentraciones de 2, 1.5, 1 y 0.5 M.

#### 1.2.4.4. Modo operatorio

En la cubeta de medida, se añaden 489  $\mu$ L de tampón fosfato (pH=7.4), 300  $\mu$ L de ABTS (5 mM), 36  $\mu$ L de mioglobina y 8.4  $\mu$ L de muestra, blanco o patrón y se anota el valor de absorbancia ( $A_1$ ) a  $\lambda=734$  nm. A continuación se



añaden 167  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (oxidante) y se deja actuar durante 3 minutos. Se anota la medida de absorbancia final ( $A_2$ ). El valor de absorbancia final será el resultado de la diferencia entre  $A_2-A_1$ . El resultado puede expresarse en forma de mmol trolox/ L interpolando en la recta de calibrado preparada o como % de inhibición respecto al blanco aplicando la siguiente expresión.

$$\% \text{ inhibición} = (\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}} / \text{Abs}_{\text{blanco}}) * 100$$

### 1.3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 1.3.1. Color

Los valores de color obtenidos para las bebidas comerciales se muestran en el Cuadro nº 14. Cabe señalar que algunas bebidas comerciales poseen adicionados colorantes artificiales que alteran los valores de color que provienen de la fruta natural. La adición de colorantes a los zumos de fruta está permitida legalmente y se regula bajo la Directiva Europea 94/36/EC (EPC, 1994). En concreto, la muestra 3A, para la que se obtiene el mayor valor de  $a^*$  ( $18.61 \pm 0.18$ ) contiene el colorante artificial “rojo allura” (E 129). La muestra 9B se corresponde con el mayor valor de  $b^*$  ( $62.76 \pm 0.09$ ) y contiene adicionado  $\beta$ -caroteno. La muestra 14D compuesta por zumo de kiwi y lima contiene extractos de clorofila y curcúma correspondiendo con los valores de  $a^*$  negativos ( $-13.96 \pm 0.16$ ) y la muestra 16D contiene colorante E100 (curcúma) correspondiéndose también con valores de  $a^*$  negativos ( $-6.20 \pm 0.05$ ). Por otro lado, la muestra 15D contiene colorante E 160a (mezcla de carotenoides) pero, no se encuentran correlaciones con los parámetros de color.

La luminosidad de las muestras ( $L^*$ ) describe la capacidad de reflejar o transmitir la luz. Este parámetro se correlaciona con el porcentaje de leche en las muestras ( $r= 0.649$ ,  $p<0.01$ ) (excluyendo del análisis estadístico las muestras donde no se indica el porcentaje de leche en la etiqueta).

Los valores de  $a^*$  se correlacionan negativamente ( $p<0.01$ ) con la presencia de kiwi y lima en la composición de las bebidas asociándose a

colores verdosos ( $r = -0.618$  y  $r = -0.591$ , respectivamente) mientras la zanahoria, albaricoque y maracuyá se correlacionan positivamente con este parámetro ( $p < 0.05$ ) ( $r = 0.533$ ,  $r = 0.566$  y  $r = 0.533$ , respectivamente). Por último, el parámetro  $b^*$  se correlaciona con la presencia de albaricoque y melocotón ( $r = 0.607$  y  $r = 0.486$ , respectivamente) incrementando el color amarillo de las bebidas.

**Cuadro nº 14.** Parámetros de color de las bebidas de zumo y leche comerciales.

Muestra	L*	a*	b*	h°	C*
1A†	67.61±0.11	3.11±0.12	42.71±0.35	85.84±0.13	42.83±0.35
2A†	66.25±0.01	7.79±0.17	56.20±0.63	82.11±0.08	56.75±0.64
3A†	60.66±0.11	18.61±0.18	13.25±0.06	35.47±0.38	22.85±0.11
4A†	64.83±0.03	8.90±0.01	58.39±0.12	81.34±0.01	59.07±0.12
5A	62.32±0.21	-2.76±0.20	22.57±0.73	96.96±0.28	22.75±0.74
6A	60.15±0.05	7.81±0.04	56.41±0.23	82.12±0.01	56.95±0.23
7A	57.87±0.08	5.00±0.10	51.84±0.03	84.50±0.11	52.08±0.04
8A	53.05±0.01	20.76±0.04	48.57±0.64	66.86±0.23	52.83±0.60
9B†	62.87±0.11	10.17±0.17	62.76±0.09	80.80±0.16	63.59±0.06
10B†	69.79±0.12	1.57±0.09	42.22±0.07	87.87±0.12	42.25±0.07
11C	53.23±0.38	-0.44±0.19	17.67±0.26	91.44±0.64	17.67±0.25
12C	67.60±0.03	2.62±0.01	38.27±0.03	86.08±0.08	38.36±0.03
13D	57.37±0.07	13.45±0.01	48.22±0.22	74.41±0.06	50.07±0.21
14D	54.89±0.03	-13.96±0.16	29.18±0.03	115.57±0.26	32.35±0.07
15D	60.26±0.18	-0.16±0.09	33.96±0.25	90.28±0.16	33.96±0.36
16D	65.62±0.06	-6.20±0.05	31.00±0.25	101.31±0.06	31.62±0.43
17E	80.62±0.06	6.88±0.23	50.04±0.25	82.17±0.32	50.52±0.29

A-E indica los diversos fabricantes de las bebidas de zumo de fruta y leche.

† bebidas refrigeradas

Como se puede observar el valor de  $h^{\circ}$  varía entre  $35.47 \pm 0.38$  y  $115.57 \pm 0.26$ . De manera general, las frutas con coloraciones rojo-amarillentas como el melocotón, albaricoque, zanahoria, guava, papaya y maracuyá se correlacionan con valores de  $h^{\circ} < 90^{\circ}$  mientras las frutas con coloraciones

verdosas como la manzana, limón, lima y kiwi se asocian con valores de  $h^0 > 90^0$ . Por otro lado, los valores de  $C^*$  (saturación del color) muestran correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) con el albaricoque ( $r = 0.646$ ) y melocotón ( $r = 0.464$ ).

Respecto a las condiciones de almacenamiento, las bebidas comercializadas en refrigeración presentan mayor luminosidad que las muestras almacenadas a  $T^a$  ambiente ( $65.33 \pm 3.28$  vs  $59.24 \pm 4.71$ ) así como una mayor intensidad del color ( $47.88 \pm 14.36$  vs  $39.92 \pm 13.00$ ).

### 1.3.2. Carotenoides.

Las concentraciones de carotenoides con actividad provitamina A ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) y carotenoides totales se indican en el Cuadro nº 15. Como puede observarse, existe una enorme variabilidad entre las muestras analizadas. Las Figuras nº 15 y 16 corresponden a los cromatogramas de las bebidas 15D y 17E donde destacan los picos de algunos carotenoides muy por encima de otros, debido a su adición por parte del fabricante.

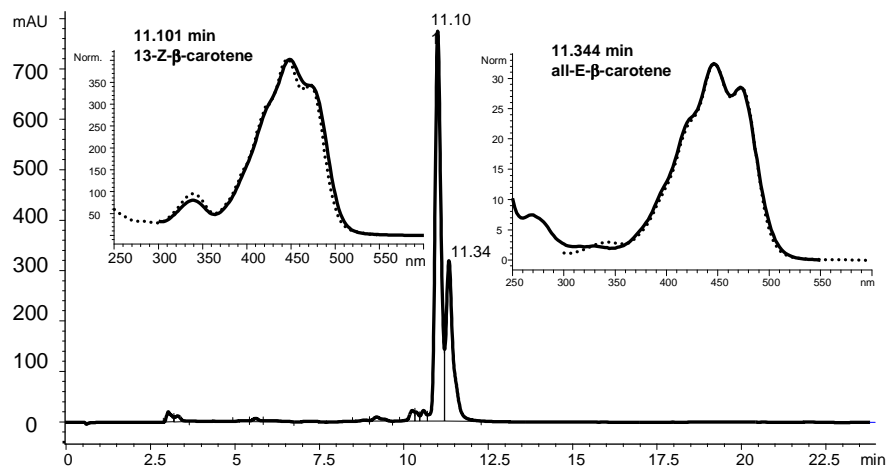
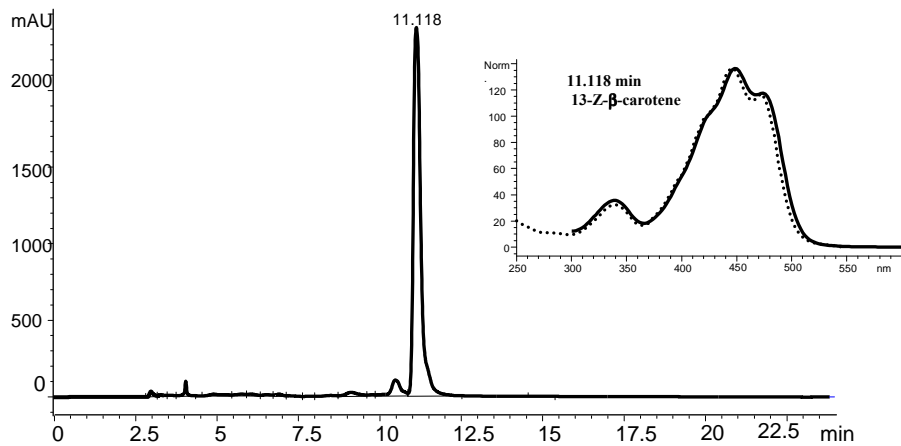


Figura nº 15. Cromatograma de la muestra 15D a  $\lambda = 450 \text{ nm}$ .



**Figura nº 16.** Cromatograma de la muestra 17E a  $\lambda=450$  nm.

De entre las bebidas analizadas, catorce fabricantes indican la adición de vitamina A (Cuadro nº 15) aunque ninguno especifica la forma en la que se adiciona a excepción de la marca B que especifica ser  $\beta$ -caroteno. Según las guías para el enriquecimiento con vitaminas de los alimentos (Anexo II, BOE 2003) la vitamina A puede adicionarse en forma de retinol, retinil acetato, retinil palmitato o  $\beta$ -caroteno y en cualquier caso las cantidades añadidas aportarán al menos el 15% de las recomendaciones de ingesta diarias (RDI) y no podrán superar el 100% de éstas. Cabe destacar que, aunque las muestras **11C, 12C y 17E** no indican la adición de vitamina A en la etiqueta, el análisis cromatográfico apunta a la posible adición de  $\beta$ -caroteno ya que las concentraciones halladas son superiores a las que de manera natural aportaría la fruta en el porcentaje que se indica. Por otro lado, se observa que, para la muestra 17E (Figura nº 16) el  $\beta$ -caroteno se encuentra en forma de su isómero 13-*Z* pudiendo ser debido a que los carotenoides sintéticos son más sensibles a la isomerización que los que se encuentran de manera natural en el zumo por no estar integrados en su matriz.





**Cuadro nº 15.** Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) con actividad provitamina A presentes en las bebidas comerciales de zumo y leche.

	$\beta$ -cryptoxantina	Z- $\beta$ -Cryptoxantina	$\alpha$ -caroteno	$\beta$ -caroteno	9-Z- $\beta$ - caroteno	13-Z- $\beta$ - caroteno	Carotenoides totales
1A*	12.30 $\pm$ 2.66	14.33 $\pm$ 4.95	3.84 $\pm$ 0.27	25.30 $\pm$ 3.17	54.86 $\pm$ 0.59	-	175.43 $\pm$ 15.73
2A*	-	28.18 $\pm$ 1.60	9.18 $\pm$ 0.20	83.60 $\pm$ 1.58	-	154.00 $\pm$ 0.75	638.86 $\pm$ 2.45
3A*	-	14.45 $\pm$ 2.48	-	2.61 $\pm$ 0.48	-	-	36.88 $\pm$ 5.18
4A*	146.07 $\pm$ 4.22	-	6.24 $\pm$ 0.40	75.55 $\pm$ 5.48	-	129.32 $\pm$ 13.01	642.46 $\pm$ 42.12
5A	12.91 $\pm$ 2.12	-	0.31 $\pm$ 0.13	1.64 $\pm$ 0.30	-	-	64.49 $\pm$ 1.16
6A	71.48 $\pm$ 5.35	-	6.34 $\pm$ 1.05	53.39 $\pm$ 10.23	-	91.50 $\pm$ 6.75	359.15 $\pm$ 17.20
7A	-	29.68 $\pm$ 3.86	4.62 $\pm$ 0.28	29.03 $\pm$ 4.47	-	56.43 $\pm$ 8.05	268.54 $\pm$ 4.27
8A	-	-	74.28 $\pm$ 8.58	159.31 $\pm$ 30.42	-	-	615.73 $\pm$ 38.37
9B*	-	45.95 $\pm$ 5.61	9.09 $\pm$ 0.06	140.78 $\pm$ 3.45	-	158.21 $\pm$ 8.58	683.88 $\pm$ 1.12
10B*	20.92 $\pm$ 8.20	-	2.46 $\pm$ 0.35	42.42 $\pm$ 3.23	81.68 $\pm$ 5.24	-	181.31 $\pm$ 14.14
11C	-	-	-	0.50 $\pm$ 0.03	-	-	8.83 $\pm$ 0.36
12C	-	17.68 $\pm$ 2.47	1.28 $\pm$ 0.45	20.7 $\pm$ 6.47	-	-	170.24 $\pm$ 46.35
13D	-	13.08 $\pm$ 2.57	40.99 $\pm$ 14.31	113.53 $\pm$ 37.87	-	-	312.86 $\pm$ 41.08
14D	-	-	-	2.28 $\pm$ 0.06	-	-	20.17 $\pm$ 2.74
15D	-	-	1.91 $\pm$ 0.83	74.47 $\pm$ 1.82	-	168.56 $\pm$ 21.80	257.92 $\pm$ 18.27
16D	-	8.39 $\pm$ 1.20	0.19 $\pm$ 0.15	1.21 $\pm$ 0.66	-	-	27.67 $\pm$ 5.29
17E	-	37.08 $\pm$ 0.96	7.75 $\pm$ 0.54	-	-	128.71 $\pm$ 6.22	331.45 $\pm$ 7.09

\*bebidas refrigeradas.

Como puede observarse en el Cuadro n° 15, el carotenoide predominante es el  $\beta$ -caroteno contribuyendo significativamente ( $p < 0.05$ ) el mango y la zanahoria a incrementar los niveles de éste ( $r = 0.490$  y  $r = 0.530$ , respectivamente). Sin embargo, existen dificultades a la hora de relacionar los contenidos de  $\beta$ -caroteno con el tipo de fruta debido a las adiciones declaradas por los fabricantes. Según señalan Yano *et al.* (2005), diversas frutas como la manzana, uva, limón, pera, fresa, kiwi, piña y plátano son pobres en vitamina A y carotenoides. De acuerdo a esta observación, para la muestra 11C que contiene exclusivamente zumo de manzana, se observa que las concentraciones de carotenoides son muy bajas.

Además, debido a que cromatográficamente no es posible distinguir el  $\beta$ -caroteno adicionado (sintético) del natural, las concentraciones de vitamina A aportada por las bebidas analizadas resultan imposibles de calcular. Según el Instituto de Medicina (IOM, 2001) 1 equivalente de retinol (mg RAE) = 1 mg de all-*E*-retinol, = 2 mg de all-*E*- $\beta$ -caroteno sintético, = 12 mg de all-*E*- $\beta$ -caroteno natural, = 24 mg de otros carotenoides con actividad vitamínica A ( $\beta$ -cryptoxantina,  $\alpha$ -caroteno)

Por otro lado, el  $\alpha$ -caroteno se encuentra en 14 de las bebidas analizadas. Las concentraciones de este carotenoide se correlacionan estadísticamente ( $p < 0.01$ ) con la presencia de albaricoque ( $r = 0.591$ ) y zanahoria ( $r = 0.926$ ) en la composición de la bebida.

La  $\beta$ -cryptoxantina se encuentra en 13 de las bebidas analizadas y sus concentraciones se correlacionan estadísticamente ( $p < 0.05$ ) con la presencia de albaricoque y melocotón en la composición de la bebida ( $r = 0.902$  y  $r = 0.520$ , respectivamente).

El  $\zeta$ -caroteno se encuentra tan sólo en las muestras 8A ( $14.24 \pm 2.19$   $\mu\text{g}/100$  g) y 13D ( $25.31 \pm 2.32$   $\mu\text{g}/100$  g) debido a la presencia de maracuyá donde es el carotenoide principal según indican diversos autores (Mercadante *et al.* 1998b y Yano *et al.* 2005)



Es de señalar, que en algunos casos los carotenoides principales de las frutas que forman parte de la composición del zumo se pierden. Por ejemplo la violaxantina, principal carotenoide del mango fresco, no se detecta en las bebidas que lo contienen en su composición (2A, 7A, 8A, 12C, y 15D). Sin embargo, la auroxantina, que se produce por conversión de los grupos 5,6-epóxidos de la violaxantina a 5,8-furanóxidos de la auroxantina aparece en cantidades significativas en la muestra 12C ( $27.90 \pm 6.96 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) resultando el principal carotenoide. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Mercadante y Rodríguez-Amaya (1998a) que encuentran para zumo de mango comercial que, la violaxantina, principal carotenoide del mango fresco, no se detecta en tres de las muestras apareciendo la auroxantina en niveles significativos.

Por otro lado, luteína y zeaxantina, carotenoides importantes nutricionalmente por su papel en el correcto funcionamiento de la visión y su protección frente a la degeneración macular (Landrum y Bone, 2001), aparecen solamente en las muestras 10B ( $2.53 \pm 0.35$  y  $4.31 \pm 0.95 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ ) y 4A ( $2.36 \pm 0.14$  y  $4.06 \pm 0.57 \mu\text{g}/100 \text{ g}$ , respectivamente). Este hecho puede ser debido a la mayor inestabilidad de las xantofilas respecto a los carotenos por la presencia de oxígeno en sus estructuras lo que las hace más susceptibles a degradaciones por oxidación durante los tratamientos térmicos y el posterior almacenamiento.

Respecto a la presencia de isómeros *cis* (*Z*) de los carotenoides con actividad vitamínica, nueve de las bebidas contienen isómeros *cis* de la  $\beta$ -cryptoxantina y otras nueve presentan también isómeros 9-*Z* y 13-*Z*- $\beta$ -caroteno. Mínguez-Mosquera *et al.* (2002) apuntan que la actividad provitamina A es un 53% y un 38% menor para los isómeros 13-*Z*- $\beta$ -caroteno y 9-*Z*- $\beta$ -caroteno respecto a la forma *trans*. Rodríguez-Amaya (1999) encuentran que los isómeros *Z* del  $\beta$ -caroteno que principalmente se forman en frutas y vegetales rojo-amarillentos tras su procesado son los isómeros 13-*Z*, 9-*Z* y 15-*Z*. Cabe señalar que, la producción de las bebidas de zumo y leche comerciales implica varias etapas que pueden afectar a la estabilidad de los carotenoides y su

isomerización. Muchas de las estas bebidas proceden de zumos concentrados, proceso durante el cual, las temperaturas alcanzadas y el efecto de la luz son dos importantes factores que favorecen la formación de isómeros *cis*. Lessin *et al.* (1997) encuentran en varias frutas y vegetales, un incremento desde el 10% al 39% en el porcentaje total de isómeros *cis* de los carotenoides con actividad provitamina A debido al tratamiento térmico. Marx *et al.* (2000) encuentran elevadas cantidades de isómeros 9-*Z* (31.8%) y 13-*Z*- $\beta$ -caroteno (44.5%) en zumos con adiciones de éste, comparado con un 6.7% y un 13.6% de estos estereoisómeros en zumos de zanahoria naturales. Estos resultados se muestran de acuerdo con los observados en nuestro estudio donde para las muestras 9B y 15D, que declaran la adición de colorantes (mezcla de carotenoides), se obtienen las mayores concentraciones de isómeros *Z*.

### **1.3.3. Relación entre el color de las bebidas y las concentraciones de carotenoides.**

La Figura nº 17 muestra la localización de las bebidas según la escala de color obtenida ( $a^*b^*$ ). Las líneas discontinuas representan el valor de  $h^\circ$ . Cabe destacar que las muestras situadas en la parte superior derecha (colores rojo-amarillentos intensos) son las muestras que presentan mayor cantidad de carotenoides mientras las bebidas situadas en la parte izquierda (valores negativos de  $a^*$  y valores de  $h^\circ > 90^\circ$ ) son las que se caracterizan por su bajo contenido en carotenoides.

El contenido total de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) se correlaciona significativamente ( $p < 0.05$ ) con los parámetros de color  $a^*$  ( $r = 0.755$ ) y  $b^*$  ( $r = 0.776$ ). Con objeto de analizar la posible predicción del contenido total de carotenoides presentes en las muestras, se realiza un análisis de regresión lineal encontrando el siguiente modelo:

$$\text{Carotenoides totales } (\mu\text{g}/100\text{ g}) = -125.93 + 11.56a^* + 8.238b^*$$

El valor de  $R^2$  obtenido indica que dicho modelo explicaría el 69% de los valores obtenidos mediante cromatografía líquida.

Con respecto a las variaciones individuales de carotenoides, se encuentran correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de  $\alpha$ -caroteno y los valores de  $a^*$  ( $r= 0.736$ ,  $p<0.01$ ) de modo que las muestras que contienen entre 1.28 y 9.18  $\mu\text{g}/100$  g de  $\alpha$ -caroteno muestran valores similares de  $h^\circ$  (entre 80.80 y 87.87) encontrándose en la misma región de color. La muestra 8A presenta los mayores valores de  $a^*$  así como  $\alpha$ -caroteno ( $74.30 \pm 8.58$   $\mu\text{g}/100$  g). Aunque el  $\alpha$ -caroteno no se encuentra presente en la muestra 3A, ésta, presenta un elevado valor de  $a^*$  debido a la presencia de fresa en la composición de esta bebida que se corresponde con elevados niveles de antocianinas (color rojo).

Por otro lado, la  $\beta$ -cryptoxantina se correlaciona con los valores de  $b^*$  ( $r= 0.507$ ,  $p<0.01$ ) y el  $\beta$ -caroteno se correlaciona con los valores de  $a^*$  ( $r= 0.643$ ,  $p<0.01$ ). Meléndez-Martínez *et al.* (2007) cuando estudian la relación entre el color y la estructura de los carotenoides encuentran que la  $\beta$ -cryptoxantina y el  $\beta$ -caroteno, ambos con 11 dobles enlaces son carotenoides de color amarillento.

A pesar de la adición del colorante E 160a en la muestra 15D, ésta presenta un valor de  $h^\circ$  cercano a los  $90^\circ$  lo que puede deberse al bajo porcentaje de zumo en la mezcla (7%) o por isomerización del  $\beta$ -caroteno a su isómero 13-*Z* con la consecuente pérdida de color de acuerdo a los efectos señalados por Bauernfeind (1984) y Rodríguez-Amaya (2001) que observan que los isómeros *Z* poseen menores coeficientes de extinción a la  $\lambda_{\text{max}}$ . Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos ya que se encuentra que los isómeros 13-*Z* y 9-*Z* $\beta$ -caroteno pierden la correlación con los parámetros de color obtenida para el isómero all-*E*- $\beta$ -caroteno.

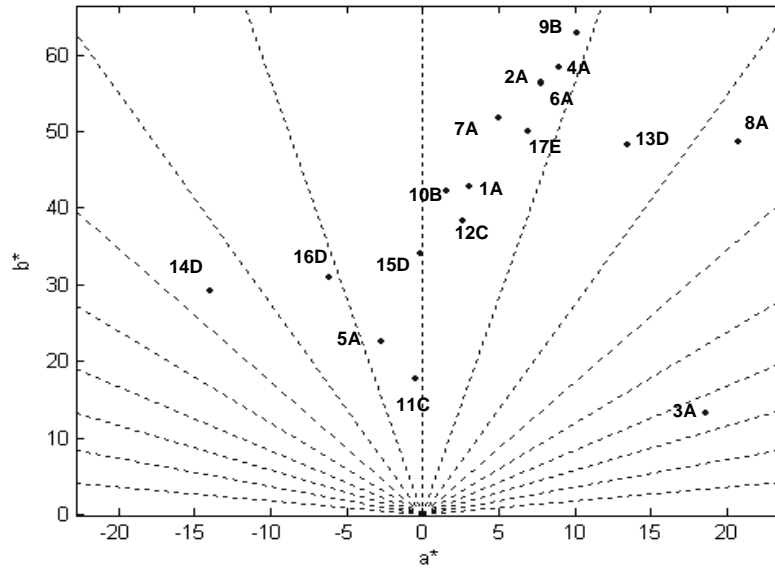


Figura nº 17. Posición de las bebidas analizadas en el plano a\*, b\*.

#### 1.3.4. Parámetros físico-químicos: pH, °Brix y densidad

Los resultados obtenidos para los parámetros físico-químicos pH, °Brix y densidad se muestran en el Cuadro nº16. Estos parámetros están directamente relacionados con la calidad del producto y determinan la estabilidad de los compuestos bioactivos de los alimentos. La muestra 11C formada por zumo de manzana y leche exclusivamente, posee el pH más bajo ( $2.96 \pm 0.01$ ), la menor concentración en sólidos solubles ( $4.00 \pm 0.01$ ) y la menor densidad ( $1.017 \pm 0.005$  g/L) de entre todas las bebidas analizadas.

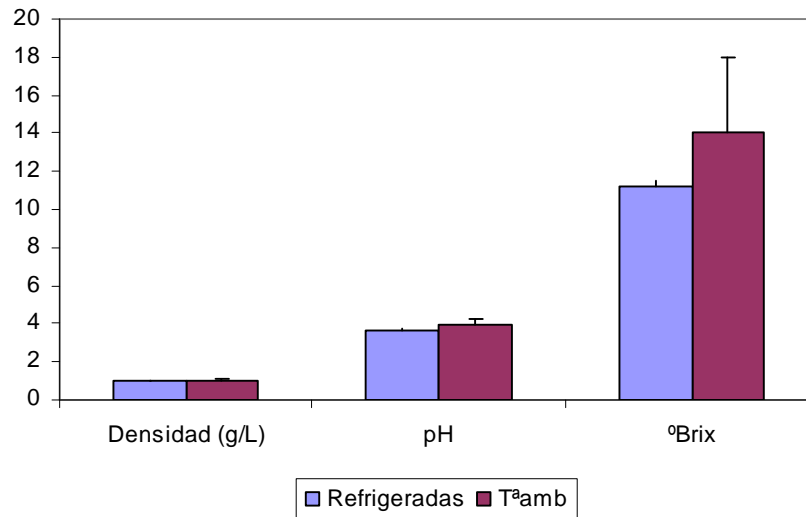
**Cuadro nº 16.** Parámetros físico-químicos de las bebidas de zumo y leche comerciales analizadas.

Muestra	°Brix	pH	Densidad
1A*	14.13±0.06	4.11±0.01	1.059±0.005
2A*	14.43±0.06	3.91±0.01	1.062±0.012
3A*	14.00±0.01	3.99±0.01	1.060±0.012
4A*	14.20±0.06	3.85±0.01	1.056±0.005
5A	12.98±0.01	3.65±0.01	1.055±0.005
6A	12.67±0.06	3.71±0.02	1.054±0.003
7A	12.70±0.01	3.83±0.01	1.055±0.009
8A	13.03±0.06	3.57±0.01	1.056±0.006
9B*	13.50±0.06	3.84±0.01	1.056±0.004
10B*	13.70±0.06	3.80±0.01	1.054±0.002
11C	4.00±0.01	2.96±0.01	1.017±0.005
12C	4.70±0.06	3.27±0.01	1.019±0.005
13D	14.30±0.01	3.32±0.01	1.059±0.003
14D	14.03±0.06	3.82±0.01	1.058±0.008
15D	14.16±0.06	3.79±0.01	1.060±0.007
16D	13.33±0.06	3.90±0.01	1.055±0.006
17E	7.47±0.01	3.63±0.01	1.026±0.003

A-E indica el diferente fabricante.

\*bebidas refrigeradas

Respecto a la influencia del tratamiento térmico sobre los valores de pH, °Brix y densidad (Figura nº 18) se observa que las muestras almacenadas a temperatura ambiente (UHT) poseen valores más bajos para °Brix y densidad respecto a las refrigeradas.



**Figura nº 18.** Parámetros físico-químicos de las bebidas analizadas.

Los valores de °Brix se sitúan entre  $4.00 \pm 0.01$  y  $14.43 \pm 0.06$ . Esta enorme variabilidad puede deberse a la adición de azúcares por parte de los fabricantes con objeto de contrarrestar la acidez de algunas frutas y conseguir una mejor aceptación por parte de los consumidores (Sánchez-Moreno *et al.* 2006). Los °Brix se correlacionan positivamente con la presencia de naranja ( $r= 0.379$ ,  $p < 0.01$ ) y piña ( $r= 0.357$ ,  $p < 0.01$ ) en la composición de la bebida mientras se correlacionan negativamente con la presencia de limón ( $r= -0.414$ ,  $p < 0.05$ ).

Los valores de pH se sitúan entre  $2.96 \pm 0.01$  y  $4.11 \pm 0.01$ . La presencia de limón en la composición de la bebida se correlaciona negativamente con dicho parámetro ( $r= -0.519$ ,  $p < 0.01$ ) mientras que la naranja se correlaciona de manera positiva ( $r= 0.352$ ,  $p < 0.05$ ).

Para los valores de densidad, existe menor variabilidad entre las muestras situándose entre  $1.017 \pm 0.005$  g/L y  $1.062 \pm 0.012$  g/L.

### 1.3.5. Ácido ascórbico.

Las concentraciones de ácido ascórbico de las bebidas comerciales se muestran en el Cuadro nº 17 situándose en un rango de  $9.32\pm 0.48$  a  $53.9\pm 0.99$  mg/100 mL, observándose una gran variabilidad entre las muestras al igual que ocurría en el caso de los carotenoides.

La concentración promedio de las bebidas almacenadas a temperatura ambiente es de  $34.0\pm 10.1$  mg/100 mL no existiendo diferencias estadísticamente significativas con las almacenadas en refrigeración ( $31.5\pm 16.1$  mg/100 mL) (Figura nº 19).

Por otro lado, se comprueba si la adición de vitamina C por parte del fabricante tal y como se declara en la etiqueta se correlaciona con las concentraciones finales halladas. Según la etiqueta, existen tres posibles cantidades de adición de ácido ascórbico (Cuadro nº 11): 30 mg, 9 mg y sin adición, encontrándose una correlación estadísticamente significativa entre las diferentes cantidades declaradas en la etiqueta y la concentración de vitamina C hallada experimentalmente ( $r= 0.631$ ,  $p<0.01$ ).

Para conocer la contribución de las distintas frutas presentes en la bebida en las concentraciones de ácido ascórbico, se realiza una corrección de los valores hallados experimentalmente, restándoles las correspondientes cantidades (mg/ 100 mL) que, según indica la etiqueta, adiciona el fabricante. Tras dicha corrección, se encuentra una correlación significativa de las concentraciones de ácido ascórbico y la presencia de limón en la composición de la bebida ( $r= 0.383$ ,  $p<0.01$ ) con promedios de vitamina C mayores para las bebidas que lo contienen en su composición respecto al resto ( $43.3\pm 9.87$  mg/100 mL vs  $15.22\pm 3.85$  mg/100 mL, respectivamente). Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Goristein *et al.* (2001) que encuentran que tras comparar las concentraciones de vitamina C de diferentes cítricos las mayores cantidades se obtienen para el limón.

Respecto a los parámetros físico-químicos que pueden afectar a las concentraciones de ácido ascórbico, se aplica un análisis de regresión lineal

obteniéndose que sólo el pH influye sobre las concentraciones de la vitamina ( $p=0.016$ ) hallándose un correlación estadísticamente significativa ( $r= -0.738$ ,  $p<0.01$ ) entre ambos de modo que, pH ácidos ayudan a estabilizar las concentraciones de la misma ya que a  $pH>3.59$  (media de las muestras) se obtiene menores concentraciones de ácido ascórbico ( $30.29 \pm 3.45$  mg/100 mL) que a  $pH<3.59$ , donde el promedio se sitúa en  $42.10 \pm 4.23$  mg/100 mL. Estos resultados se muestran de acuerdo con las observaciones realizadas por otros autores (Tannebaum *et al.* 1985; Bull *et al.* 2004).

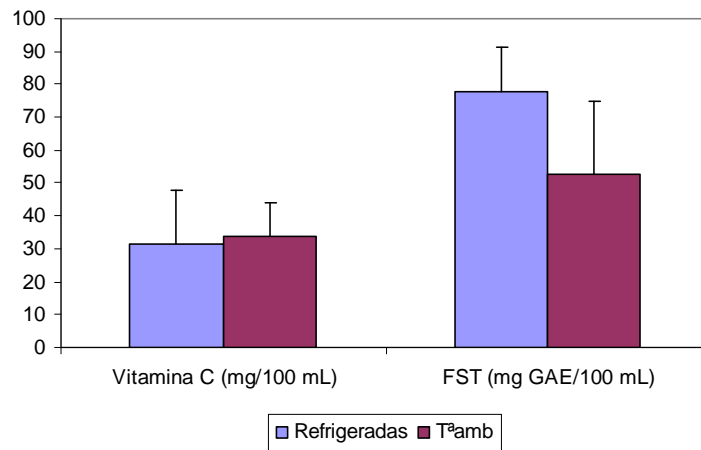
### **1.3.6. Fenoles solubles totales.**

La concentración de compuestos fenólicos solubles totales varía ampliamente de unas muestras a otras encontrándose concentraciones de  $26.5\pm 0.02$  mg GAE/100 mL a  $99.8\pm 0.04$  mg GAE/100 mL (Cuadro nº 17). Dichas concentraciones difieren significativamente según las condiciones de almacenamiento ( $p<0.05$ ), siendo mayores para las bebidas refrigeradas ( $77.8\pm 13.7$  mg/100mL) respecto a las almacenadas a temperatura ambiente ( $52.5\pm 22.2$  mg/100 mL).

En relación a los parámetros físico-químicos, no se encuentran correlaciones entre las concentraciones de fenoles solubles totales y los valores de pH, °Brix o densidad.

Por otro lado, tras el análisis estadístico se observa que las muestras cuya composición incluye manzana o mango presentan un menor contenido de fenoles ( $50.3 \pm 11.5$  y  $48.8 \pm 10.1$  mg/100 mL, respectivamente) aunque la muestra 11C compuesta únicamente por zumo de manzana y leche (Cuadro nº 11) muestra un elevado contenido de los mismos.





**Figura nº 19.** Concentraciones de vitamina C y fenoles solubles totales (FST) de las bebidas comerciales de zumo y leche.

### 1.3.7. Capacidad antioxidante total (TEAC)

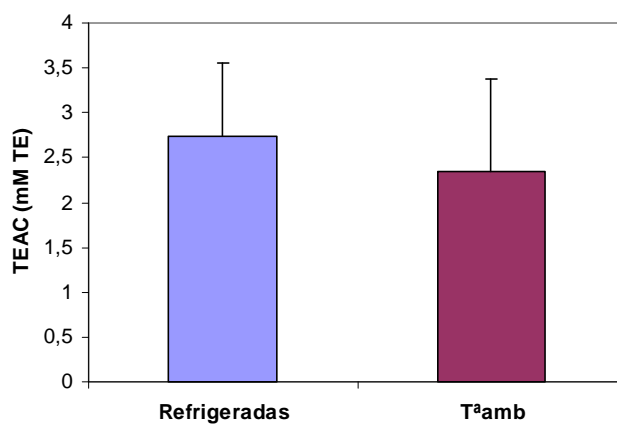
La capacidad antioxidante de las diferentes bebidas comerciales determinada mediante el método TEAC se sitúa entre  $3.60 \pm 0.03$  y  $0.61 \pm 0.21$  mmol trolox/L, correspondiendo el menor valor hallado a la muestra 14D (Cuadro nº 17) para la que se obtienen también las menores concentraciones de ácido ascórbico ( $15.6$  mg/100 mL) y compuestos fenólicos ( $40.2$  mg GAE/100 mL).

La capacidad antioxidante total de las bebidas conservadas en refrigeración es ligeramente superior ( $2.74 \pm 0.82$  mmol trolox/L) a la de las bebidas conservadas a temperatura ambiente ( $2.34 \pm 1.04$  mmol trolox/L) (Figura nº 20) aunque dichas diferencias no son estadísticamente significativas. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Anese *et al.* (1999) y Sánchez-Moreno *et al.* (2005) que estudian las propiedades antioxidantes del zumo de tomate y sus modificaciones con la temperatura de tratamiento encontrando que, mayores temperaturas de conservación (esterilización) producen una mayor destrucción de vitaminas y otros compuestos bioactivos con la consecuente reducción de la capacidad antioxidante total.

**Cuadro nº 17.** Concentración de vitamina C, fenoles solubles totales y capacidad antioxidante total (TEAC) de las bebidas comerciales.

Muestra	AA (mg/100mL)	FST (mg GAE/100mL)	TEAC (mmol TE/L)
1A*	41.6±0.02	66.9±0.04	3.36±0.07
2A*	32.9±0.39	75.5±0.09	2.99±0.11
3A*	35.4±0.56	84.7±0.03	3.41±0.05
4A*	39.3±2.39	99.9±0.04	3.31±0.01
5A	47.7±0.18	44.5±0.13	3.60±0.03
6A	42.6±0.05	56.6±0.12	3.53±0.11
7A	53.9±0.01	56.3±0.15	3.41±0.06
8A	53.9±0.99	44.1±0.01	3.51±0.17
9B*	12.4±0.69	69.0±0.07	1.31±0.13
10B*	27.2±0.41	71.0±0.05	2.12±0.23
11C	40.6±0.57	61.2±0.05	1.77±0.28
12C	45.0±0.41	49.2±0.14	2.35±0.09
13D	28.9±0.34	73.2±0.01	2.44±0.16
14D	15.6±0.04	40.2±0.01	0.61±0.21
15D	17.3±0.63	26.5±0.02	1.48±0.13
16D	18.7±0.42	41.6±0.01	2.08±0.14
17E	9.3±0.48	74.1±0.03	1.02±0.02

\* Bebidas refrigeradas, AA: ácido ascórbico, FST: fenoles solubles totales



**Figura nº 20.** Capacidad antioxidante total (TEAC) de las bebidas comerciales almacenadas en refrigeración o a temperatura ambiente.

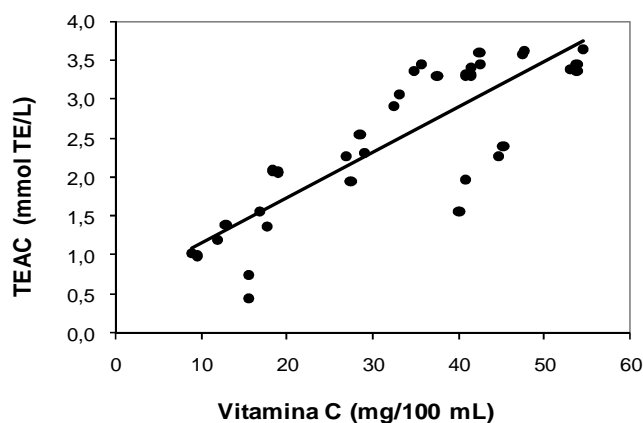
En cuanto a la composición de las muestras se comprueba si el porcentaje de zumo o el de leche influye sobre la capacidad antioxidante total de las mismas, encontrándose que no existen diferencias estadísticamente significativas en función de éstos parámetros ( $p>0.05$ ). Sin embargo, con respecto a la fruta que forma parte de la composición del zumo, se obtiene que el limón ( $p=0.031$ ) seguido de la naranja ( $p=0.043$ ) influyen positivamente sobre los valores de capacidad antioxidante total. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Arnao *et al.* (1998) que tras comparar la capacidad antioxidante de zumos de limón, naranja y pomelo observan que el limón presenta una capacidad antioxidante un 33% mayor que la naranja y el pomelo y Gorinstein *et al.* (2001) que mediante análisis TRAP (Total Radical Antioxidant Potential) encuentran una mayor capacidad antioxidante para el limón con respecto a otros cítricos.

Con objeto de evaluar la contribución de los diferentes compuestos bioactivos analizados en este trabajo sobre los valores de capacidad antioxidante total, se realiza un análisis de regresión multivariante, obteniéndose el siguiente modelo:

$$\text{TEAC} = - 0.184 + 0.058*[\text{vitamina C}] + 0.011*[\text{FST}] + 0.009*[\text{vitamina A}]$$

El valor de  $R^2$  obtenido indica que dicho modelo explicaría el 86.88% de los valores obtenidos experimentalmente y que las concentraciones de ácido ascórbico son las que determinarían principalmente los valores de capacidad antioxidante total. Este resultado se muestra de acuerdo con los obtenidos por Gardner *et al.* (2000) y Sánchez-Moreno *et al.* (2003a) que encuentran que la vitamina C es el mayor contribuyente a la capacidad antioxidante en zumo de naranja y, Rice-Evans y Miller (1996) que observan que el ácido ascórbico es el mayor contribuyente a la capacidad antioxidante total en zumo de manzana. Sin embargo, Rapisarda *et al.* (1999) observan para diferentes zumos de naranja sanguina que la capacidad antioxidante se debe principalmente a sus elevadas concentraciones en antocianinas.

Como muestran los resultados, las mejores correlaciones se obtienen entre los valores de TEAC y las concentraciones de ácido ascórbico ( $r= 0.834$ ,  $p<0.01$ ) (Figura nº 21) aunque también se encuentran correlaciones entre los valores de TEAC y la adición de vitaminas sintéticas por parte del fabricante ( $r= 0.370$ ,  $p<0.05$ ) y  $\beta$ -cryptoxantina ( $r= 0.349$ ,  $p<0.01$ ).



**Figura nº 21.** Correlación entre las concentraciones de ácido ascórbico y los valores de capacidad antioxidante (TEAC) de las bebidas comerciales de zumo y leche.

Por otro lado, los parámetros físico-químicos, °Brix y densidad, muestran una influencia positiva sobre los valores de capacidad antioxidante ( $p=0.031$ ) de modo que las bebidas con °Brix>11.11 y densidad>1.05 (g/dL) se corresponden con valores de TEAC igual a 2.65 mmol trolox/L frente a 1.71 mmol trolox/L para las muestras con valores menores de éstos. Por otro lado, el pH influye de manera indirecta pues ayuda a estabilizar la vitamina C que, como se ha comprobado, es el mayor contribuyente a la capacidad antioxidante total.

#### 1.4. CONCLUSIONES

Del estudio realizado sobre las bebidas comerciales de zumo de fruta y leche enriquecidas con vitaminas A, C, D y E se concluye que existe una gran variabilidad en la contenidos de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante total según la muestra analizada y el fabricante. Las diferencias en las concentraciones de carotenoides son notables y en muchos casos éstos se encuentran en forma de isómeros *cis* ( $Z$ ) cuya actividad vitamínica es menor. A través del análisis cromatográfico se observa la adición no declarada de carotenoides con actividad vitamínica. Respecto al contenido en vitamina C, todas las bebidas presentan unos niveles aceptables de la misma, excepto en casos muy limitados donde no existe adición por parte del fabricante. La capacidad antioxidante de las bebidas muestra una buena correlación con los niveles de ácido ascórbico y por tanto se deduce que éste es el principal contribuyente a la capacidad antioxidante total (TEAC). Además de las adiciones vitamínicas, la diversa composición de fruta en el zumo que conforma la bebida influye sobre la calidad nutricional final.

Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas y contribuciones en congresos:

- **Zulueta, A.**, Esteve, M.J., Frígola, A. 2007. Carotenoids and Color of Fruit Juice and Milk Beverage Mixtures. *Journal of Food Science*, 72 (9), C457- C463.
- **Zulueta, A.**, Esteve, M.J., Frasquet, I., Frígola, A. 2007. Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chemistry*, 103 (4), 1365-1374.
- **Zulueta A.**, Cortés, C., Esteve M.J., Frasquet, I., Frígola A.

Título: Color and physico-chemical properties of different comercial available types of milk-juice beverages.

Tipo de participación: Póster.

Congreso: INTRAFood. Innovation in traditional foods.

Fecha y lugar de celebración: Del 25 al 28 de octubre de 2005, Valencia (España)

Publicación: Proceeding, ISBN: Vol.1 84-9705-879-8

Editorial: Universidad Politécnica de Valencia.

- Autores: **Zulueta A.**, Esteve, M.J., Frasquet, I., Frígola, A.

**Título: Carotenoids in marketed fortified beverages of fruit juice and milk.**

Tipo de participación: Póster.

Congreso: I World Congreso of Public Health and Nutrition, VII Nacional Congreso of the Spanish Society of Community Nutrition (SENC)

Fecha y lugar de celebración: Del 28 al 30 de Septiembre de 2006, Barcelona (España).

Publicación: Abstract, ISBN: 1368-9800

Editorial: Journal of Public Health Nutrition

## **CAPÍTULO 2. Preparación y caracterización de una nueva bebida de zumo de naranja y leche.**

### **2.1. INTRODUCCION.**

Una vez analizadas las bebidas del mercado, se procede a preparar una bebida de similares características pero con contenidos superiores tanto en el porcentaje de zumo como de leche. El tipo de fruta seleccionado en la formulación de la bebida es la naranja, debido a su riqueza nutricional (vitamina C, carotenoides, flavanonas, minerales), su buena aceptación por parte de los consumidores y los elevados niveles de producción en la Comunidad Valenciana con casi 2 millones de Tm en la campaña 2006/2007 (datos oficiales de la Consellería de Agricultura, Pesca i Alimentació, 2007).

### **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.2.1. Muestra.**

##### 2.2.1.1. Formulación

- 50% zumo de naranja.
- 20% leche desnatada.
- 30% agua.
- 0.3% pectina alto metoxilo (Unipeptine AYD 250 Degussa Food Ingredients, Bolougne, Francia).
- 0.1% ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España).
- 7.5% azúcar blanco (Azucarera Española, Madrid, España).

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Optimización de la preparación de la bebida.

Las primeras pruebas realizadas fueron encaminadas a conseguir la estabilidad de los micronutrientes presentes en el zumo de naranja durante la preparación de la bebida debido a que se observan pérdidas de más del 50% en las concentraciones de vitamina C cuando no se tienen en cuenta ciertas precauciones.

Para garantizar que dichos micronutrientes se mantienen en la bebida mezcla, se selecciona como indicador el ácido ascórbico debido a su sensibilidad al oxígeno, luz y calor. Para ello se determinan las concentraciones de éste en el zumo de naranja (100%), el zumo diluido en agua (50:50, v/v) y la bebida de zumo-leche (50:20, v/v). Los resultados obtenidos tras las diversas pruebas se muestran en el Cuadro nº 18.

**Cuadro nº 18.** Recuperaciones (%) de ácido ascórbico tras la preparación de la bebida de zumo de naranja y leche.

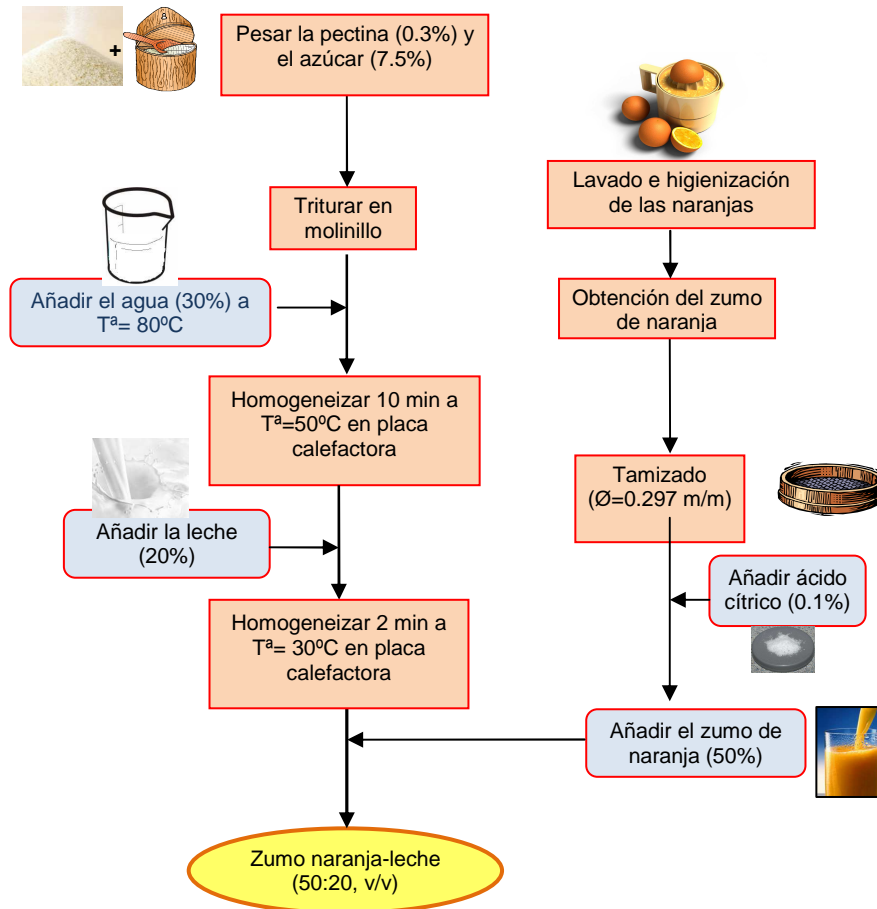
	AA (mg/ 100 mL) zumo naranja	AA (mg/ 100 mL) bebida zumo-leche	Recuperación (%)
Test 1	62.02 ± 0.57	28.08 ± 0.42	90.6%
Test 2	62.57 ± 0.25	31.96 ± 0.59	102.1%
Test 3	56.75 ± 0.50	26.95 ± 0.48	95.0%
Test 4	55.83 ± 0.47	24.42 ± 0.72	87.5%

Con las condiciones de preparación que se describen a continuación las concentraciones de ácido ascórbico se preservan en un 95% respecto a las del zumo de naranja de partida.



Brevemente el diagrama de preparación de la bebida se presenta en la Figura nº 22. Los pasos a seguir para la preparación de la misma consisten en:

- Se calienta agua hasta que alcance  $T^a = 80^{\circ}\text{C}$
- La pectina (0.3%) junto con el azúcar (7.5%) se muelen previamente y la mezcla obtenida se añade al agua caliente (30%, v/v), dejándola en agitación en la placa calefactora a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos hasta su completa disolución.
- Una vez disuelta la mezcla, se tapa el recipiente con papel de aluminio y se cubre para protegerlo de la acción del oxígeno. Se añade la leche desnatada (20%) y se deja en agitación durante 1-2 minutos hasta que la mezcla es homogénea.
- Se apaga la placa calefactora y cuando la temperatura de la mezcla desciende a  $T^a = 30^{\circ}\text{C}$ , se añade el zumo de naranja (50%) al que previamente se le retira la pulpa pasándolo a través de un tamiz y se le adiciona 1 g/L de ácido cítrico.
- El recipiente se deja en agitación hasta que la mezcla sea homogénea, estando en todo momento tapado para impedir el contacto con el  $\text{O}_2$  del aire y degradaciones por la luz.
- La bebida así preparada se almacena en refrigeración en un envase perfectamente protegido para evitar degradaciones durante su conservación para la realización de los análisis.



**Figura nº 22.** Esquema de preparación de la bebida de zumo de naranja y leche.

### 2.3.2. Caracterización físico-química.

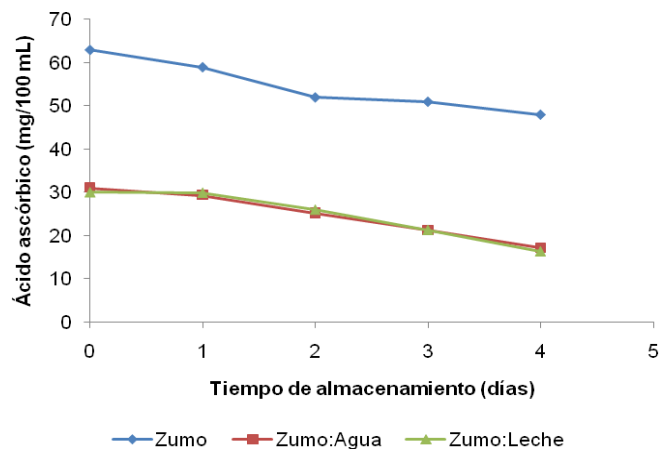
Las características físico-químicas de la bebida de zumo de naranja y leche que posteriormente influirán sobre el tratamiento por PEAI se detallan en el Cuadro nº19.

**Cuadro nº 19.** Características físico-químicas del zumo de naranja y de la bebida de zumo de naranja y leche.

	zumo naranja	bebida zumo-leche
pH	3.55±0.07	3.99±0.02
°Brix	12.1±0.4	15.2±0.3
$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	1.051±0.001	1.064±0.002
Acidez total (g <sub>ac.citrico</sub> / 100 mL)	0.72±0.02	0.88±0.01
Conductividad (mS/cm)	3.42±0.09	2.99±0.05

### 2.3.3. Estabilidad del ácido ascórbico.

Para evaluar la estabilidad de la vitamina C en la bebida durante su almacenamiento en refrigeración ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ) se prepara una muestra de la misma y se compara con una mezcla de zumo y agua (50:50) y zumo de naranja (100%). Los análisis se realizan durante 5 días consecutivos. La evolución de las concentraciones de ácido ascórbico puede observarse en la Figura nº 23.



**Figura nº 23.** Estabilidad del ácido ascórbico (mg/100 mL) en la bebida de zumo de naranja y leche durante su almacenamiento en refrigeración ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ).

Como puede observarse en la Figura nº 23, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las cinéticas de degradación del ácido ascórbico en la bebida de zumo-leche y en la mezcla de zumo y agua (50:50). A tiempo final (5 días) las concentraciones de vitamina C se reducen alrededor del 30% en la bebida de zumo y leche mientras la reducciones alcanzadas en el zumo de naranja son del 19%. Estas diferencias pueden deberse al distinto pH de ambos productos ya que, tal y como se observa para las bebidas comerciales, pH ácidos favorecen la estabilidad de la vitamina.

## **CAPÍTULO 3. Efecto de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante total de las bebidas de zumo de naranja y leche.**

### **3.1. INTRODUCCION**

Una vez optimizado el proceso de elaboración de la bebida a base de zumo de naranja (50%) y leche (20%) se procede a aplicar diferentes tratamientos por PEAI para la conservación de la misma. Se se ensayan cuatro campos distintos: 15, 25, 35 y 40 kV/cm y tiempos entre 40-700  $\mu$ s y se estudia la influencia de dichos tratamientos sobre las concentraciones de compuestos bioactivos y con capacidad antioxidante así como sobre los parámetros físico-químicos que influyen en la calidad de la bebida. Para poder evaluar esta tecnología no térmica como alternativa a los tratamientos tradicionales por calor, se aplica un tratamiento por pasterización (90°C, 20 s) y se analiza su influencia sobre los mismos parámetros nutricionales y de calidad de la bebida. Tratamientos por calor de entre 90-99°C durante 15-30 s son los que normalmente se aplican en la práctica comercial para el zumo de naranja (Braddock, 1999).

### **3.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **3.2.1. Muestras**

La bebida se prepara fresca cada día antes del tratamiento tal y como se indica en el apartado 2.3.1. Cada semana se aplica un campo y siete tiempos de tratamiento distintos. Para su correcta conservación, las bebidas se almacenan en refrigeración ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante el transcurso de los análisis.

Cabe señalar que, aunque se partió del mismo zumo durante la realización de esta primera parte del estudio, debido a las posibles variaciones en su composición durante la conservación del mismo, en cada tratamiento aplicado

se trabaja con un blanco o muestra control y las variaciones se expresan en relación a éste ( $C/C_0$ ).

### 3.2.2. Tratamiento por Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad.

Se utiliza un sistema continuo de pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI) OSU-4D, diseñado por la Universidad de Ohio y localizado en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA) (Figura nº 6). El sistema consiste en seis cámaras de tratamiento conectadas en serie con un diámetro de 0.23 cm y una distancia de abertura de 0.293 cm. A la entrada y salida de cada una de las cámaras se conectan dos serpentines de enfriamiento sumergidos en un baño de agua para mantener la temperatura en el rango designado ( $T=35^{\circ}\text{C}$ ). Las temperaturas alcanzadas durante el tratamiento se monitorizan con un termopar. La forma del pulso, el voltaje y la intensidad en las cámaras de tratamiento se registran mediante un osciloscopio digital Tektronix TDS 210 (Tektronix Inc., OR EE.UU.). El flujo se fija en 60 mL/min mediante una bomba peristáltica y se selecciona un tiempo de duración del pulso bipolar de onda cuadrada de 2.5  $\mu\text{s}$ .

Para decidir las condiciones más apropiadas de tratamiento, se prueban una serie de variables. El intervalo del tiempo varía entre 40 y 700  $\mu\text{s}$  y el campo eléctrico se ajusta a 15, 25, 35 y 40 kV/cm. Cada tratamiento se realiza por duplicado en diferentes sesiones.

La efectividad del proceso dependerá de las características del producto, principalmente de su conductividad, pH y composición iónica del medio (Góngora-Nieto *et al.* 2002). La medida de la energía es un criterio útil que unifica los diversos tratamientos aplicados al integrar en el mismo parámetro el efecto del campo, tiempo y temperatura.

La energía de pulso eléctrico se calcula usando la siguiente ecuación (Wouters *et al.* 2001, Abram *et al.* 2003 y Pérez y Pilosof, 2004):

$$W (\text{J L}^{-1}) = E^2 \sigma \tau$$

donde  $E$  es la intensidad de campo eléctrico ( $V\ m^{-1}$ ),  $\sigma$  es la conductividad eléctrica del producto ( $S\ m^{-1}$ ) calculada para cada temperatura alcanzada durante el procesado y  $\tau$  es la longitud del pulso (s).

Cuando  $\tau$  y  $E$  son constantes,  $W$  dependerá sólo de  $\sigma$  y como resultado se obtiene que la aplicación del mismo número de pulsos generará una mayor energía ( $Q$ ) cuando  $\sigma$  es mayor:

$$Q\ (J\ L^{-1}) = n \cdot W = E^2 \sigma t$$

Siendo  $n$  el número de pulsos,  $E$  la intensidad de campo eléctrico ( $V\ m^{-1}$ ),  $\sigma$  la conductividad eléctrica ( $S\ m^{-1}$ ) y  $t$  el tiempo de tratamiento (s).

En el Cuadro nº 20 se muestran los parámetros específicos de los diferentes tratamientos por PEAI aplicados donde,  $E$  (kV/cm), es el campo eléctrico;  $t$  ( $\mu s$ ), el tiempo de tratamiento;  $T_{max}$  ( $^{\circ}C$ ), es la temperatura máxima alcanzada durante el tratamiento;  $\sigma$  (mS/cm), es la conductividad, y  $Q$  (J/mL) y  $W$  (J/mL/pulso) los parámetros de energía.

**Cuadro nº 20.** Parámetros específicos del tratamiento por PEAI.

<b>E</b> <b>(kV/cm)</b>	<b>t</b> <b>(µs)</b>	<b>T<sub>max</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>σ</b> <b>(mS/cm)</b>	<b>Q</b> <b>(J/mL)</b>	<b>W</b> <b>(J/mL/pulso)</b>
0	–	22	2.99	0.00	0.00
15	40	34.5	3.89	35.04	2.19
15	80	36.5	4.04	72.69	2.27
15	130	38.0	4.15	121.31	2.33
15	300	44.5	4.62	311.81	2.60
15	500	54.5	5.35	601.36	3.01
15	700	59	5.67	893.36	3.19
0	–	22	2.99	0.00	0.00
25	40	37.5	4.11	102.78	6.42
25	80	40.5	4.33	216.45	6.76
25	130	44.5	4.62	375.33	7.22
25	200	51.5	5.13	640.95	8.01
25	280	57.0	5.53	967.21	8.64
25	310	59.0	5.67	1098.97	8.86
0	–	22	2.99	0.00	0.00
35	40	40	4.29	210.34	13.15
35	60	44	4.58	336.86	14.04
35	80	47	4.80	470.49	14.70
35	100	51	5.09	623.68	15.59
35	130	59	5.67	903.28	17.37
35	180	62.6	6.29	1387.91	19.28
0	–	22	2.99	0.00	0.00
40	40	42.5	4.47	286.35	17.90
40	60	47.5	4.84	464.37	19.35
40	80	52.5	5.20	665.63	20.80
40	90	54.5	5.35	769.74	21.38
40	110	55.4	5.41	952.66	21.65
40	130	62.1	5.90	1227.26	23.60



### **3.2.3. Tratamiento térmico.**

El tratamiento por pasterización se lleva a cabo en un intercambiador de placas modelo ARMFIELD FT74P. La bebida es impulsada por una bomba desde el tanque de alimentación hacia el intercambiador de calor, donde se alcanzan las condiciones de tratamiento seleccionadas (90 °C, 20 s). Después del tratamiento, la bebida es enfriada con agua proveniente de un sistema refrigerador (ARMFIELD FT61), se empaqueta y se almacena hasta el momento del análisis. El tratamiento térmico seleccionado es similar al que normalmente se aplica en la industria (90-99 °C durante 15-30 s) (Braddock, 1999).

### **3.2.4. Análisis de compuestos bioactivos.**

3.2.4.1. Vitamina C. (Ver capítulo 1, apartado 1.2.3.1).

3.2.4.2. Perfil de Carotenoides y Vitamina A. (Ver capítulo 1, apartado 1.2.3.2).

3.2.4.3. Fenoles solubles totales. (Ver capítulo 1, apartado 1.2.3.3).

3.2.4.4. Capacidad Antioxidante Total. Debido a una mayor revisión de la bibliografía se actualizó el método utilizado hasta el momento por el descrito por Re *et al.* (1999) que presenta ciertas modificaciones respecto al anterior.

#### 3.2.4.4.1. Material y Reactivos:

- Material de uso corriente en el laboratorio.
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Sigma-Aldrich.
- Etanol, 99.5%, J.T.Baker.

#### 3.2.4.4.2. Instrumentación:

- Baño termostático conectado al espectrofotómetro, Julabo UC 5B (Julabo, Seelbach/Black Forest)

3.2.4.4.3. Preparación de los reactivos:

- *Radical ABTS<sup>•+</sup>*: Para la preparación del radical ABTS<sup>•+</sup>, se parte de una solución madre que se prepara mediante la adición de 440 µl de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (140 mM) a 25 ml de ABTS (7 mM). La solución se deja reposar durante 12-16 h en oscuridad a temperatura ambiente para conseguir la formación completa del radical. El radical ABTS<sup>•+</sup> así conservado es estable durante un periodo de dos días.

A partir de la solución madre se prepara la solución de trabajo mediante dilución de 1 mL de ésta en etanol hasta que su absorbancia a 734 nm sea de  $0.70 \pm 0.02$  a 30°C.

3.2.4.4.4. Modo operatorio:

Para cada determinación se prepara una recta patrón mediante diluciones en serie a partir de una disolución de Trolox 5 mM en etanol (31.25 mg de Trolox en 25 mL de etanol) tal y como se indica en el Cuadro nº 21.

**Cuadro nº 21.** Preparación de la curva calibración de Trolox.

Concentración (mM)	Trolox (mL)	Etanol (mL)
0	0	10
50	0.1	10
100	0.2	10
150	0.3	10
200	0.4	10
250	0.5	10

Se conecta el espectrofotómetro a  $\lambda=734$  nm y el baño a T=30°C. La reacción de inhiación del radical ABTS<sup>•+</sup> se da en la propia cubeta de medida. Para ello se añaden 2 ml de la solución de trabajo del radical ABTS<sup>•+</sup> y se mide la absorbancia inicial (A<sub>0</sub>) que deberá situarse en  $0.70 \pm 0.02$ . A continuación se

adicionan 0.1 ml de la disolución patrón y se mide a los 3 min ( $A_f$ ). El porcentaje de inhibición se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = (1 - A_f/A_0) * 100$$

donde  $A_0$  es la absorbancia a tiempo inicial (previa adición del patrón) y  $A_f$  es la absorbancia obtenida al tiempo fijado de lectura.

Por otro lado la muestra debe diluirse previamente de manera que el valor obtenido se sitúe dentro de la recta de calibración. Para ello se testean previamente diversas diluciones de la bebida en agua bidestilada (1/10, 1/25, 1/50, 1/75, 1/100) ya que puede existir variabilidad en las concentraciones de antioxidantes presentes de una muestra a otra.

Posteriormente se calcula el % de inhibición para las muestras ensayadas y se interpola el valor obtenido en la recta de calibración para determinar los equivalentes de Trolox (mmol TE/L).

### 3.2.5 Análisis físico-químicos.

3.2.5.1. pH (ver capítulo 1, apartado 1.2.2.1)

3.2.5.2. °Brix (ver capítulo 1, apartado 1.2.2.2)

3.2.5.3. Color (ver capítulo 1, apartado 1.2.2.4). En este caso para evaluar los posibles cambios de color debidos al tratamiento térmico aplicado se calculan las diferencias de color ( $\Delta E$ ) de las muestras tratadas respecto a las bebidas sin tratar mediante aplicación de la siguiente expresión (Calvo, 2004):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son las diferencias de color entre el punto 0 (bebida sin tratar) y el punto t (posterior al tratamiento).

### 3.2.6. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se analizan estadísticamente mediante el programa SPSS v.15® (SPSS Inc., Chicago, USA). Para aquellas variables con más de dos niveles se aplica un análisis de la varianza (ANOVA) aplicando un ajuste por mínimos cuadrados (LSD). Por otro lado, para conocer el impacto de los diferentes parámetros del tratamiento ( $T_{max}$  alcanzada, tiempo y campo eléctrico) sobre las concentraciones de los diversos compuestos bioactivos de la bebida, se realiza un análisis de regresión lineal. Para conocer la posible relación entre dos variables se establecen correlaciones bivariadas. El límite de significatividad se establece en  $p < 0.05$ .

## 3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.3.1. pH y °Brix.

Las muestras control presentan un valor de pH de  $4.01 \pm 0.07$  y  $13.9 \pm 0.14$  °Brix. Tras la aplicación de los diversos tratamientos por PEAI, ambos parámetros se mantienen sin variaciones estadísticamente significativas (Cuadro nº 22). Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Cortés *et al.* (2005) que observan en muestras de horchata tratadas por PEAI (20-35 kV/cm, 100-300  $\mu$ s) que la aplicación de estos tratamientos no producen cambios en los valores de pH y Flourey *et al.* (2006) que no encuentran cambios en los valores de pH para muestras de leche tratadas a diferentes temperaturas y tiempos de tratamiento. Del mismo modo, Yeom *et al.* (2000) y Cserhalmi *et al.* (2006) para zumo de naranja tratado por PEAI (35 kV/cm, 59  $\mu$ s y 28 kV/cm, 50  $\mu$ s, respectivamente) observan que no existen cambios en los valores de pH. Sin embargo, Cserhalmi *et al.* (2006) observan que tras el tratamiento por PEAI (28 kV/cm, 50  $\mu$ s), los °Brix del zumo de naranja se reducen de manera significativa ( $p < 0.05$ ).

Por otro lado, tras el tratamiento por pasterización, los valores de pH aumentan significativamente respecto a los de la bebida sin tratar ( $3.88 \pm 0.01$  vs  $3.82 \pm 0.01$ ) aunque dicha variación es prácticamente insignificante. Los °Brix se

mantienen sin modificaciones significativas ( $14.0 \pm 0.05^\circ\text{Brix}$ ). Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Rivas *et al.* (2006) que observan que tras la pasterización de zumo de naranja-zanahoria, se produce un ligero incremento no significativo ( $p > 0.05$ ) en los valores de pH (de 3.83 a 3.85). Sin embargo, Élez-Martínez *et al.* (2006) no encuentran cambios en los  $^\circ\text{Brix}$  o pH tras el tratamiento por calor ( $90^\circ\text{C}$ , 60 s) para el zumo de naranja.

**Cuadro nº 22.** Valores de pH y °Brix de las bebidas de zumo de naranja y leche tras el tratamiento por PEAI.

E (kV/cm)	T (µs)	T <sub>max</sub> (°C)	pH	°Brix
0	–	22	4.03±0.01	13.9±0.1
15	40	34.5	4.03±0.01	13.9±0.1
15	80	36.5	4.04±0.01	13.9±0.1
15	130	38.0	4.03±0.01	13.9±0.1
15	300	44.5	4.03±0.01	13.9±0.1
15	500	54.5	4.04±0.00	13.9±0.1
15	700	59	4.04±0.02	13.9±0.1
25	–	22	4.05±0.04	13.9±0.1
25	40	37.5	4.01±0.02	13.9±0.1
25	80	40.5	4.00±0.01	13.9±0.2
25	130	44.5	4.03±0.04	13.9±0.0
25	200	51.5	4.02±0.02	14.0±0.0
25	280	57.0	4.02±0.01	14.0±0.0
25	310	59.0	4.01±0.02	14.0±0.0
35	–	22	3.91±0.04	13.9±0.1
35	40	40	3.89±0.05	13.9±0.1
35	60	44	3.88±0.01	13.9±0.1
35	80	47	3.89±0.00	13.9±0.1
35	100	51	3.88±0.00	13.9±0.1
35	130	59	3.88±0.01	13.9±0.1
35	180	62.6	3.87±0.00	13.9±0.1
40	–	22	4.05±0.01	13.9±0.1
40	40	42.5	4.04±0.01	13.9±0.1
40	60	47.5	4.04±0.01	13.9±0.1
40	80	52.5	4.06±0.00	13.9±0.1
40	90	54.5	4.03±0.03	13.9±0.1
40	110	55.4	4.03±0.04	13.9±0.1
40	130	62.1	4.04±0.03	13.9±0.1

### 3.3.2. Ácido ascórbico.

La concentración de ácido ascórbico en el producto sin tratar es de  $26.35 \pm 1.35$  mg/100 mL y tras el tratamiento por pasterización la concentración obtenida es de  $22.66 \pm 1.42$  mg/100 mL, siendo la retención del ácido acórbico de alrededor del 86%. El Cuadro nº 23 muestran las concentraciones de ácido ascórbico obtenidas tras los diversos tratamientos por PEAI. Las retenciones de ácido ascórbico después del tratamiento por pulsos son siempre mayores que las obtenidas tras la pasterización siendo la mínima retención alcanzada del 90%. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Torregrosa *et al.* (2005) que tras tratar zumo de naranja-zanahoria mediante PEAI (25 kV/cm, 280  $\mu$ s) encuentran una retención de ácido ascórbico del 90% mientras que la alcanzada tras la pasterización (98°C, 21 s) es del 83%. De acuerdo con estos resultados, Élez-Martínez *et al.* (2007) tras pasterizar (90°C, 1 min) zumo de naranja encuentran una retención de ácido ascórbico del 82.4% mientras que la retención tras el tratamiento por PEAI es del 87.5-98.2%. Sánchez-Moreno *et al.* (2005) también encuentran mayores retenciones de ácido ascórbico (93%) en el zumo de naranja tratado por PEAI (35 kV/cm, 750  $\mu$ s) en comparación con el mismo zumo tratado por pasterización (90°C, 1 min) (91.96%) y Min *et al.* (2003) cuando pasterizan zumo de naranja (90°C, 90 s) encuentran una retención de ácido ascórbico del 81% mientras que la aplicación de los PEAI (40 kV/cm, 97  $\mu$ s) no produce cambios significativos en las concentraciones de dicha vitamina.

**Cuadro nº 23.** Concentraciones de ácido ascórbico (mg/100 mL) de las bebidas de zumo de naranja y leche tras el tratamiento por PEAI.

<b>E</b> <b>(kV/cm)</b>	<b>t</b> <b>(µs)</b>	<b>T<sub>max</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>Ácido ascórbico</b> <b>(mg/100 mL)</b>
0	0	22	24.55 ± 0.41
15	40	34.5	23.96 ± 0.56
15	80	36.5	23.76 ± 0.72
15	130	38.0	23.42 ± 0.38
15	300	44.5	22.97 ± 0.67
15	500	54.5	22.70 ± 0.58
15	700	59	22.66 ± 1.03
0	0	22	22.72 ± 0.84 <sup>a</sup>
25	40	37.5	22.04 ± 0.28 <sup>ab</sup>
25	80	40.5	21.63 ± 0.23 <sup>abc</sup>
25	130	44.5	21.22 ± 0.31 <sup>bc</sup>
25	200	51.5	21.07 ± 0.35 <sup>bc</sup>
25	280	57.0	20.97 ± 1.32 <sup>bc</sup>
25	310	59.0	20.92 ± 0.89 <sup>c</sup>
0	0	22	26.98 ± 0.47 <sup>a</sup>
35	40	40	26.03 ± 0.99 <sup>ab</sup>
35	60	44	25.88 ± 1.37 <sup>b</sup>
35	80	47	25.66 ± 0.75 <sup>b</sup>
35	100	51	25.28 ± 0.67 <sup>b</sup>
35	130	59	25.05 ± 0.51 <sup>b</sup>
35	180	62.6	25.01 ± 0.48 <sup>b</sup>
0	0	22	26.40 ± 0.21
40	40	42.5	25.40 ± 0.56
40	60	47.5	25.22 ± 0.37
40	80	52.5	24.98 ± 0.65
40	90	54.5	24.71 ± 0.64
40	110	55.4	24.48 ± 0.92
40	130	62.1	24.39 ± 1.03

<sup>a-c</sup> diferente superíndice indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras en función del tiempo de tratamiento

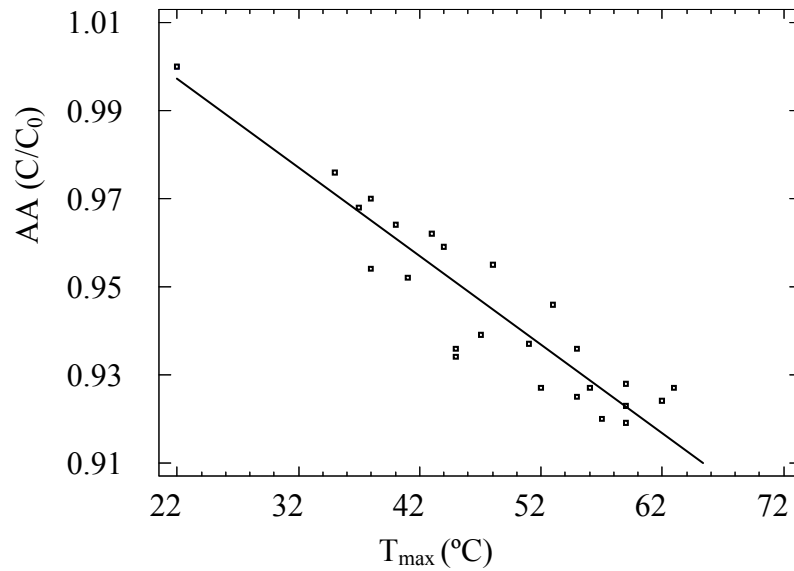
La concentración residual de ácido ascórbico después del tratamiento por PEAI se define como  $C/C_0$  donde  $C$  es la concentración de ácido ascórbico después del tratamiento (mg/100 mL) y  $C_0$  es la concentración inicial de ácido ascórbico (mg/100 mL).



Con objeto de analizar la influencia de la intensidad de campo eléctrico ( $E$ , kV/cm), longitud de pulso ( $t$ ,  $\mu\text{s}$ ) y temperatura máxima alcanzada ( $T_{\text{max}}$ ,  $^{\circ}\text{C}$ ) durante el tratamiento por PEAI sobre las concentraciones de ácido ascórbico ( $C/C_0$ ) se realiza un ajuste por mínimos cuadrados obteniendo el siguiente modelo ( $p < 0.01$ ):

$$C/C_0 = 1.04 - 2.1 \cdot 10^{-3} \cdot T_{\text{max}}$$

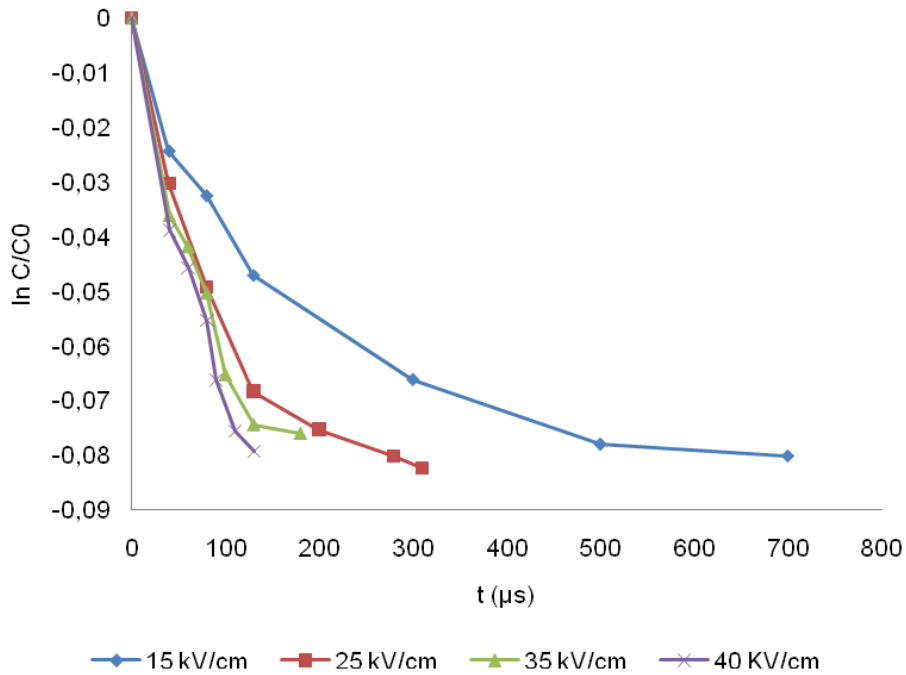
El valor de  $R^2$  indica que el modelo explica el 93% de los resultados obtenidos experimentalmente. A partir del análisis realizado se deduce que el factor determinante en la degradación del ácido ascórbico es la temperatura máxima alcanzada ( $^{\circ}\text{C}$ ) durante el tratamiento existiendo una correlación estadísticamente significativa entre ambos parámetros (Figura nº 24)



**Figura nº 24.** Ajuste del modelo de degradación del ácido ascórbico durante el tratamiento por PEAI en la bebida de zumo de naranja y leche.

La Figura nº 25 muestra la variación del ácido ascórbico residual ( $\ln [C/C_0]$ ) frente a los diferentes tiempos de tratamiento aplicados ( $\mu\text{s}$ ). Cada uno de los

valores es la media de un triplicado de dos muestras tratadas independientemente. Los datos experimentales de cada campo eléctrico ajustan a un modelo exponencial del tipo:  $C/C_0 = a \cdot e^{-bt}$ .



**Figura nº 25.** Cinética de degradación del ácido ascórbico para los diferentes tratamientos por PEAI aplicados.

Hasta la fecha, diversos autores han estudiado las cinéticas de degradación térmica del ácido ascórbico en diferentes tipos de alimentos encontrando que éstas ajustan a un modelo de primer orden (Johnson *et al.* 1995; Esteve *et al.* 1998, 1999; Blasco *et al.* 2004; Nisha *et al.* 2004). Sin embargo, para tratamientos por PEAI, Torregrosa *et al.* (2006) encuentran para zumo de naranja-zanahoria (25, 30, 35 y 40 kV/cm, desde 30 a 340 μs) que la cinética de degradación del ácido ascórbico es de orden cero, mientras Bendicho *et al.* (2002b) para leche desnatada y leche desnatada ultrafiltrada tratadas por PEAI (18.3-27.1 kV/cm) encuentran que la cinética de degradación del ácido ascórbico es de primer orden. Como apunta Tannenbaum (1976) los

mecanismos de degradación del ácido ascórbico son específicos para cada alimento en particular ya que estos dependen de diferentes factores que varían según la composición del mismo y por tanto es importante realizar estudios de retención en cada tipo de alimento.

La constante de degradación ( $k_E$ ) se obtiene de la pendiente de la curva obtenida al representar el  $\ln C/C_0$  frente al tiempo de tratamiento ( $t$ ,  $\mu s$ ) de cada uno de los campos aplicados  $\ln (C/C_0) = a - k_E t$ . Las  $k_E$  obtenidas se muestran en el Cuadro nº24. Entre paréntesis se indica la desviación estándar.

**Cuadro nº 24.** Constantes de degradación del ácido ascórbico ( $k_E$ ) tras los diferentes tratamientos por PEAL.

E (kV/cm)	$k_E$ ( $\mu s$ )	$R^2$
15	$-0.11 \cdot 10^{-3} \pm 0.03 \cdot 10^{-3}$ (0.014)	90.0*
25	$-0.23 \cdot 10^{-3} \pm 0.07 \cdot 10^{-3}$ (0.015)	90.3*
35	$-0.42 \cdot 10^{-3} \pm 0.09 \cdot 10^{-3}$ (0.012)	91.6*
40	$-0.60 \cdot 10^{-3} \pm 0.06 \cdot 10^{-3}$ (0.005)	98.1*

\* $p < 0.01$

Torregrosa *et al.* (2006) para zumo de naranja-zanahoria tratado por PEAL obtienen las siguientes  $k_E$ :  $-0.37 \cdot 10^{-3} \pm 0.03 \cdot 10^{-3} \mu s^{-1}$ ,  $-0.41 \cdot 10^{-3} \pm 0.05 \cdot 10^{-3} \mu s^{-1}$ ,  $1.20 \cdot 10^{-3} \pm 0.05 \cdot 10^{-3} \mu s^{-1}$  y  $-0.91 \cdot 10^{-3} \pm 0.10 \cdot 10^{-3} \mu s^{-1}$  para campos de 25, 30, 35 y 40 kV/cm, respectivamente mientras que Cortés *et al.* (2008a) obtienen para zumo de naranja tratado por PEAL las siguientes  $k_E$ :  $-0.46 \cdot 10^{-3} \pm 0.12 \cdot 10^{-3}$ ,  $-0.51 \cdot 10^{-3} \pm 0.04 \cdot 10^{-3}$ ,  $-0.79 \cdot 10^{-3} \pm 0.08 \cdot 10^{-3}$ ,  $-0.94 \cdot 10^{-3} \pm 0.11 \cdot 10^{-3} \mu s^{-1}$ , para los campos 25, 30, 35 y 40 KV/cm, respectivamente.

Las diferencias observadas entre las constantes de degradación de las distintas muestras puede deberse a las características físico-químicas de los diferentes productos que afectan a la cinética de degradación del ácido ascórbico. La concentración inicial de ácido ascórbico en el zumo de naranja-zanahoria ( $27.11 \pm 0.44$  mg/100 mL) y el pH ( $3.87 \pm 0.05$ ) son similares a los de la

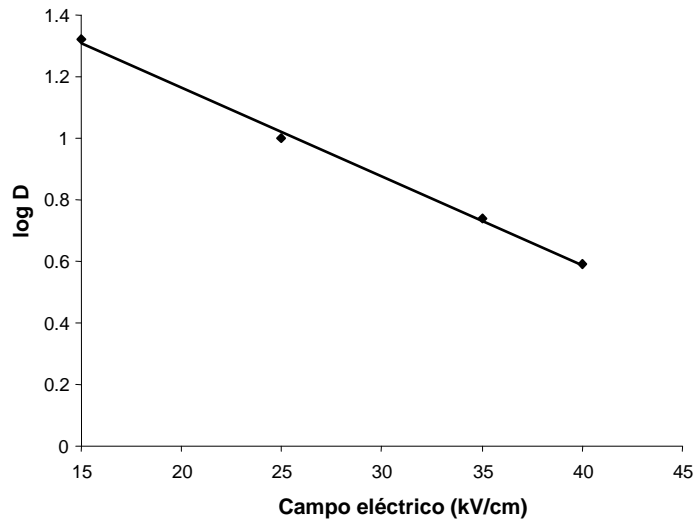
mezcla zumo-leche (26.35±1.35 mg/100 mL y 4.02±0.04, respectivamente) mientras que la concentración de ácido ascórbico en el zumo de naranja es superior (47.56±1.36 mg/100 mL) y el pH es más ácido (3.34±0.01). Sin embargo, el factor determinante entre ellos es la conductividad que, difiere entre los tres productos siendo menor para la bebida de zumo de naranja y leche (2.99 mS/cm), seguida del zumo de naranja (3.42 mS/cm) y del zumo naranja-zanahoria (4.55 mS/cm) correspondiéndose con el grado de degradación de la vitamina C en las muestras. Debido a que un cambio en la conductividad eléctrica del alimento afecta a la energía (J/L) aplicada durante el tratamiento por pulsos, se estudia la influencia de los parámetros de energía en este estudio de degradación del ácido ascórbico. Tomando en consideración la fórmula:  $W=\sigma\cdot\tau\cdot E^2$ , una mayor conductividad resulta en una mayor energía aplicada al producto (J/L) pudiendo por tanto afectar en mayor grado a las concentraciones de ácido ascórbico.

Por otro lado, la mayor complejidad de la matriz de la bebida a base de zumo y leche puede ser otro factor determinante en la degradación del AA durante el tratamiento de conservación, ya que para esta bebida, Sampedro *et al.* (2007) encuentran que la inactivación alcanzada por pulsos para *L. plantarum* es menor que la encontrada por otros autores para productos de una composición menos compleja. Bendicho *et al.* (2002a) encuentran que las retenciones de vitamina C en leche desnatada son mayores tras el tratamiento por PEAI que para leche desnatada ultrafiltrada debido a una mayor complejidad de composición de la primera y al papel de protección que ciertos componentes de la leche como proteínas, sobretodo caseínas, tienen en la degradación de la vitamina C. El mismo efecto protector de la caseína frente a la inactivación de microorganismos y enzimas fue descrito por Goff y Hill (1993) y Vega-Mercado *et al.* (1996). Además, algunos autores han señalado que el contenido en grasa de los alimentos puede suponer una barrera frente a la inactivación de microorganismos protegiéndolos del tratamiento por pulsos eléctricos aunque los mecanismos de este efecto todavía no han sido

elucidados (Min *et al.* 2002) y hasta la fecha no se han encontrado trabajos similares para vitaminas.

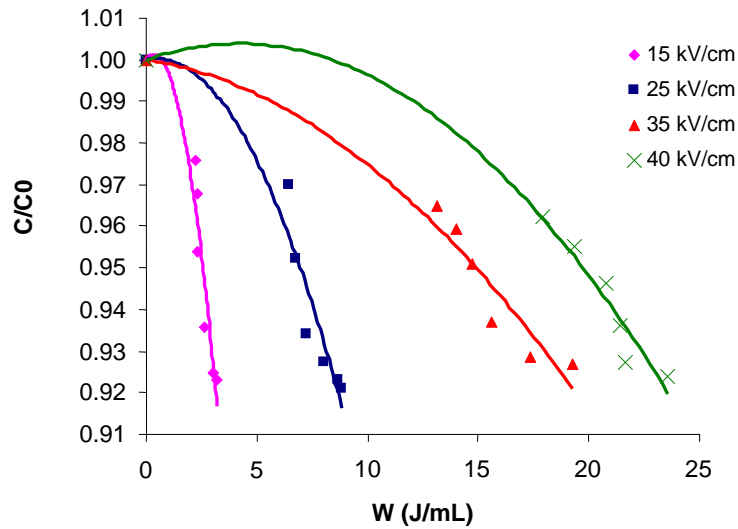
El valor de  $D$  (tiempo requerido, a una determinada intensidad de campo, para reducir en un 10% la concentración inicial de ácido ascórbico) se calcula usando un procedimiento análogo al empleado en los estudios de destrucción térmica, a partir de la expresión:  $D=2.303/k_E$ , obteniendo para los diferentes tratamientos aplicados los siguientes valores de  $D$ : 20.9 ms, 10.0 ms, 5.5 ms y 3.9 ms para los campos 15, 25, 35 y 40 kV/cm, respectivamente. A la vista de los resultados, se deduce que el valor de  $D$  disminuye con el incremento del campo eléctrico aplicado, es decir, que la aplicación de un campo eléctrico mayor, resulta en una mayor degradación del ácido ascórbico tal y como cabe esperar.

A partir de los valores de  $D$ , se obtiene el valor de  $Z_E$  (parámetro de sensibilidad a la intensidad de campo eléctrico), que representa el incremento de la intensidad de campo (kV/cm) requerido para que la velocidad de degradación del ácido ascórbico disminuya 10 veces, calculándose como la inversa negativa de la curva de destrucción al representar el log  $D$  frente al campo eléctrico aplicado ( $E$ , kV/cm) (Figura nº 26), obteniendo que  $Z_E= 34.7$  kV/cm ( $R^2$ : 0.998, error estándar: 0.086,  $P < 0.01$ ). Para microorganismos, Álvarez *et al.* (2003) encuentran un valor de  $Z_E$  de 14.8 kV/cm para *Salmonella* Enteritidis y de 16.3 kV/cm para *Salmonella* Typhimurium suspendidos en tampón citrato-fosfato tratado por PEAI. Gómez *et al.* (2005) encuentran para *Lactobacillus plantarum* un valor de  $Z_E$  de 9.1 kV/cm en zumos mezcla de naranja y manzana tratados por PEAI. Respecto a la inactivación de enzimas, Zhong *et al.* (2007) encuentran valores de  $Z_E$  de 36.9 kV/cm para peroxidasa y 16.2 kV/cm para polifenol oxidasa en sistemas tampón. Con estas observaciones puede apuntarse que la degradación del ácido ascórbico es menor que la obtenida para microorganismos y algunas enzimas.



**Figura nº 26.** Regresión lineal de los valores logarítmicos de reducción decimal (log D) respecto al campo eléctrico (kV/cm).

En la Figura nº 27 se observa que, a una energía de pulso constante (W), un incremento en el campo eléctrico aplicado supone un incremento en la constante de degradación del ácido ascórbico. El análisis de regresión realizado indica una degradación del ácido ascórbico con la energía de pulso que se ajusta a un modelo polinomial (Cuadro nº 25). Cuando el tiempo de tratamiento es constante, el aumento de la intensidad de campo eléctrico aplicado supone un incremento en la conductividad eléctrica y por tanto en la degradación del ácido ascórbico.



**Figura nº 27.** Degradación del ácido ascórbico ( $C/C_0$ ) con la energía ( $W$ ) aplicada durante el tratamiento.

**Cuadro nº 25.** Variación de las concentraciones de ácido ascórbico (mg/100 mL) según la energía aplicada ( $W$ , J/mL).

E (kV/cm)	Ecuación	R <sup>2</sup>
15	$-0.0105x^2 + 0.0074x + 1$	92.5*
25	$-0.0012x^2 + 0.0011x + 1$	93.5*
35	$-0.0002x^2 - 0.0008x + 1$	95.1*
40	$-0.0002x^2 + 0.0019x + 1$	97.2*

\*  $p < 0.05$

La energía aplicada en cada tratamiento, dependerá del tipo de alimento líquido debido a cambios en su conductividad. Es por ello que para poder comparar el efecto de los PEAI sobre diferentes matrices es necesario estimar la energía aplicada ( $Q$ , J/mL) para cada uno de ellas, de esta manera se podrá estimar el efecto de la matriz al aplicar un tratamiento por PEAI.

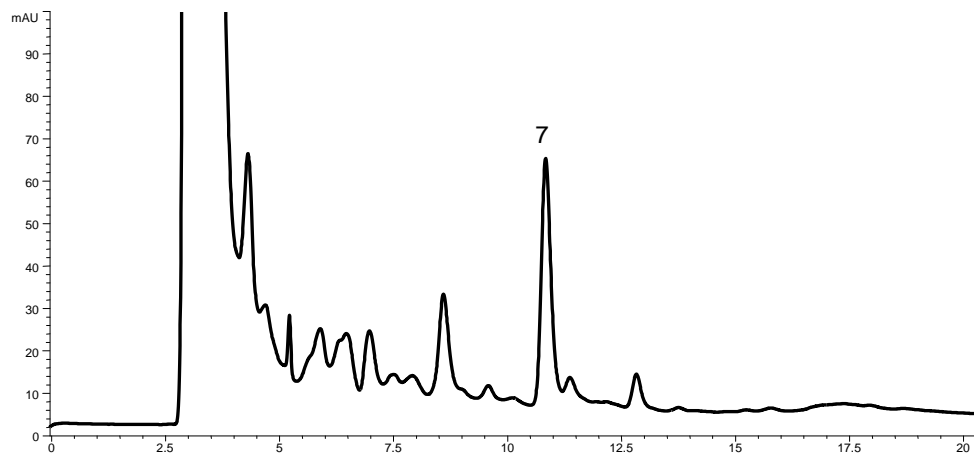
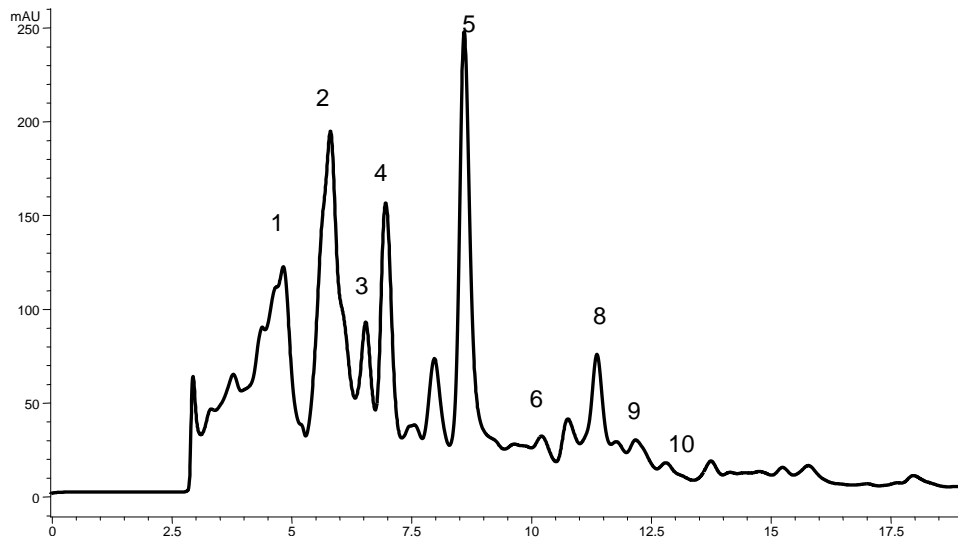
Tras realizar un análisis por mínimos cuadrados, se obtiene que la degradación del ácido ascórbico con respecto a la energía aplicada  $Q$  (J/mL)

ajusta al siguiente modelo:  $\ln(C/C_0) = -0.0236 - 6 \cdot 10^{-5} Q$  ( $R^2 = -0.716$ , error = 0.016). Como puede observarse, la pendiente de la curva es muy pequeña por lo que, la degradación del ácido ascórbico durante el tratamiento es mínima y se produce de forma lenta. La mayor estabilidad del ácido ascórbico en este producto, puede deberse a los parámetros físico-químicos comentados así como a la adición de ácido cítrico (0.1%) en la preparación de la bebida ya que este último posee capacidad acidulante y quelante la cual le permite actuar como coadyuvante de la estabilidad química del ácido ascórbico a través de la disminución del pH y de la quelación de iones metálicos que de otra forma interactuarían con el ácido ascórbico (Liao y Seib, 1987; Millán y Roa, 2001).

### **3.3.3. Carotenoides.**

La Figura nº 28 muestran el perfil de carotenoides obtenido para la bebida sin tratar y en el Cuadro nº 26 se muestran los tiempos de retención de los picos detectados.





**Figura nº 28.** Cromatograma de la bebida de zumo de naranja y leche sin tratar a  $\lambda=290$  nm y  $\lambda= 450$  nm.

**Cuadro nº 26.** Longitudes de onda y tiempos de retención de los carotenoides detectados en las bebidas de zumo de naranja y leche.

Pico	Carotenoide	$\lambda$ (nm)	Zumo naranja-leche
			$t_R$ (min) $\pm$ SD
1	Zeinoxantina+9- <i>cis</i> -violaxantina	430	5.11 $\pm$ 0.11
2	Mutatoxantina	430	6.16 $\pm$ 0.15
3	Luteina	450	6.89 $\pm$ 0.12
4	Zeaxantina	450	7.24 $\pm$ 0.11
5	$\beta$ -criptoxantina	450	9.08 $\pm$ 0.13
6	$\alpha$ -caroteno	450	10.51 $\pm$ 0.14
7	Fitoeno+fioflueno	290	11.49 $\pm$ 0.09
8	$\beta$ -caroteno	450	12.30 $\pm$ 0.10
9	$\zeta$ -caroteno	430	12.64 $\pm$ 0.07
10	15- <i>cis</i> - $\beta$ -caroteno	450	13.43 $\pm$ 0.03

En los Cuadros nº 27, nº 28, nº 29 y nº 30 se indican los resultados obtenidos para los carotenoides presentes en la bebida, el total de carotenoides y la cantidad de vitamina A estimada tras el tratamiento por PEAI. Los resultados son la media de dos repeticiones por cada tratamiento aplicado y cada tratamiento realizado a su vez por duplicado en diferentes sesiones.

**Cuadro nº 27.** Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A (RAE) en la bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI a  $E=15\text{ kV/cm}$ .

Tiempo ( $\mu\text{s}$ )	0	40	80	130	300	500	700
$T_{\text{max}}$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	0	35	37	40	47	57	65
Zeinoxantina+9-cis-violaxantina	64.06	66.54	65.83	53.75	51.82	50.15	53.03
Mutatoxantina	56.36	54.98	53.74	54.17	57.16	54.51	56.26
Luteína	13.91	13.53	14.01	13.25	18.20	16.16	15.68
Zeaxantina	29.77	30.08	31.82	30.35	38.36	36.29	32.38
$\beta$ -cryptoxantina	76.80	77.74	78.99	85.23	94.55	95.54	96.47
$\alpha$ -caroteno	12.22	12.39	11.98	9.29	8.42	7.98	7.88
Fitoeno+fitoflueno	10.94	10.47	10.33	10.61	10.40	9.84	10.06
$\beta$ -caroteno	16.70	18.90	19.02	19.83	16.36	17.12	16.76
$\zeta$ -caroteno	5.38	6.41	6.28	6.32	6.37	6.09	8.12
15-cis- $\beta$ -caroteno	3.94	4.06	6.77	4.56	5.02	3.32	5.90
Carot totales ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	509.88	493.72	536.20	528.27	571.68	603.53	578.61
Vitamina A (RAE)	5.11	5.34	5.38	5.59	5.65	5.74	5.69

**Cuadro nº 28.** Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamin A (RAE) en la bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI a  $E= 25 \text{ kV}/\text{cm}$ .

<b>Tiempo (<math>\mu\text{s}</math>)</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>130</b>	<b>200</b>	<b>280</b>	<b>310</b>
<b>T<sub>max</sub> (°C)</b>	<b>0</b>	<b>38</b>	<b>42.5</b>	<b>48</b>	<b>54</b>	<b>63</b>	<b>65</b>
Zeinoxantina+9-cis-violaxantina	83.26	81.73	79.02	82.58	74.48	74.36	78.52
Mutatoxantina	71.56	68.07	70.93	68.37	61.39	62.71	66.25
Luteína	17.49	16.53	17.23	16.94	14.88	15.92	16.10
Zeaxantina	33.05	32.42	33.67	31.25	33.74	31.38	31.42
$\beta$ -cryptoxantina	83.82	89.43	91.07	89.51	84.59	86.61	87.57
$\alpha$ -caroteno	9.98	10.75	10.99	7.12	7.02	6.98	7.03
Fitoeno+Fitoflueno	7.70	7.29	7.47	6.81	7.56	7.36	7.44
$\beta$ -caroteno	14.86	12.48	14.03	14.25	14.99	15.08	15.89
$\zeta$ -caroteno	7.08	6.95	7.06	6.00	6.00	5.68	5.52
15-cis- $\beta$ -caroteno	4.41	4.95	4.17	3.97	3.99	3.70	3.75
Carot. Totales ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	516.62	523.36	517.74	469.95	516.72	486.31	491.43
Vitamina A (RAE)	5.14	5.21	5.41	5.21	5.06	5.16	5.27

**Cuadro nº 29.** Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A (RAE) en las bebidas de zumo de naranja y leche PEAl a  $E=35\text{ kV/cm}$ .

Tiempo ( $\mu\text{s}$ )	0	40	60	80	100	130	180
T <sub>max</sub> (°C)	0	40	44	47	51	58.5	67
Zeinoxantina+9-cis-violaxantina	96.24	100.59	99.71	119.53	105.84	82.22	81.26
Mutatoxantina	77.18	77.65	75.43	86.02	70.94	70.89	71.19
Luteina	18.95	18.18	18.65	18.52	17.22	19.08	18.58
Zeaxantina	44.65	42.15	43.78	43.72	43.50	44.77	41.50
$\beta$ -cryptoxantina	97.97	97.25	102.88	97.34	107.44	106.76	103.60
$\alpha$ -caroteno	6.75	7.19	5.78	5.18	4.92	4.61	4.90
Fitoeno+Fitoflueno	7.88	8.81	8.41	9.48	9.15	8.69	7.37
$\beta$ -caroteno	16.89	15.36	16.56	16.33	18.45	16.36	15.97
$\zeta$ -caroteno	4.62 <sup>a</sup>	5.02 <sup>a</sup>	6.44 <sup>b</sup>	6.55 <sup>b</sup>	5.09 <sup>b</sup>	8.39 <sup>b</sup>	6.62 <sup>b</sup>
15-cis- $\beta$ -caroteno	4.55	5.50	5.83	6.10	7.77	6.79	6.41
Carot. totales ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	556.75	596.37	585.79	615.81	643.20	531.96	539.95
Vitamin A (RAE)	5.77	5.63	5.91	5.69	6.22	6.00	5.85

<sup>a-b</sup> diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p<0.05$ ) según el tiempo de tratamiento ( $\mu\text{s}$ ) aplicado.

**Cuadro nº 30.** Concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) y vitamina A (RAE) en la bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEAI a 40 kV/cm.

<b>Tiempo (<math>\mu\text{s}</math>)</b>	<b>0</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>90</b>	<b>100</b>	<b>130</b>
<b>T<sub>max</sub> (°C)</b>	<b>0</b>	<b>42.5</b>	<b>47.5</b>	<b>52.5</b>	<b>54.5</b>	<b>58</b>	<b>63</b>
Zeinoxantina+9-cis-violaxantina	89.35	88.52	83.41	83.47	89.62	87.75	93.20
Mutatoxantina	73.35	68.93	69.64	68.89	68.38	71.58	68.50
Luteina	19.45	17.63	17.58	17.47	17.53	17.41	17.57
Zeaxantina	45.78	42.70	42.54	41.35	41.61	42.43	41.59
$\beta$ -cryptoxantina	91.41	98.45	101.43	99.20	101.97	106.59	104.76
$\alpha$ -caroteno	6.24	6.72	5.82	4.37	4.64	5.06	4.08
Fitoeno+fitoflueno	7.82	7.40	7.77	6.71	7.66	7.19	7.84
$\beta$ -caroteno	16.57	15.89	16.31	13.85	14.19	14.54	15.37
$\zeta$ -caroteno	5.63	4.17	4.53	6.39	6.22	6.02	7.55
15-cis- $\beta$ -caroteno	2.22	3.43	3.94	3.04	3.44	2.61	3.32
Carot. totales ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ )	535.39	513.88	527.09	500.60	515.11	517.96	508.06
Vitamina A (RAE)	5.45	5.71	5.83	5.47	5.62	5.86	5.82

Para conocer la influencia del campo eléctrico (E, kV/cm), tiempo de tratamiento (t,  $\mu\text{s}$ ) y temperatura máxima alcanzada (T<sub>máx</sub>, °C) sobre la variación de la concentración total de carotenoides (C/C<sub>0</sub>) se aplica un análisis de regresión lineal observando que sólo el campo eléctrico influye ligeramente sobre dichas concentraciones. Con objeto de evaluar las diferencias entre los distintos campos ensayados, se realiza un análisis de la varianza (ANOVA) encontrándose diferencias estadísticamente significativas para E=15 kV/cm de manera que, la concentración total de carotenoides se incrementa ligeramente

( $C/C_0=1.15$ ) con el tiempo de tratamiento y para  $E=40$  kV/cm donde por el contrario, la concentración total de carotenoides disminuye ligeramente ( $C/C_0=0.96$ ) con el tiempo de tratamiento. Para  $E=15$  kV/cm se encuentra un incremento significativo en el total de carotenoides a tiempos de 300 y 500  $\mu$ s debido al aumento en las concentraciones de  $\beta$ -cryptoxantina a partir de 130  $\mu$ s; luteína y zeaxantina para tratamientos superiores a 300  $\mu$ s y 15-cis- $\beta$ -caroteno desde 40  $\mu$ s ( $p>0.05$ ).

Respecto a las concentraciones individuales de carotenoides, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas para ninguno de ellos y sólo en el caso del campo 35 kV/cm se encuentra un incremento significativo del  $\zeta$ -caroteno respecto a la bebida sin tratar a partir de 60  $\mu$ s.

Torregrosa *et al.* (2005) para zumo de naranja-zanahoria encuentran que la aplicación de diversos tratamientos por PEAI produce un incremento significativo en las concentraciones de carotenoides conforme incrementa el tiempo de tratamiento. Sin embargo, Cortés *et al.* (2006a) encuentran para zumo de naranja tratado por PEAI que las concentraciones de carotenoides se reducen con el tiempo de tratamiento y sólo para los campos más intensos (35-40 KV/cm) algunos carotenoides incrementan su concentración ya que como apuntan otros autores tras el tratamiento existe una mayor estabilidad del zumo, una mayor degradación enzimática, y ocurren pérdidas de humedad y sólidos solubles que concentran la muestra por unidad de peso (Rodríguez-Amaya, 1997).

Del mismo modo, para conocer la influencia del campo eléctrico, tiempo de tratamiento y temperatura máxima alcanzada sobre las concentraciones de vitamina A ( $C/C_0$ ) se aplica un análisis de regresión lineal y se observa que ninguno de los parámetros del tratamiento por pulsos modifica dichas concentraciones y, cabe destacar que para algunas combinaciones de tratamiento se producen incluso incrementos de modo que, para un campo de 15 kV/cm a 500  $\mu$ s, se obtiene un incremento de aproximadamente un 12.1%, para un campo de 25 kV/cm a 80  $\mu$ s se obtiene un incremento del 5.3%, para un campo eléctrico de 35 kV/cm se alcanza un incremento del 7.8% a los 100  $\mu$ s y

para un campo de 40 kV/cm el incremento es del 7.5% cuando el tiempo de tratamiento es de 100  $\mu$ s.

Por otro lado, los resultados obtenidos tras la pasterización (90°C, 20 s) se muestran en el Cuadro nº 31.

**Cuadro nº 31.** Concentración de carotenoides y vitamina A (RAE) en las bebidas de zumo de naranja y leche pasterizadas (90°C, 20 s).

Carotenoides	Zumo de naranja y leche	
	Fresco	Pasterizado
1 9- <i>cis</i> -violaxantina+Zeinoxantina	79.24 $\pm$ 6.53 <sup>a</sup>	71.80 $\pm$ 3.92 <sup>a</sup>
2 Mutatoxantina	55.92 $\pm$ 3.92 <sup>a</sup>	47.36 $\pm$ 3.07 <sup>b</sup>
3 Luteina	17.27 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	13.34 $\pm$ 0.78 <sup>b</sup>
4 Zeaxantina	38.45 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	29.79 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
5 $\beta$ -cryptoxantina	96.58 $\pm$ 2.69 <sup>a</sup>	92.18 $\pm$ 5.51 <sup>a</sup>
6 $\alpha$ -caroteno	9.14 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	7.63 $\pm$ 0.78 <sup>a</sup>
7 Fitoene+Fitoflueno	14.21 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>	13.55 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>
8 $\beta$ -caroteno	21.17 $\pm$ 0.61 <sup>a</sup>	20.79 $\pm$ 1.36 <sup>a</sup>
9 $\zeta$ -caroteno	7.48 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	8.18 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>
Vitamina A (RAE)	6.18 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>	5.88 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>
Carot. totales ( $\mu$ g/100 g)	538.49 $\pm$ 27.65 <sup>a</sup>	479.29 $\pm$ 27.34 <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup> diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre muestras.

Tras aplicar un análisis de comparación de medias (*t*-student) se encuentra que existe una reducción significativa del 11% en el contenido total de carotenoides. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Lee y Coates (2003) para zumo de naranja donde el total de carotenoides se reduce de manera significativa tras aplicar un tratamiento por pasterización (90°C, 30 s). Del mismo modo, Cortés *et al.* (2006a) encuentran para zumo de naranja pasterizado (90°C, 20 s) una reducción significativa del 12.6% en el contenido total de carotenoides y Gama *et al.* (2007) encuentran reducciones en



el total de carotenoides después de pasteurizar zumo de naranja a 95-105°C durante 10 s.

A nivel individual, existe una reducción significativa de las xantofilas, luteína y zeaxantina en un 22.8% y 22.5% respectivamente. Esto se debe a que durante el tratamiento térmico las xantofilas tienen diferente estabilidad y susceptibilidad a la oxidación respecto a los carotenos por la presencia de oxígeno en sus estructuras (Gamma *et al.* 2007). Sánchez-Moreno *et al.* (2005) observan reducciones en las concentraciones de luteína tras pasteurizar zumo de naranja (90°C, 60 s) y Cortés *et al.* (2006a) encuentran una reducción del 12.06% y 17.34% para luteína y zeaxantina respectivamente para zumo de naranja pasteurizado (90°C, 20 s).

Por otro lado, los cambios en los carotenoides con actividad provitamina A ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -cryptoxantina) no son significativos por lo que la concentración de vitamina A reduce tan sólo un 5.6% ( $p>0.05$ ). De acuerdo con estos resultados, Lee y Coates (2003) y Bull *et al.* (2004) encuentran para zumo de naranja que el tratamiento térmico no reduce significativamente las concentraciones de carotenoides con actividad provitamina A y Torregrosa *et al.* (2005) no encuentran reducciones en la concentración de vitamina A tras pasteurizar zumo de naranja-zanahoria (98°C, 21 s). Sin embargo, Cortés *et al.* (2006a) encuentran una reducción del 15.6% en las concentraciones de vitamina A para zumo de naranja pasteurizado respecto al zumo fresco y Lessin *et al.* (1997) observan pérdidas de alrededor del 36% en las concentraciones de carotenoides con actividad provitamina A en zumo de naranja pasteurizado (80°C, 2 min).

#### **3.3.4. Color**

En el Cuadro nº 32, se muestran los resultados para los parámetros de color analizados ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $h^*$  y  $C^*$ ) así como las diferencias de color ( $\Delta E$ ) de las bebidas tratadas respecto a las muestras sin tratar. Según Cserhalmi *et al.* (2006) los cambios en color se clasifican atendiendo al valor de  $\Delta E$  en:

Clasificación	$\Delta E$
No apreciables	0-0.5
Ligeramente apreciables	0.5-1.5
apreciables	1.5-3
Visibles	3-6
Notables	6-12

Tras los diferentes tratamientos por PEAI aplicados, no se observan cambios apreciables en el color de las bebidas ( $\Delta E < 0.5$ ) presentando una coloración semejante a la de la bebida fresca. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Cortés *et al.* (2006a) para zumo de naranja tratado por PEAI (25-40 kV/cm, 30-340  $\mu$ s) y Michalac *et al.* (2003) para leche desnatada UHT tratada por PEAI (35 kV/cm, 90  $\mu$ s) que no encuentran diferencias en el color de las muestras ( $\Delta E$ ) tras el tratamiento.

Por otro lado, los parámetros de color se correlacionan con el contenido de carotenoides presentes en la muestra, principalmente con el parámetro CIE  $b^*$  siendo éste el que determina los cambios principales en el color ( $\Delta E$ ) ( $r = 0.595$ ,  $p < 0.01$ ). Así, el parámetro CIE  $b^*$  se correlaciona con las concentraciones de  $\beta$ -cryptoxantina ( $r = 0.297$ ,  $p < 0.05$ ), luteína ( $r = 0.352$ ,  $p < 0.01$ ), zeaxantina ( $r = 0.471$ ,  $p < 0.01$ ),  $\beta$ -caroteno ( $r = 0.450$ ,  $p < 0.01$ ) y  $\zeta$ -caroteno ( $r = 0.479$ ,  $p < 0.01$ ) y el total de carotenoides presentes en la muestra ( $r = 0.271$ ,  $p < 0.05$ ). El  $\zeta$ -caroteno a su vez, se correlaciona con el parámetro  $a^*$  ( $r = 0.266$ ,  $p < 0.05$ ) debido a su coloración rojiza. También, los incrementos en los carotenoides totales presentes se correlacionan, en general, con una disminución en la luminosidad de las bebidas ( $r = -0.580$ ,  $p < 0.01$ ). Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Cortés *et al.* (2006a) para zumo de naranja tratado por PEAI que encuentran correlaciones significativas entre luteína, zeaxantina,  $\beta$ -cryptoxantina y  $\beta$ -caroteno con los parámetros CIE  $a^*$  y CIE  $b^*$  (positiva) y CIE  $L^*$  (negativa).

Tras el tratamiento por pasteurización, se obtienen cambios de color apreciables ( $\Delta E = 1.79$ ) (Cuadro nº 32). Asimismo, se encuentran cambios estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) para CIE  $a^*$ , CIE  $b^*$  y Chroma, de modo

que las bebidas tienden hacia una mayor saturación del color con incrementos en el color rojo y amarillo y, se encuentra una disminución del valor de  $h^0$  ( $p>0.05$ ), lo que indica una disminución en la pureza del color de las bebidas pasterizadas. Polydera *et al.* (2005a) para zumo de naranja tratado a 80°C durante 60 s y Lee y Coates (2003) para zumo de naranja tratado a 90°C durante 30 s, encuentran incrementos en la saturación del color (Chroma) tras la aplicación del tratamiento por calor. Por otro lado, Needs *et al.* (2000) cuando tratan leche desnatada (85°C, 20 min) observan incrementos en CIE en  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  que atribuyen a cambios en la estructura de las micelas que presentan, a diferencia de las muestras sin tratar, proyecciones irregulares en la superficie y, Kwok *et al.* (1999) encuentran para leche de soja incrementos en CIE  $a^*$  y  $b^*$  tras el tratamiento por calor (80-140°C durante 0-180 min) relacionando este efecto con incrementos en el índice de pardeamiento. Rivas *et al.* (2006a) para zumo de naranja-zanahoria pasterizado (98°C, 21 s) no obtienen cambios significativos en los parámetros CIE  $L^*$  o Chroma, aunque de acuerdo a nuestros resultados el valor de Chroma se incrementa ligeramente tras el tratamiento por pasterización.

**Cuadro nº 32.** Color de las bebidas de zumo de naranja y leche tras el tratamiento por PEAI y pasterización.

Tratamiento	L*	a*	b*	h°	C*	ΔE
Fresca	70.11	0.59 <sup>a</sup>	45.60 <sup>a</sup>	89.26	45.60 <sup>a</sup>	0.00
90°C, 20 s	70.80	0.66 <sup>b</sup>	47.24 <sup>b</sup>	89.19	47.27 <sup>b</sup>	1.79
<b>15 kV/cm</b>						
0 μs	74.67	0.36	45.18	89.54	45.18	0.00
40 μs	74.72	0.34	44.84	89.57	44.84	0.34
80 μs	74.75	0.33	44.56	89.58	44.56	0.39
130 μs	74.71	0.29	44.88	89.69	44.88	0.31
300 μs	74.72	0.32	44.76	89.59	44.76	0.43
500 μs	74.63	0.46	44.80	89.41	44.80	0.39
700 μs	74.37	0.47	45.24	89.40	45.24	0.33
<b>25 kV/cm</b>						
0 μs	74.81	0.62	44.23	89.20	44.24	0.00
40 μs	74.82	0.51	44.07	89.34	44.08	0.19
80 μs	74.86	0.45	44.19	89.41	44.19	0.18
130 μs	74.89	0.55	44.24	89.29	44.25	0.12
200 μs	74.67	0.53	44.18	89.31	44.18	0.17
280 μs	74.64	0.63	44.26	89.13	44.26	0.15
310 μs	74.65	0.64	44.44	89.29	44.45	0.27
<b>35 kV/cm</b>						
0 μs	73.50	0.59	45.93	89.26	45.93	0.00
40 μs	73.53	0.49	45.63	89.38	45.63	0.10
60 μs	73.59	0.44	45.70	89.45	45.70	0.08
80 μs	73.56	0.54	45.46	89.32	45.47	0.23
100 μs	73.58	0.52	45.48	89.34	45.49	0.21
130 μs	73.53	0.56	45.49	89.29	45.50	0.20
180 μs	73.34	0.68	45.97	89.15	45.88	0.31
<b>40 kV/cm</b>						
0 μs	75.89	0.95	45.54	88.80	45.44	0.00
40 μs	76.10	0.82	45.24	88.96	45.24	0.39
60 μs	76.19	0.85	45.16	88.92	45.16	0.49
80 μs	76.08	1.02	45.34	88.71	45.35	0.28
90 μs	76.06	0.97	45.74	88.78	45.75	0.26
110 μs	76.01	1.03	45.58	88.71	45.59	0.15
130 μs	75.75	1.07	45.83	88.66	45.84	0.35

L\*: luminosidad

a\*: (+) rojo, (-) verde

b\*: (+) amarillo, (-) azul

h°: hue angle:  $\tan^{-1}(b^*/a^*)$

C\*: chroma:  $(a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$

ΔE: diferencias de color:  $[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$

a-b: diferente superíndice indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre las muestras

### 3.3.5. Compuestos fenólicos.

El contenido en compuestos fenólicos solubles totales de las bebidas de zumo de naranja y leche se sitúa entre 70.50 y 99.31 mg GAE/ 100 mL, intervalo similar al encontrado por otros autores para zumo de naranja (Proteggente *et al.* 2002; Cortés, 2006b, Xu *et al.* 2008).

Los contenidos de fenoles solubles totales (FST) hallados tras el tratamiento por PEAI se muestran en el Cuadro nº 33 y Figura nº 29. Como puede observarse, generalmente aumentan con el campo y tiempo de tratamiento aunque, sólo se encuentran diferencias estadísticamente significativas para el campo más intenso (40 kV/cm) y el tiempo de aplicación más alto (130 µs) con un incremento del 13% respecto al valor inicial. Sánchez-Moreno *et al.* (2005) para zumo de naranja tratado por PEAI (35 kV/cm, 750 µs) no observan cambios significativos en los contenidos de narigenina o hesperitina (flavanonas) respecto a las muestras sin tratar y, Cortés (2006b) para zumo de naranja tratado por PEAI (30 kV/cm, 100 µs) no encuentran cambios en los contenidos totales de compuestos fenólicos tras el tratamiento aplicado. De igual modo, para otros alimentos como zumo de tomate, Odriozola-Serrano *et al.* (2008a) indican que no existen cambios significativos en los contenidos de compuestos fenólicos inmediatamente tras el tratamiento por PEAI (35 KV/cm, 1500 µs). Por el contrario, Aguilar-Rosas *et al.* (2007) encuentran para zumo de manzana que tras el tratamiento por PEAI (35 kV/cm, 1200 µs) se produce una reducción en el contenido de compuestos fenólicos del 14.49%.

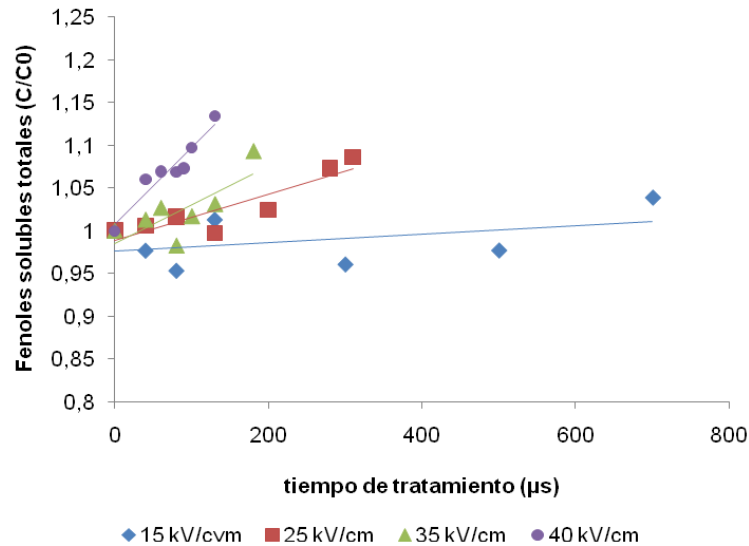
Por otro lado, tras tratar la bebida de zumo y leche por pasteurización no se encuentran cambios significativos en el contenido de compuestos fenólicos, aunque se observa una ligera reducción de los mismos (65.32±4.32 vs 61.04±1.73). Gil-Izquierdo *et al.* (2002) indican para zumo de naranja que diversos tratamientos por pasteurización (75°C y 95°C, 30 s) no producen cambios en las concentraciones de compuestos fenólicos y que las flavanonas son estables a temperaturas de pasteurización. De igual modo, Fiore *et al.* (2005) encuentran que las antocianinas de diferentes zumos de fruta refrigerados no se

ven afectadas tras la aplicación de un tratamiento por pasterización suave (80°C). Por otro lado, Sánchez-Moreno *et al.* (2005) observan para zumo de naranja que el tratamiento por pasterización (90°C, 1 min) produce una reducción en los contenidos de naringenina del 16% y Aguilar-Rosas *et al.* (2007) indican para zumo de manzana que el contenido en compuestos fenólicos se reduce un 32.2% tras la pasterización (90°C, 30 s).

**Cuadro nº 33.** Concentración (mg GAE/L) de compuestos fenólicos solubles totales en las bebidas de zumo de naranja y leche tratadas por PEAI.

<b>E (kV/cm)</b>	<b>t (µs)</b>	<b>T<sub>max</sub> (°C)</b>	<b>FST (mg GAE/L)</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>
0	0	22	83.25 <sup>a</sup>	1
15	40	34.5	81.45 <sup>a</sup>	0.977
15	80	36.5	79.31 <sup>a</sup>	0.953
15	130	38.0	84.10 <sup>a</sup>	1.013
15	300	44.5	80.00 <sup>a</sup>	0.960
15	500	54.5	81.45 <sup>a</sup>	0.977
15	700	59	86.35 <sup>a</sup>	1.039
0	0	22	78.61 <sup>a</sup>	1
25	40	37.5	79.02 <sup>a</sup>	1.005
25	80	40.5	79.80 <sup>a</sup>	1.017
25	130	44.5	78.45 <sup>a</sup>	0.997
25	200	51.5	80.73 <sup>a</sup>	1.025
25	280	57.0	84.45 <sup>a</sup>	1.073
25	310	59.0	85.54 <sup>a</sup>	1.086
0	0	22	78.70 <sup>a</sup>	1
35	40	40	78.76 <sup>a</sup>	1.013
35	60	44	79.85 <sup>a</sup>	1.027
35	80	47	76.36 <sup>a</sup>	0.982
35	100	51	79.14 <sup>a</sup>	1.017
35	130	59	80.13 <sup>a</sup>	1.031
35	180	62.6	85.04 <sup>a</sup>	1.094
0	0	22	80.11 <sup>a</sup>	1
40	40	42.5	84.95 <sup>ab</sup>	1.060
40	60	47.5	85.65 <sup>ab</sup>	1.070
40	80	52.5	85.60 <sup>ab</sup>	1.069
40	90	54.5	85.95 <sup>ab</sup>	1.073
40	100	55.4	87.91 <sup>ab</sup>	1.097
40	130	62.1	90.85 <sup>b</sup>	1.134

<sup>a-b</sup> distinto superíndice indica diferencias estadísticamente significativas en función del tiempo de tratamiento aplicado.



**Figura n° 29.** Variación en las concentraciones de fenoles solubles totales(C/C<sub>0</sub>) con la aplicación de los diversos tratamientos por PEAI.

### 3.3.6. Capacidad antioxidante total (TEAC).

La capacidad antioxidante promedio de las bebidas de zumo y leche es de  $1.41 \pm 0.08$  mmol TE/L. Tras los diversos tratamientos por PEAI, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los valores de capacidad antioxidante total (Cuadro n° 34). Sin embargo, tras el tratamiento por pasterización se observa una pérdida significativa ( $p < 0.05$ ) de la capacidad antioxidante con una reducción del 28.6% ( $1.14 \pm 0.03$  vs  $1.60 \pm 0.12$  mmol TE/L). De acuerdo con estos resultados, Sánchez-Moreno *et al.* (2005) no encuentran diferencias estadísticamente significativas en los valores de capacidad antioxidante (DPPH) para zumo de naranja fresco o tratado por PEAI (35 kV/cm, 750 µs) sin embargo, observan que tras el tratamiento por pasterización (90°C, 60 s) la capacidad antioxidante se reduce un 6.6% ( $p < 0.05$ ). Lo Scalzo *et al.* (2004) observan para zumo de naranja sanguina que diferentes tratamientos térmicos (80°C, 6 min; 80°C, 1 min) causan una reducción en la capacidad antioxidante (DPPH) de aproximadamente un 7% y Polydera *et al.* (2005b)



observan una reducción significativa de la capacidad antioxidante para zumo de naranja pasteurizado (80°C, 60 s). Por otro lado, Calligaris *et al.* (2004) encuentran para leche tratada a 80°C y 90°C que la capacidad antioxidante disminuye a medida que aumentan el tiempo de tratamiento atribuyendo este hecho a (i) degradación térmica de los antioxidantes naturales de la leche, (ii) oxidación de los grupos sulfhidrilo y proteínas y (iii) oxidación lipídica y generación de radicales libres. Sin embargo, Gil-Izquierdo *et al.* (2002) indican que un tratamiento suave por pasteurización (75°C, 30 s) así como una pasteurización estándar (95°C, 30 s) no afectan a la capacidad antioxidante del zumo de naranja.

**Cuadro nº 34.** Valores de capacidad antioxidante (TEAC) para las muestras de zumo y leche tratadas por PEAI.

<b>E</b> <b>(kV/cm)</b>	<b>t</b> <b>(µs)</b>	<b>T<sub>max</sub></b> <b>(°C)</b>	<b>TEAC</b> <b>(mmol TE/L)</b>	<b>C/C<sub>0</sub></b>
0	0	22	1.401 <sup>ab</sup>	1
15	40	34.5	1.425 <sup>a</sup>	1.02
15	80	36.5	1.444 <sup>a</sup>	1.03
15	130	38.0	1.314 <sup>ab</sup>	0.94
15	300	44.5	1.211 <sup>b</sup>	0.86
15	500	54.5	1.391 <sup>ab</sup>	0.99
15	700	59	1.334 <sup>ab</sup>	0.95
0	0	22	1.310 <sup>a</sup>	1
25	40	37.5	1.301 <sup>a</sup>	0.99
25	80	40.5	1.273 <sup>a</sup>	0.97
25	130	44.5	1.255 <sup>a</sup>	0.96
25	200	51.5	1.193 <sup>a</sup>	0.91
25	280	57.0	1.164 <sup>a</sup>	0.89
25	310	59.0	1.133 <sup>a</sup>	0.86
0	0	22	1.418 <sup>a</sup>	1
35	40	40	1.380 <sup>ab</sup>	0.97
35	60	44	1.370 <sup>ab</sup>	0.96
35	80	47	1.359 <sup>ab</sup>	0.96
35	100	51	1.325 <sup>ab</sup>	0.93
35	130	59	1.349 <sup>ab</sup>	0.95
35	180	62.6	1.292 <sup>b</sup>	0.91
0	0	22	1.510 <sup>a</sup>	1
40	40	42.5	1.500 <sup>a</sup>	0.99
40	60	47.5	1.430 <sup>a</sup>	0.95
40	80	52.5	1.365 <sup>a</sup>	0.90
40	90	54.5	1.475 <sup>a</sup>	0.98
40	100	55.4	1.485 <sup>a</sup>	0.98
40	130	62.1	1.455 <sup>a</sup>	0.96

<sup>a-b</sup> diferente superíndice indica diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) en función del tiempo de tratamiento aplicado (µs).

Para comprobar la contribución del ácido ascórbico, carotenoides totales y compuestos fenólicos a los valores de capacidad antioxidante total, se aplica un análisis de regresión lineal obteniéndose el siguiente modelo:

$$\text{TEAC (mM)} = -0.303 + 0.047 [\text{mg AA}/100 \text{ mL}] + 0.006 [\text{mg GAE}/100 \text{ mL}]$$

El valor de  $p < 0.01$  en el análisis ANOVA, indica que el nivel de significatividad de las variables en el modelo obtenido es del 99%. El valor de  $R^2$  indica que el modelo explicaría el 86% de los valores obtenidos experimentalmente. La no contribución al modelo por parte de los carotenoides presentes en las bebidas puede deberse a las bajas concentraciones de éstos ( $\mu\text{g}/100\text{ mL}$ ) respecto a los altos contenidos de vitamina C ( $\text{mg}/100\text{ mL}$ ) y compuestos fenólicos ( $\text{mg}$ ). Estos resultados coinciden con los obtenidos en el Capítulo 1 donde se analiza el perfil nutricional de las bebidas de zumo y leche comerciales, de modo que el ácido ascórbico parece ser el principal contribuyente a la capacidad antioxidante total (TEAC). Del mismo modo, Arena *et al.* (2001) encuentran para zumo de naranja sanguina que el mayor contribuyente a la capacidad antioxidante es el ácido ascórbico (~70%) seguido por el ácido hidroxicinámico y antocianinas mientras, la contribución de los carotenoides es insignificante. Asimismo, Gil-Izquierdo *et al.* (2002), encuentran para zumo de naranja que el ácido ascórbico contribuye en un 77-96% al valor de la capacidad antioxidante total mientras los compuestos fenólicos no contribuyen significativamente a la misma y, Gardner *et al.* (2000) encuentran para diversas frutas cítricas que la vitamina C contribuye entre el 65-100% a la capacidad antioxidante total.

Cuando se estudian las variaciones en los valores de TEAC durante el tratamiento por pulsos ( $C/C_0$ ) respecto a lo que varían las concentraciones de ácido ascórbico ( $C/C_0$ ), fenoles solubles totales ( $C/C_0$ ) y vitamina A ( $C/C_0$ ) se obtiene que, los principales cambios en los valores de capacidad antioxidante durante el tratamiento por PEAI se deben a cambios en las concentraciones de ácido ascórbico ya que se encuentra una correlación estadísticamente significativa entre ambos parámetros ( $r = 0.446$ ,  $p = 0.0003$ ).

### 3.4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el estudio realizado para evaluar los tratamientos por PEAI como alternativa a los tradicionales por calor, se comprueba que las concentraciones de ácido ascórbico, carotenoides, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante total, se reducen en menor medida tras la aplicación de éstos frente al tratamiento por pasterización.

Sobre la concentración remanente de ácido ascórbico tras el tratamiento por PEAI influye, principalmente, la temperatura máxima alcanzada durante el mismo. Además, las concentraciones de carotenoides con actividad vitamínica A y el contenido en compuestos fenólicos muestran una mayor resistencia a los tratamientos por PEAI incrementando incluso su contenido para alguno de ellos.

Cuando se establece la correlación entre los diferentes compuestos bioactivos presentes en la bebida y la capacidad antioxidante total (TEAC) de la misma, se obtiene que el mayor contribuyente es el ácido ascórbico el cual, es responsable en parte de las principales variaciones encontradas.

Respecto a los parámetros físico-químicos, cabe señalar que los valores de pH y °Brix se mantienen prácticamente invariables para cualquiera de los tratamientos aplicados (PEAI y pasterización) mientras que, el color de las bebidas tratadas por PEAI es similar al de la bebida sin tratar y, tras pasterizar la bebida se observan cambios de color apreciables.

Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a las siguientes contribuciones en congresos:

- Autores: **Zulueta A.**, Esteve, M.J., Frasquet, I., Frígola, A.  
Título: **Antioxidant capacity of a new functional food: orange juice-skimmed milk treated by non thermal technology: High Intensity Pulsed Electric Fields (HIPEF).**  
Tipo de participación: Póster.  
Congreso: VI Barcelona Internacional Congreso on the Mediterranean Diet.

Fecha y lugar de celebración: Del 8 al 9 de marzo de 2006, Barcelona (España).

Publicación: Abstract

- Autores: **Zulueta, A.**, Esteve, M.J., Frígola, A.

Título: **Orange juice-milk beverage treated by pulsed electric fields: effects on carotenoids and vitamin A.**

Tipo de participación: poster

Congreso: Food-new options for the industry. EFFOST 2007

Fecha y lugar de celebración: Del 14 al 16 de Noviembre de 2007, Lisboa (Portugal)

- Autores: **Zulueta, A.**, Esteve, M.J., Frígola, A.

Título: **Impact of non-thermal treatment on ascorbic acid in an orange juice-milk beverage.**

Tipo de participación: poster

Congreso: Food-new options for the industry. EFFOST 2007

Fecha y lugar de celebración: Del 14 al 16 de Noviembre de 2007, Lisboa (Portugal)



## **CAPÍTULO 4. Influencia de los Pulsos Eléctricos de Alta Intensidad sobre el perfil de ácidos grasos en una bebida de zumo de naranja y leche enriquecida con omega-3 y ácido oléico.**

### **4.1. INTRODUCCION**

Las enfermedades cardiovasculares son una de las principales causas de mortalidad en los países desarrollados. La cardiopatía isquémica (CI) es la complicación clínica principal de la aterosclerosis, proceso inflamatorio que se desarrolla por la interacción entre el colesterol transportado en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), los monocitos macrófagos, las plaquetas y las células de la pared arterial (Mata *et al.* 2004). El consumo de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), especialmente ácido oleico, ha demostrado reducir los niveles en plasma de triacilglicerol y colesterol en sujetos sanos (Kris-Etherton *et al.* 1999; Feldman, 1999) mientras los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) han mostrado reducir el riesgo de padecer enfermedades coronarias (Harris, 2003) y cáncer (Larsson *et al.* 2004) así como mejorar diversas patologías relacionadas con el proceso inflamatorio (artritis) y reducir la presión arterial (Funk, 2001). Las sociedades industrializadas se han caracterizado por un elevado consumo de ácidos grasos saturados, ácidos grasos poliinsaturados omega-6 ( $\omega$ -6) y ácidos grasos *trans* mientras, se ha reducido el consumo de ácidos grasos omega-3 ( $\omega$ -3), esenciales para el ser humano.

El aporte de ácidos grasos  $\omega$ -3 ha planteado un serio problema para la población debido a que se obtiene casi exclusivamente a través del pescado y su consumo ha disminuido enormemente en los últimos años limitando los niveles de ingesta. Es por ello que, los ácidos grasos  $\omega$ -3 se han incorporado a una serie de bebidas funcionales obteniendo un elevado éxito entre los consumidores ya que surgen de una necesidad en la población. Según han demostrado diversos estudios, el consumo de bebidas adicionadas con AGPI ha incrementado los niveles de omega-3 en la población en los últimos años (Connor, 2000; Wallace *et al.* 2000; Baró *et al.* 2003).

Una vez estudiados los cambios en los compuestos bioactivos naturales en la bebida de zumo de naranja y leche tras el tratamiento por PEAI, se decide preparar la misma bebida cambiando la composición de leche desnatada por una leche semidesnatada adicionada con ácidos  $\omega$ -3 y oleico con el objetivo de observar los posibles cambios en el perfil de ácidos grasos como consecuencia de los tratamientos de conservación. Para establecer el efecto del tratamiento por PEAI, se ensayan los dos campos eléctricos más intensos (35 y 40 kV/cm) a distintos tiempos (desde 40 hasta 180  $\mu$ s) y se comparan con los resultados obtenidos para una muestra sin tratar.

## **4.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **4.2.1. Muestra**

La bebida de zumo de naranja y leche se compone de:

- 50% de zumo de naranja.
- 20 % de leche semidesnatada enriquecida con ácidos grasos omega-3 y oléico (Puleva, Granada, España).
- 30% de agua.
- 0.3% de pectina alto metoxilo (Unipeptine AYD 250 Degussa Food Ingredients, Bolougne, Francia).
- 0.1% de ácido cítrico, Panreac.
- 7.5% de azúcar blanco (Azucarera Española).

### **4.2.2. Tratamiento por pulsos eléctricos.**

Para la determinación del efecto del tratamiento por pulsos eléctricos sobre las concentraciones de ácidos grasos en la bebida, se aplican los dos campos más intensos, 35 y 40 kV/cm para tiempos desde 40 a 180  $\mu$ s. El equipo y modo operatorio se describe en el capítulo 3, apartado 3.2.2.



### **4.2.3. Determinación de parámetros físico-químicos.**

#### **4.2.3.1. pH. Ver capítulo 1, apartado 1.2.2.1.**

#### **4.2.3.2. °Brix. Ver capítulo 1, apartado 1.2.2.2.**

#### **4.2.3.3. Hidroximetilfurfural (FIPJF, 1974)**

El Hidroximetilfurfural (HMF) es un aldehído, que se forma durante la descomposición térmica de los azúcares y carbohidratos siendo uno de los compuestos intermedios de la reacción de Maillard. La aparición de HMF se ha localizado en diversos alimentos tratados térmicamente como la leche, zumos de fruta, licores y miel. Furfural e HMF están relacionados con el oscurecimiento del zumo y también son indicadores útiles del exceso de temperatura y tiempo de almacenamiento. En consecuencia, el análisis de estos compuestos es de especial importancia en la industria alimentaria (Espinosa *et al.* 1992). Unas condiciones inadecuadas durante el tratamiento térmico de la bebida se reflejan en un aumento de la concentración de los distintos derivados del furfural por degradación de los azúcares reductores o de la reacción de Maillard.

En este trabajo se determina el contenido en hidroximetilfurfural mediante el método descrito por la Fédération Internationale des Producteurs de Jus de Fruits (FIPJF, 1974), el cual se basa en la reacción del ácido barbitúrico y la p-toluidina con el HMF, formando un compuesto coloreado rojo. La intensidad del color rojo depende de la cantidad de HMF y puede usarse para la determinación cuantitativa colorimétrica. La reacción alcanza un máximo de color a los 3-4 minutos.

##### 4.3.2.3.3.1. Material y Reactivos

- p-toluidina, 99.7%, Sigma-Aldrich.
- Hidroximetilfurfural, Fluka.
- Ácido barbitúrico, 99%, Merck.
- Ácido acético glacial, 99.7%, Panreac.

- Isopropanol, 99.7%, Scharlau.
- Papel de filtro Schleicher&Schuell,  $\phi= 110$  mm.
- Material de uso corriente en el laboratorio.

#### 4.3.2.3.3.2. Instrumentación

- Espectrofotómetro Perkin-Elmer UV-Vis Lambda 2.
- Baño de agua p-Selecta Unitronic s-320-200
- Centrífuga refrigerada GT 422. Jouan

#### 4.3.2.3.3.3. Preparación de los reactivos

- Disolución de ácido barbitúrico: Se disuelven 500 mg de ácido barbitúrico en 70 mL de agua destilada por calentamiento suave en un baño de agua. Después enfriar, se enrasa con agua destilada hasta un volumen de 100 mL. La disolución es estable si se guarda en nevera.
- Reactivo p-toluidina: 10 g de p-toluidina se transfieren con 50 mL de isopropanol a un matraz de 100 mL, se disuelven con 10 mL de ácido acético glacial y se enrasa con isopropanol. La solución se mantiene un mes en botella opaca en la nevera.
- Disolución patrón de HMF (500 mg/L). Para preparar la disolución estandar es esencial utilizar HMF muy puro. Esta disolución debe ser preparada recientemente.

#### 4.3.2.3.3.4. Modo operatorio

Preparación de la curva de calibrado: Se realiza una dilución 1:100 de la solución patrón de HMF (500 mg/l) en agua destilada y se prepara una curva de calibración en el intervalo de 0 a 2 mg/mL de HMF.

A cada tubo, se añaden 5 ml de la disolución de p-toluidina. Justo antes de proceder a la medida espectrofotométrica se añade 1 ml de la disolución de ácido barbitúrico y se agita, se coloca en la cubeta de medida y, a los 3-4

minutos se determina su absorbancia a  $\lambda=550$  nm, momento en el cual se alcanza su máximo.

Preparación de la muestra: Se filtra una cantidad de la muestra a través de un papel de filtro doblado (pb, Ref. 500, 11 cm) y se diluye 1 ml del filtrado obtenido hasta 10 ml con agua destilada en un tubo graduado con tapón. A continuación se centrifuga la disolución dos veces durante 10 minutos a 5000 rpm a 20°C.

Se toman 2 ml del sobrenadante en dos tubos de ensayo tapados, se añaden 5 ml del reactivo p-toluidina a cada tubo y se agitan. Se añade 1 ml de agua destilada al primer tubo y 1 ml de disolución de ácido barbitúrico al segundo tubo y ambos se agitan varias veces.

La adición de los reactivos se realiza sucesivamente en 1-2 minutos entre muestras y se lee la absorbancia de la muestra a 550 nm frente al blanco. La extinción alcanza el máximo en 3-4 minutos después de adicionar el ácido barbitúrico y generalmente decae después rápidamente.

El contenido en HMF se calcula a partir del valor obtenido por interpolación en la curva patrón teniendo en cuenta las diluciones efectuadas. Los resultados se expresan en mg/L muestra.

#### **4.3.2.4. Índice de peróxidos.**

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de deterioro de los alimentos, y da lugar a la aparición de sabores y olores desagradables que, disminuyen la vida útil de dicho alimento y, lo hacen inaceptable para el consumidor, lo cual repercute de manera negativa en la industria alimentaria. A través de las reacciones de oxidación se pueden obtener productos potencialmente tóxicos y disminuir la calidad nutritiva de los alimentos. El índice de peróxidos es útil para evaluar el grado de enranciamiento de una grasa.

Para la determinación del índice de peróxidos, se utiliza el método descrito por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1990) que

consiste en un ensayo yodométrico donde las sustancias que oxidan el yoduro potásico, bajo las condiciones de ensayo establecidas, se expresan como mEq de peróxidos por kg y este valor se obtiene tras la valoración con tiosulfato del yodo liberado.

#### 4.3.2.4.1. Material y Reactivos

- Material de uso corriente en el laboratorio.
- Cloroformo, 99-99.4% ( $\delta = 1.47$  g/mL), Merck.
- Ácido acético glacial, 99.7%, Panreac.
- Yoduro potásico, 99.5%, Panreac.
- Almidón, Panreac.
- Tiosulfato sódico, 99.5%. Panreac.

#### 4.3.2.4.2. Determinación del índice de peróxidos.

El método consiste en la extracción de los lípidos siguiendo el método de Folch (1957), modificado por Manglano (1999) y posterior determinación de los peróxidos presentes en la grasa mediante volumetría indirecta que, valora con tiosulfato, el yodo formado a partir de la oxidación del ión yoduro por los peróxidos presentes en la muestra. De ese modo, se disuelve la grasa con 10 mL de cloroformo, se adicionan 15 mL de ácido acético glacial y 0.7 g de yoduro potásico. Se agita el matraz con movimiento suave de rotación durante un minuto, y se mantiene en oscuridad y reposo durante 5 minutos. Después, se añaden 75 mL de agua y unas gotas de almidón al 1% (p/v), que actúa como indicador. Se agita vigorosamente y si la muestra contiene peróxidos se oscurece el medio. Sólo en caso positivo, se procede a la valoración con una disolución de tiosulfato sódico 0.01 N preparada a partir de una disolución de tiosulfato sódico 0.1 N. Paralelamente se valora un blanco.

El índice de peróxidos (IP) se expresa en miliequivalentes de oxígeno por kg de grasa y se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{(V - V') \cdot N \cdot 1000}{m}$$

Donde:

V= es el volumen de disolución (mL) de tiosulfato de sodio consumidos en el ensayo de la muestra.

V'= volumen de disolución (mL) de tiosulfato de sodio consumidos en el blanco.

N= normalidad de la disolución de tiosulfato de sodio.

m= peso (g) de la muestra.

#### **4.2.4. Perfil de ácidos grasos.**

##### 4.2.4.1. Material y Reactivos

- Material de uso corriente en el laboratorio.
- Cloroformo, 99-99.4% ( $\delta = 1.47$  g/mL), Merck.
- Metanol, 99%, J.T.Baker.
- Hexano, 99.5%, J.T. Baker.
- Hidróxido potásico, Scharlau.

##### 4.2.4.2. Instrumentación

- Cromatógrafo: Focus Termo Finnigan (Termo Finnigan).
- Detector FID, Termo Finnigan.
- Software Chrom-Card Data System.
- Columna CP-Wax 52CB, Varian.

- Centrífuga Jouan Mod. GT 422.

#### 4.2.4.3. Procedimiento de extracción de la grasa

Para la determinación de los ácidos grasos presentes en la bebida de zumo de naranja y leche semidesnatada enriquecida con ácidos grasos omega-3 y oleico se utiliza el método de Folch *et al.* (1957) modificado por Manglano (1999).

Éste método se basa en la extracción de la grasa a través de una mezcla de cloroformo y metanol para poder extraer tanto lípidos neutros como polares.

En un embudo de decantación se colocan 50 mL de la bebida de zumo y leche y se añaden 50 mL de una mezcla de cloroformo: metanol (2:1, v/v). El embudo de decantación se agita durante 2 minutos. Se separa el contenido en 2 tubos de centrífuga (conteniendo un peso similar) y a continuación se centrifugan a 3000 g, durante 15 min a 10°C. Con una pipeta pasteur se recoge la fase inferior (cloroformo) en un matraz de fondo redondo pasándola a través de un filtro separador de fases (Watman nº1). La fase superior (metanol) y la interfase (almidón, proteínas, etc) se introducen de nuevo en el embudo de decantación y se repite la extracción. La segunda fase orgánica recogida se une al extracto anterior, previo paso por el filtro separador de fases. Posteriormente, se lleva a rotaevaporar a 60-65°C. Una vez evaporado el cloroformo, el matraz se deja en estufa a 80°C durante 1 hora.

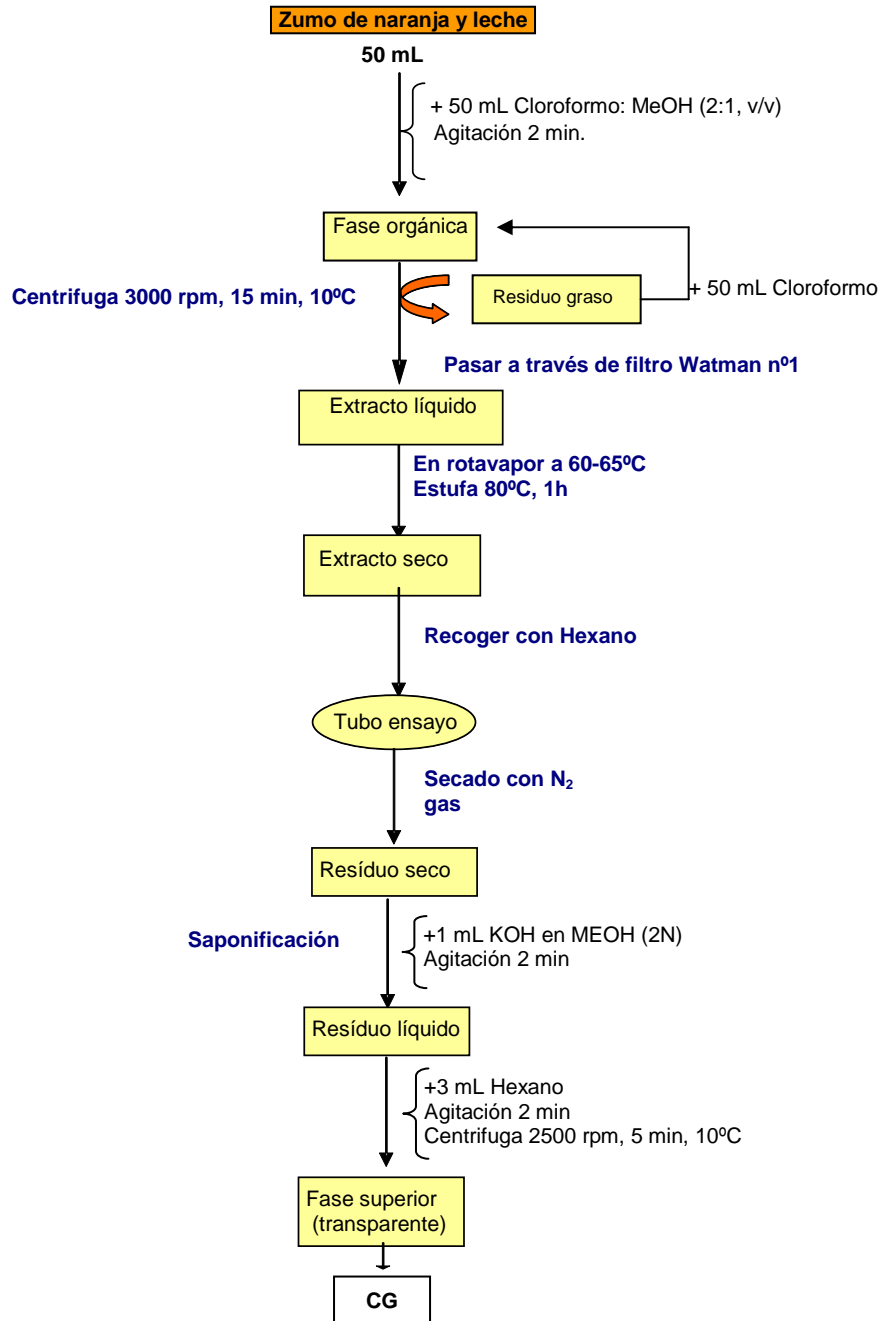
#### 4.2.4.4. Determinación del perfil de ácidos grasos.

Obtenido el extracto seco, se redisuelve con hexano y se va recogiendo en un tubo limpio (hasta que no se obtenga color). Después, se lleva a evaporar con N<sub>2</sub>. Terminado este proceso se obtiene el extracto graso separado.

Extraídos los lípidos, se han de saponificar para liberar los ácidos grasos y a continuación formar los ésteres metílicos que se separan mediante cromatografía gaseosa. Para la generación de los ésteres metílicos se añade 1

mL de KOH en MeOH (2 N) y se agita durante 2 minutos. A continuación se añaden 3 mL de hexano y se agita durante 2 minutos más. Posteriormente se lleva a centrifugar a 2500 rpm, durante 5 min y a 10°C.

Por último, la parte superior resultante (fase orgánica transparente) se inyecta en el cromatógrafo de gases.



**Figura nº 30.** Proceso de extracción de la grasa de la bebida de zumo y leche enriquecida.



### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.3.1. Parámetros físico-químicos.

Los resultados obtenidos para los parámetros pH y °Brix tras la aplicación de los diversos tratamientos por PEAI se muestran en el Cuadro nº 35.

**Cuadro nº 35.** Cambios en los valores de pH y °Brix de las bebidas de zumo de naranja y leche adicionada con ácidos grasos durante el tratamiento por PEAI.

t (μs)	T (°C)	σ (mS/cm)	Q (J/mL)	pH	°Brix
E= 35 kV/cm					
0	25	1.39	0	3.92±0.01	14.3±0.1
40	39	4.22	207	3.93±0.00	14.2±0.1
60	40	4.51	332	3.93±0.00	14.2±0.1
80	46	4.73	463	3.93±0.00	14.2±0.1
100	51	5.09	624	3.94±0.00	14.2±0.1
130	54	5.45	867	3.95±0.01	14.2±0.1
180	65	5.96	1315	3.95±0.01	14.1±0.1
E= 40 kV/cm					
0	25	1.39	0	3.92±0.01	14.3±0.1
40	43	4.51	289	3.92±0.01	14.2±0.1
60	46	4.66	447	3.93±0.01	14.2±0.1
80	49	4.66	596	3.93±0.01	14.2±0.1
90	50	4.73	681	3.94±0.01	14.1±0.1
110	53	4.80	845	3.95±0.01	14.1±0.1
130	58	5.16	1074	3.95±0.00	14.1±0.1

E=campo eléctrico, t=tiempo de tratamiento, σ=conductividad, Q=energía

El valor de pH de las bebidas sin tratar es de  $3.92 \pm 0.01$ . Tras la aplicación de los diferentes tratamientos se observa un ligero incremento en los valores de pH aunque las diferencias respecto a las bebidas sin tratar no es estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ). Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos en el capítulo anterior donde no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los valores de pH tras el tratamiento por PEAI en la bebida de zumo de naranja y leche. De manera similar, Rivas *et al.* (2006a) encuentran para zumo de naranja-zanahoria que la aplicación de los PEAI (25 kV/cm a 280 y 330  $\mu$ s) produce un ligero incremento en los valores de pH aunque de manera no significativa. Cortés *et al.* (2005) observan que la aplicación de diversos tratamientos por PEAI (20-35 kV/cm, a 100-300  $\mu$ s) en muestras de horchata no produce cambios en los valores de pH. Yeom *et al.* (2000) indican que no existen cambios en los valores de pH para zumo de naranja tras el tratamiento por PEAI (35 kV/cm, 59  $\mu$ s) y Floury *et al.* (2006) no encuentran variaciones en los valores de pH para muestras de leche tratadas a diferente temperatura y tiempos de tratamiento.

Con objeto de analizar la influencia del campo eléctrico (kV/cm), el tiempo de tratamiento ( $\mu$ s) y la  $T_{m\acute{a}x}$  ( $^{\circ}$ C) alcanzada sobre los valores de pH se aplica un análisis de regresión lineal a partir del cual se obtiene el siguiente modelo:

$$\text{pH} = 3.918 + 0.0002 \cdot t \quad (p < 0.01, R^2 = 84.4, \text{ error estándar} = 0.004)$$

donde t, es el tiempo de tratamiento ( $\mu$ s).

El valor de  $R^2$  indica que el modelo predice el 84% de los resultados obtenidos experimentalmente.

Por otro lado, el promedio en  $^{\circ}$ Brix de la bebida sin tratar es de  $14.30 \pm 0.05$ . Este parámetro no muestra variaciones cuando las bebidas son tratadas a 35 kV/cm, sin embargo se encuentran diferencias estadísticamente significativas a partir de 90  $\mu$ s de tratamiento para un campo de 40 kV/cm.

De nuevo, con objeto de analizar la influencia del campo eléctrico (E, kV/cm), el tiempo de tratamiento (t,  $\mu$ s) y la temperatura máxima alcanzada

---

( $T_{\max}$ , °C) sobre los °Brix se aplica un análisis de regresión lineal a partir del cual se obtiene el siguiente modelo:

$$\text{°Brix} = 14.39 - 0.004T_{\max} - 0.001E - 0.0001t \quad (p < 0.01, R^2 = 76.8, \text{error} = 0.032)$$

El valor de  $R^2$  indica que el modelo predice el 76.8% de los datos obtenidos experimentalmente.

Resultados similares se obtienen por Rivas *et al.* (2005) para zumo de naranja-zanahoria que encuentran cambios en los °Brix para los campos y temperaturas más elevadas. Cserhalmi *et al.* (2006) tras estudiar el efecto de los PEAI (28 kV/cm, 100  $\mu$ s) sobre las propiedades físico-químicas de diferentes zumos de cítricos (uva, limón, naranja) recién exprimidos encuentran que los valores de pH de las muestras no cambian durante el tratamiento y en algunos casos se encuentran diferencias para los °Brix. Por otro lado, Sánchez-Moreno *et al.* (2005) encuentran para zumo de naranja que los valores de pH no se modifican durante el tratamiento por PEAI (35 kV/cm, 750  $\mu$ s), sin embargo encuentran un incremento para los °Brix.

Respecto a la presencia de peróxidos, no se detecta ni para las bebidas sin tratar, ni tras el tratamiento por PEAI, resultados que se muestran de acuerdo con los obtenidos por Cortés *et al.* (2005) para horchata tratada por PEAI.

Por otro lado, la determinación de hidroximetilfurfural es importante con objeto de evaluar los posibles pardeamientos no enzimáticos como consecuencia del tratamiento recibido por la muestra. El contenido en HMF en las bebidas sin tratar es de  $0.18 \pm 0.01$  mg/mL no encontrándose variaciones para ninguno de los tratamientos por PEAI aplicados. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Cserhalmi *et al.* (2006) para diferentes zumos cítricos tratados por PEAI (28 kV/cm, 100  $\mu$ s).

#### 4.3.2. Perfil de ácidos grasos.

El contenido total de grasa en la bebida sin tratar es de  $0.38 \pm 0.04$  g/100 g y tras el tratamiento por PEAI ésta se reduce significativamente ( $p < 0.05$ ) para ambos campos ensayados a partir de 60  $\mu$ s de tratamiento (Cuadro nº 36).

**Cuadro nº 36.** Contenido total de grasa de las bebidas de zumo de naranja y leche adicionadas con ácidos grasos omega 3 y oléico tras el tratamiento por PEAI.

E (kV/cm)	t ( $\mu$ s)	T <sub>max</sub> ( °C)	Grasa (g/100g)
0	0	25	$0.38 \pm 0.04^a$
35	40	39	$0.33 \pm 0.04^a$
35	60	40	$0.29 \pm 0.03^b$
35	80	46	$0.29 \pm 0.03^b$
35	100	51	$0.28 \pm 0.02^b$
35	130	54	$0.28 \pm 0.02^b$
35	180	65	$0.30 \pm 0.03^b$
0	0	25	$0.38 \pm 0.04^a$
40	40	43	$0.32 \pm 0.02^{ab}$
40	60	46	$0.31 \pm 0.03^b$
40	80	49	$0.29 \pm 0.01^b$
40	90	50	$0.27 \pm 0.02^b$
40	110	53	$0.27 \pm 0.01^b$
40	130	58	$0.29 \pm 0.04^b$

<sup>a-b</sup> diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de tratamiento aplicado.

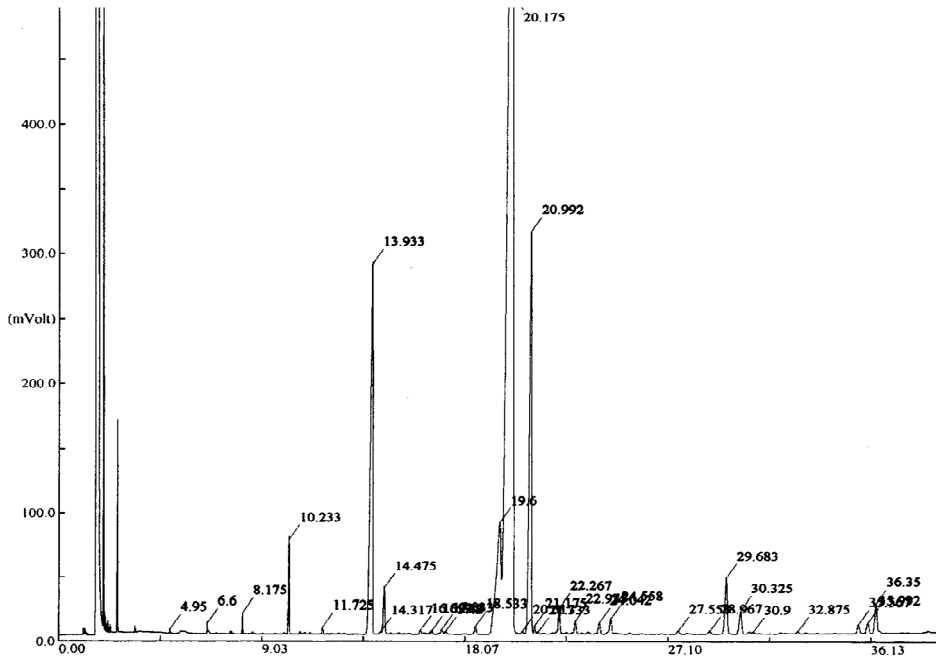
Una posible explicación a este hecho es que la aplicación de los PEAI reduzca el tamaño del glóbulo de grasa influyendo en su extracción pero debido a la falta de datos se requiere de una investigación más profunda. Barsoti *et al.* (2001) observan que no existen cambios en el tamaño del glóbulo de grasa y su distribución cuando tratan leche a 29 kV/cm durante 1600  $\mu$ s, sin embargo en el

mismo estudio observan que para nata líquida tratada a 32 kV/cm durante 2200  $\mu$ s se produce una reducción de la proporción de los grandes agregados y un aumento en la proporción de los pequeños lo que parece indicar que el tratamiento por PEAI tiende a disociar las micelas de grasa de la nata líquida con una reducción en la estabilidad de la emulsión tras el tratamiento. También, Buchheim *et al.* (1995, 1996) para leche tratada por altas presiones encuentran reducciones en el contenido total de grasa. Sin embargo Cortés *et al.* (2005) para horchata tratada por PEAI (20-35 kV/cm, 100-300  $\mu$ s) no encuentran variaciones en el contenido de grasa.

Con objeto de estudiar el efecto de los parámetros de tratamiento, campo eléctrico (E, kV/cm), tiempo ( $\mu$ s) y  $T_{\text{max}}^{\text{a}}$  ( $^{\circ}$ C) alcanzada sobre las concentraciones de grasa de la bebida se aplica un análisis de regresión lineal, encontrando que el tiempo de tratamiento y el campo eléctrico influye sobre dichas concentraciones, siendo el modelo obtenido:

$$\text{Grasa total (g/100 g)} = 0.380 - 0.0002t - 0.002E \quad (p < 0.001, R^2 = 83.1, \text{ error estandard} = 0.016)$$

En la Figura nº 31 se muestra un cromatograma del perfil graso de la bebida sin tratar mientras en el Cuadro nº 37 se especifican los diferentes tiempos de retención de los ácidos grasos detectados.



**Figura nº 31.** Cromatograma (CG) del perfil de ácidos grasos de la bebida de zumo de naranja y leche sin tratar.

**Cuadro nº 37.** Tiempos de retención (min) de los diferentes ácidos grasos presentes en la bebida.

	Ácido graso	Tiempo de retención (min)
1	Laurico C12:0	8.2±0.3
2	Mirístico C14:0	10.2±0.3
3	Palmitico C16:0	13.9±0.3
4	Palmitoleico C16:1	14.5±0.3
5	Estearico C18:0	19.5±0.3
6	Oleico C18:1	20.2±0.3
7	Linoleico C18:2	21.0±0.3
8	Linolenico C18:3	22.3±0.3
9	Araquidonico C20:0	24.3±0.3
10	Eicosapentanoico C20:5	29.7±0.3
11	Docosahexanoico C22:6	36.4±0.3

En los Cuadros n° 38, n° 39 y n° 40 se muestran los resultados obtenidos para cada tratamiento respecto a los perfiles de ácidos grasos saturados (AGS), ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), respectivamente. Los porcentajes de AGS, AGMI y AGI en las bebidas sin tratar son del 17.5%, 66.4% y 13.5%, respectivamente.

**Cuadro n° 38.** Variaciones en el porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS) tras el tratamiento por PEAI.

E (Kv/cm)	t (μs)	Laurico	Mirístico	Palmitico	Estearico	AGS
		C <sub>12:0</sub>	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	(%)
0	0	0.136±0.013	0.964±0.056	10.1±0.2	6.20±0.02	17.4±0.5
35	40	0.129±0.007	1.009±0.025	10.2±0.2	6.01±0.17	17.3±0.3
35	60	0.130±0.005	0.991±0.015	10.1±0.2	6.03±0.16	17.3±0.6
35	80	0.130±0.014	1.004±0.032	10.1±0.1	6.06±0.06	17.3±0.3
35	100	0.128±0.006	1.005±0.044	10.3±0.1	6.11±0.10	17.5±0.1
35	130	0.127±0.010	0.990±0.014	10.1±0.1	6.05±0.12	17.3±0.4
35	180	0.126±0.001	1.003±0.018	10.0±0.2	6.02±0.07	17.1±0.3
0	0	0.136±0.013	0.964±0.021	10.1±0.2	6.20±0.02	17.4±0.5
40	40	0.132±0.004	1.009±0.071	10.1±0.2	6.09±0.14	17.3±0.2
40	60	0.126±0.002	0.990±0.059	10.1±0.1	6.07±0.04	17.3±0.1
40	80	0.125±0.009	0.992±0.021	10.1±0.2	6.08±0.02	17.3±0.2
40	90	0.127±0.008	1.016±0.098	10.0±0.3	6.04±0.11	17.2±0.6
40	110	0.119±0.005	0.999±0.059	9.9±0.5	6.01±0.13	17.0±0.7
40	130	0.126±0.002	1.003±0.069	9.9±0.3	5.99±0.20	17.0±0.4

AGS, ácidos grasos saturados.

**Cuadro nº 39.** Variaciones en el porcentaje de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) tras el tratamiento por PEAI.

<b>E (Kv/cm)</b>	<b>t (µs)</b>	<b>Palmitoleico C<sub>16:1</sub></b>	<b>Oleico C<sub>18:1</sub></b>	<b>AGMI (%)</b>
0	0	0.913±0.033	65.5±0.6	66.41±0.2
35	40	0.901±0.026	65.7±0.4	66.60±0.4
35	60	0.892±0.009	65.5±0.6	66.39±0.4
35	80	0.907±0.019	65.7±0.2	66.61±0.4
35	100	0.938±0.014	65.2±0.1	66.14±0.6
35	130	0.939±0.073	65.3±0.4	66.24±0.6
35	180	0.938±0.031	66.0±0.3	66.94±0.5
0	0	0.913±0.032	65.5±0.6	66.41±0.5
40	40	0.956±0.019	65.4±0.1	66.35±0.1
40	60	0.936±0.033	65.6±0.2	66.53±0.2
40	80	0.917±0.008	65.6±0.1	66.52±0.1
40	90	0.906±0.034	65.8±0.5	66.70±0.4
40	110	0.883±0.034	66.0±0.6	66.88±0.5
40	130	0.921±0.018	65.9±0.3	66.92±0.4

AGMI, ácidos grasos monoinsaturados



**Cuadro nº 40.** Variaciones en el porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) tras el tratamiento por PEAI.

E (kV/cm)	t ( $\mu$ s)	Linoleico	Linolénico	Araquidónico	EPA	DHA	AGPI
		C <sub>18:2</sub>	C <sub>18:3</sub>	C <sub>20:4</sub>	C <sub>20:5</sub>	C <sub>22:6</sub>	(%)
0	0	10.6±0.4	0.473±0.042	0.279±0.057	1.48±0.03	0.680±0.120	13.5±0.2
35	40	10.6±0.6	0.459±0.095	0.277±0.032	1.46±0.13	0.655±0.109	13.4±0.4
35	60	10.6±0.6	0.460±0.081	0.277±0.034	1.48±0.14	0.669±0.119	13.4±0.4
35	80	10.6±0.7	0.465±0.057	0.277±0.067	1.47±0.11	0.662±0.096	13.4±0.4
35	100	10.6±0.7	0.470±0.062	0.268±0.014	1.45±0.13	0.656±0.086	13.4±0.6
35	130	10.6±0.7	0.464±0.093	0.277±0.053	1.46±0.11	0.661±0.081	13.4±0.6
35	180	10.7±0.7	0.467±0.084	0.276±0.019	1.48±0.12	0.670±0.112	13.5±0.5
0	0	10.6±0.4	0.473±0.043	0.279±0.057	1.48±0.03	0.680±0.120	13.5±0.2
40	40	10.6±0.6	0.459±0.070	0.272±0.024	1.47±0.13	0.677±0.073	13.5±0.3
40	60	10.6±0.6	0.452±0.092	0.272±0.014	1.45±0.13	0.660±0.110	13.5±0.3
40	80	10.6±0.7	0.448±0.086	0.270±0.033	1.45±0.13	0.647±0.117	13.4±0.3
40	90	10.6±0.7	0.454±0.081	0.268±0.045	1.44±0.09	0.652±0.100	13.4±0.5
40	110	10.6±0.7	0.451±0.074	0.268±0.014	1.47±0.10	0.665±0.097	13.5±0.4
40	130	10.6±0.7	0.463±0.074	0.269±0.018	1.47±0.13	0.654±0.096	13.5±0.4

EPA: ácido eicosapentanoico

DHA: ácido docosahexanoico

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

El análisis de la variación de las concentraciones de AGS, AGMI y AGPI para cada tratamiento aplicado, muestra que no existen diferencias significativas entre las bebidas tratadas y sin tratar. El porcentaje de AGS se reduce ligeramente tras los tratamientos pero, los cambios obtenidos no son estadísticamente significativos.

Respecto a los porcentajes de ácidos grasos individuales se observa una pequeña reducción en el porcentaje de ácido láurico ( $p>0.05$ ) tras la aplicación de ambos campos de tratamiento de modo que en la bebida sin tratar es de 0.136% mientras que dicho porcentaje se reduce a 0.129% y 0.126% para los campos 35 y 40 kV/cm, respectivamente. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Gardé-Cerdán *et al.* (2007), que encuentran para zumo de uva que el tratamiento por calor así como el tratamiento por PEAI produce únicamente variaciones en las concentraciones de ácido láurico. Los AGMI, ácido palmitoleico y oléico, no sufren ningún cambio tras la aplicación de los tratamientos. Respecto a los AGPI, no se encuentran variaciones en el porcentaje de ácido araquidónico ( $\omega-6$ ) sin embargo, los ácidos grasos  $\omega-3$ , eicosapentanoico (EPA) y docosahexanoico (DHA), sufren una pequeña reducción ( $p>0.05$ ) tras el tratamiento, siendo el porcentaje de EPA y DHA para las bebidas sin tratar de 1.48% y 0.680% respectivamente mientras que tras el tratamiento por PEAI a 35 kV/cm se reducen a 1.46% y 0.662% respectivamente y tras el tratamiento a 40 kV/cm los porcentajes se sitúan en 1.45% y 0.659%, respectivamente. Del mismo modo el porcentaje de ácido  $\alpha$ -linolénico se reduce desde 0.473% en la bebida sin tratar a 0.464% y 0.454% tras el tratamiento a 35 kV/cm y 40 kV/cm, respectivamente. Ninguna de estas variaciones fue significativa estadísticamente y desde el punto de vista nutricional pueden considerarse despreciables.

#### **4.4. CONCLUSIONES**

El presente estudio evidencia que la tecnología por PEAI no afecta significativamente a las concentraciones de ácidos grasos y los cambios tanto cuali como cuantitativamente encontrados son despreciables desde el punto de vista nutricional. Además no se observan alteraciones por generación de peróxidos o furfurales. Por todo ello, las bebidas de zumo de naranja y leche tratadas por PEAI adicionadas con ácidos grasos pueden ser propuestas como un buen vehículo para incrementar el consumo de ácidos grasos  $\omega-3$  y oleico.

Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación científica:

**Zulueta A.**, Esteve, M.J., Frasquet, I., Frígola, A. (2007). Fatty acid profile changes during orange juice-milk beverage processing by high-pulsed electric field. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109 (1), 25-31.



## **CAPÍTULO 5. Capacidad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>) de la leche, lactosuero y suero deproteínizado.**

### **5.1. INTRODUCCION**

Debido a la falta de métodos oficiales para la determinación de la capacidad antioxidante total en alimentos, se realiza una estancia en la Universidad de Perugia con objeto de aprender a manejar el método ORAC (Oxygen Radical Antioxidant Capacity) y realizar determinaciones de capacidad antioxidante en muestras de leche. Para conocer los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante total de la leche, se separan las muestras en diversas fracciones: caseína, lactosuero (obtenido mediante precipitación de la caseína con ácido acético) y suero deproteínizado (obtenido mediante precipitación de la caseína con ácido tricloroacético) y se estudia por separado la capacidad antioxidante de cada una de ellas.

### **5.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.2.1. Muestras**

Se analizan 13 muestras de leche de varias marcas comerciales adquiridas en supermercados de la localidad de Perugia (Italia) con distinto contenido graso: leche entera (3.5% grasa), leche semidesnatada (1.55% grasa) y leche desnatada (0.2% grasa) sometidas a diferentes tratamientos de conservación (UHT y pasteurización). Por otro lado, con objeto de evitar posibles variaciones entre las muestras, la central lechera local (Grifo Latte S.L) participa en el estudio y cede muestras de leche UHT pertenecientes al mismo lote de leche cruda con diferente contenido graso (entera, semidesnatada y desnatada) de modo que éste sea la única variable entre ellas.

## 5.2.2. Capacidad antioxidante total (ORAC) (Ou et al. 2001).

### 5.2.2.1. Material y Reactivos:

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxilo), 97%, Sigma-Aldrich.
- AAPH: 2,2'-azo-bis(2-metilpropionamidin) dihidrocloro (AAPH), 97%, Sigma-Aldrich.
- Fluoresceína disódica (sal disódica de 3',6'-dihidroxi-espíro [isobenzofuran-1(3H),9'-(9H) xanten]-3-ona), 95%, Carlo Erba (Milán, Italia).
- Dihidrógenofosfato potásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 99.5%, BHD (Milán, Italia).
- Ácido acético glacial, >99.9%, BHD (Milán, Italia)
- Ácido tricloroacético glacial, 95%, BHD (Milán, Italia)

### 5.2.2.2. Instrumentación.

- Espectrofluorímetro JASCO FP-750 (Tokio, Japón)
- Baño termoestabilizado JASCO (Tokio, Japón).
- Software Jasco FP-700 v.1.30.

### 5.2.2.3. Preparación de los reactivos

- Tampón fosfato (75 mM, pH 7.2): se disuelven 13.19 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y 10.26 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 900 mL de agua desionizada. Inmediatamente después de la mezcla el pH se ajusta mediante medida simultánea en un pHmetro con ácido fosfórico, la disolución con el pH ajustado se lleva a 1000 mL en un matraz aforado.
- Patrón estándar Trolox: Se parte de una disolución madre que se prepara disolviendo 11 mg de Trolox en el tampón fosfato (75 mM, pH 7.2) y se lleva a 50 mL en un matraz aforado. Esta disolución conteniendo 852.7 mM es estable a  $-80^\circ\text{C}$  durante 4 meses. La disolución de trabajo

(21.32 mM) se prepara diluyendo 1:40 (v/v) la disolución madre en tampón fosfato.

- Radical AAPH (160 mM): se pesan 434 mg de AAPH y se llevan a 10 mL en un matraz aforado con tampón fosfato. Esta disolución debe prepararse antes de cada determinación.
- Fluoresceína (FL) ( $4 \times 10^{-6}$  mM): se pesan 19.8 mg de fluoresceína disódica y se llevan a 50 mL con tampón fosfato. Esta disolución madre (1 mM) se diluye 1:1000 (v/v) con tampón fosfato tomando 100  $\mu$ L de la misma y llevándola a 100 mL con tampón fosfato y posteriormente se diluye 1:250 para obtener la disolución de trabajo (4 nM).

#### 5.2.2.4. Preparación de las muestras

Las muestras de leche almacenadas en la nevera ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ), se llevan a temperatura ambiente y posteriormente se diluyen 1:500 (v/v) con tampón fosfato.

El lactosuero, se obtiene mediante precipitación de las caseínas con ácido acético al 10%. Para ello se colocan 9.5 mL de leche en un tubo y se añaden 0.5 mL de ácido acético. La mezcla se agita durante 30 s y posteriormente se incuba a  $42^\circ\text{C}$  durante 10 min. Transcurrido este tiempo la muestra se enfría y se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min. A continuación se recoge 1 mL del sobrenadante y se lleva a 50 mL con tampón fosfato en un matraz aforado. Un mililitro de dicha disolución se diluye 1:5 (v/v) con tampón fosfato para obtener una dilución final 1:250.

El suero deproteinizado se obtiene mediante precipitación total de las proteínas de la leche con ácido tricloroacético al 20%. Para ello a 10 mL de leche se le añaden 10 mL de ácido tricloroacético (20%) y se agita durante 30 s. Transcurrido este tiempo la muestra se incuba a  $42^\circ\text{C}$  durante 10 min. A continuación se enfría y se centrifuga a 3000 rpm durante 15 min. Se toma 1 mL de la disolución anterior se lleva a 25 mL con tampón fosfato y posteriormente se diluye 1:5 (v/v) para obtener una dilución final 1:250.

### 5.2.2.5. Modo operatorio

El método de medida de la capacidad antioxidante ORAC, se basa en la decadencia de la fluorescencia emitida por la fluoresceína (FL), en presencia de especies radicales del oxígeno (ROO•) comparándola con la decadencia de la fluorescencia en presencia de un antioxidante de referencia (Trolox) o una muestra que contiene especies antioxidantes capaces de inhibir el efecto de los radicales libres en el medio (AAPH).

En cada determinación, gracias a la disponibilidad de 4 celdas rotatorias en el espectrofluorímetro, se determinan, un blanco, la disolución patrón de Trolox (20 µM) y un duplicado de la muestra a analizar utilizando los volúmenes que se especifican en el Cuadro nº 41.

**Cuadro nº 41.** Volúmenes (µl) de las disoluciones adicionadas a la cubeta de medida para la determinación de la capacidad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>)

<b>Reactivo</b>	<b>Blanco</b>	<b>Trolox</b>	<b>Muestra</b>	<b>Muestra</b>
Tampón	250	0	0	0
FL	1500	1500	1500	1500
Trolox	-	250	-	-
Muestra	-	-	250	250
AAPH	250	250	250	250
<b>TOTAL</b>	<b>2000</b>	<b>2000</b>	<b>2000</b>	<b>2000</b>

Previamente a la realización de la medida, las muestras se incuban durante 15 min a 37°C, a continuación se añade el radical AAPH que da comienzo a la reacción y se toma la medida de FL (tiempo cero). Los valores de intensidad de fluorescencia (IF) se toman cada 2 minutos hasta que se alcanza un valor de lectura del 1.5% de la inicial.

Los valores de ORAC<sub>FL</sub> se expresan como µmol/L Equivalentes de Trolox (µM TE) y se calculan aplicando la siguiente fórmula:



$$\text{ORAC}(\mu\text{M TE}) = \frac{C_{\text{Trolox}} \cdot (\text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{Blanco}}) \cdot k}{(\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{Blanco}})}$$

donde  $C_{\text{Trolox}}$  es la concentración de Trolox (21.32  $\mu\text{M}$ ),  $k$  es el factor de dilución de la muestra y AUC es el área bajo la curva de decadencia de la fluorescencia del blanco, Trolox y muestra, respectivamente. A su vez, el área bajo la curva (AUC) se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\text{AUC} = (f_0 - f_{n+2}) + 2(f_2 + f_4 + f_6 + f_8 + \dots + f_{n+2})$$

Donde,  $f_0$  es el valor inicial de la intensidad de fluorescencia a tiempo inicial y  $f_2$ ,  $f_4$ ,  $f_6$ ,  $f_8$ , ...  $f_{n+2}$  son las intensidades de fluorescencia a los 2, 4, 6, 8, y  $n+2$  min (36-44 min), respectivamente.

### 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

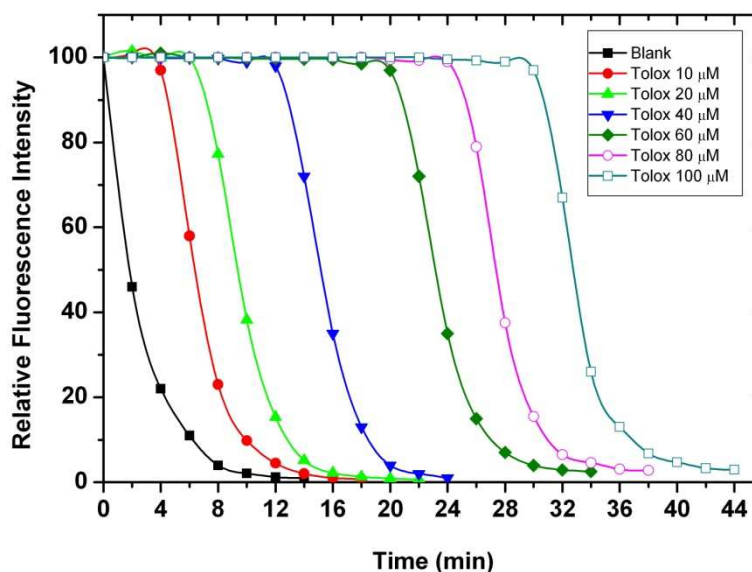
#### 5.3.1. Parámetros analíticos.

El ensayo de capacidad antioxidante  $\text{ORAC}_{\text{FL}}$  descrito por Ou *et al.* (2001) utiliza un equipo automático de medida COBAS FARA II. Sin embargo, presenta una desventaja ya que este tipo de instrumentos no se encuentra en todos los laboratorios debido a sus elevados costes (Awika *et al.* 2003) por ello el primer paso es la adaptación de la aplicación de este método en un fluorímetro tradicional que suele encontrarse en la mayoría de laboratorios. Las condiciones experimentales son las siguientes:

- [Fluoresceína]= 4.0 nM
- [AAPH]= 160 mM
- $\lambda_{\text{excitación}}$ = 493 nm
- $\lambda_{\text{emisión}}$ = 515 nm
- Banda espectral= 5 nm tanto para el monocromador de excitación como el de emisión

- Respuesta= 4 s
- Sensibilidad= alta.

Con estas condiciones el decaimiento de la fluorescencia por debajo del 1.5% del valor inicial tiene lugar entre 36-46 min. La cinética de la pérdida de fluorescencia debida al ataque de los radicales libres en el medio, en presencia de diferentes concentraciones del antioxidante estándar (Trolox®) se muestra en la Figura nº 32. Representando el área bajo al curva (AUC) frente a las concentraciones de Trolox en el rango de 10-100  $\mu\text{M}$  se obtiene la siguiente curva de calibración:  $y = 357.76 + 30.62x$  ( $r^2 = 0.994$ ).



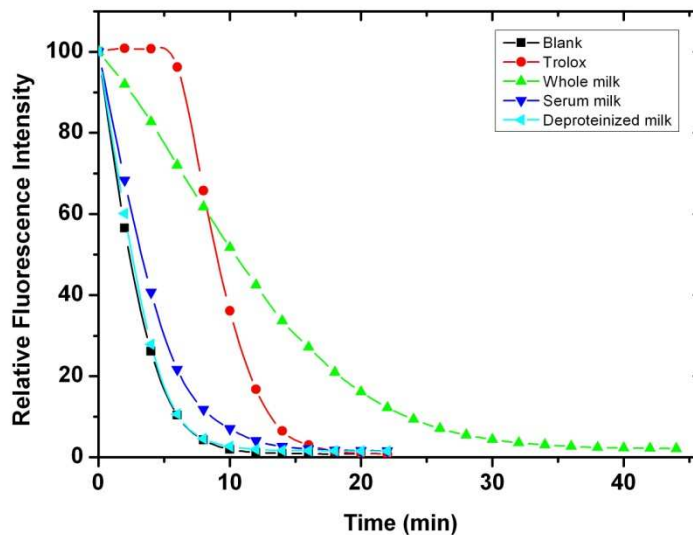
**Figura nº 32.** Cinéticas de decadencia de la Fluorescencia en presencia de concentraciones crecientes de Trolox.

El límite de detección (LD) se calcula aplicando la formula  $3.3\cdot\sigma/S$ , donde  $\sigma$  es la desviación estándar de la medida del blanco y  $S$  es la pendiente de la curva de calibración del patrón de referencia (Trolox) (Federal Register, 1997).

El valor de  $\sigma$  se calcula mediante medida de 20 repeticiones del blanco siendo igual a 49.8. El LD obtenido es de  $5.4 \mu\text{M TE}$  y el límite de cuantificación (LC) calculado a partir de la fórmula  $10\cdot\sigma/S$  es de  $16.3 \mu\text{M TE}$ . Los límites de detección y cuantificación son comparables a los obtenidos por Ou *et al.* (2001).

### 5.3.2. Capacidad antioxidante de la leche.

Los valores de  $\text{ORAC}_{\text{FL}}$  obtenidos para las diferentes muestras de leche se detallan en el Cuadro nº 42. Estos valores oscilan entre  $11995\pm 456 \mu\text{M TE}$  y  $14518\pm 356 \mu\text{M TE}$ . La Figura nº 33 muestra la curva de decadencia de la fluorescencia para el blanco, el patrón de Trolox ( $21.32 \mu\text{M}$ ), una muestra de leche entera, el lactosuero obtenido tras precipitación de la caseína con ácido acético y el suero deproteinizado, obtenido por precipitación con ácido tricloroacético.



**Figura nº 33.** Curva de decadencia de la intensidad de fluorescencia inducida por el radical AAPH para una muestra de leche semidesnatada pasteurizada y las fracciones séricas de ésta.

**Cuadro nº 42.** Valores de ORAC<sub>FL</sub> (µmol TE/L) de las muestras de leche comerciales y sus respectivas fracciones.

Leche	Leche <sup>(a)</sup>	Lactosuero <sup>(b)</sup>	Suero deproteinizado <sup>(c)</sup>
<b>UHT</b>			
Leche entera	13606±735 (5.4)	451±15.5 (3.4)	n.d.
Leche entera <sup>(d)</sup>	14481±328 (2.3)	665±12.7 (1.9)	129±5.9 (4.6)
Leche semidesnatada <sup>(d)</sup>	13874±312 (2.3)	565±15.0 (2.7)	63±3.1 (4.9)
Leche semidesnatada	11995±456 (3.8)	385±19.8 (5.1)	n.d.
Leche semidesnatada	14518±356 (2.5)	648±13.7 (2.1)	35±2.2 (6.3)
Leche semidesnatada	12027±212 (1.8)	192±9.6 (5.0)	n.d.
Leche desnatada	12157±123 (1.1)	1045±13.1 (1.3)	n.d.
Leche desnatada	12826±300 (2.3)	518±12.9 (2.5)	n.d.
Leche desnatada <sup>(d)</sup>	13109±234 (1.8)	583±15.3 (2.6)	43±2.4 (5.6)
<b>PASTERIZADA</b>			
Leche entera	14124±984 (7.0)	1130±25.9 (2.3)	394±18.0 (4.6)
Leche entera	14216±1051 (7.4)	791±20.4 (2.6)	464±21.4 (4.6)
Leche entera	14176±136 (0.96)	1319±27.2 (2.1)	531±16.2 (3.1)
Leche semidesnatada	13624±715 (5.2)	1031±25.8 (2.5)	240±14.2 (5.9)
Leche semidesnatada	13673±823 (6.1)	571±19.2 (3.4)	299±15.3 (5.1)
Leche semidesnatada	13984±532 (3.8)	1294±35.2 (2.7)	440±16.0 (3.6)
Leche semidesnatada	13748±397 (4.3)	1128±28.4 (2.5)	610±16.9 (2.8)

Entre paréntesis se indica el CV (%).

(a) Media por cuadruplicado.

(b) Medida por duplicado.

(c) Precipitación total de las proteínas con ácido tricloroacético. Medida por duplicado.

(d) Muestras de leche del mismo origen procedentes de la industria.

n.d = no detectado.

Estadísticamente, no existen diferencias significativas entre los valores de ORAC<sub>FL</sub> de las muestras UHT (13263.6±1030.5 µM TE) y las muestras pasterizadas (13932.1±796.9 µM TE) aunque es ligeramente superior para estas últimas lo que indica que los tratamientos por esterilización no influyen substancialmente en la capacidad antioxidante total de la leche. Este resultado puede deberse a que, como apuntan algunos autores, el tratamiento térmico de la leche, produce una desestabilización y apertura de la estructura de las

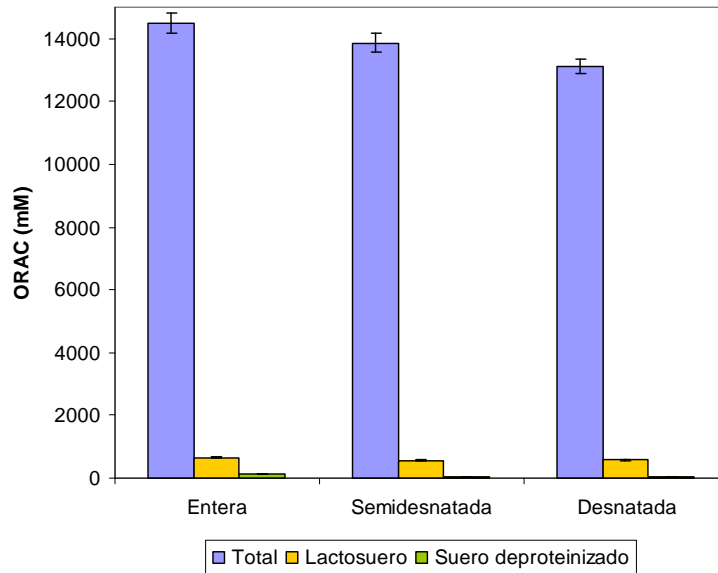
proteínas de modo que los grupos tiol quedan expuestos hacia el exterior pudiendo actuar como dadores de hidrógeno con el consecuente aumento de la capacidad antioxidante (Taylor y Richardson, 1980; Tong *et al.* 2000). Por otro lado, Calligaris *et al.* (2004) cuando estudian el efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades antioxidantes de la leche encuentran que ésta no sufre cambios tras un tratamiento térmico suave (<100°C, 1 min) pero tratamientos térmicos más severos producen un incremento de la misma, debido a la formación de melanoidinas. Según han demostrado diversos autores, las melanoidinas poseen capacidad antioxidante y el proceso UHT (140-150°C/3-7 s) que reciben puede dar lugar a la formación de éstas (McGookin y Austin, 1991).

Por otro lado, los valores de ORAC<sub>FL</sub> para la leche entera, semidesnatada y desnatada deberían aumentar en proporción al contenido en grasa debido a que muchas de las vitaminas con carácter antioxidante presentes se encuentran en la fracción liposoluble (vitamina A,  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno). Sin embargo, se encuentra que para las muestras de leche pasteurizadas existen diferencias significativas entre las muestras de leche entera y semidesnatada, pero por el contrario, para las muestras UHT no se observan dichas diferencias. Este hecho, puede deberse a la formación de melanoidinas o, a la propia variabilidad entre las muestras comerciales.

Con objeto de profundizar más sobre estas observaciones, se cuenta con la participación de la industria lechera local, Grifo Latte, que proporciona muestras de leche con diverso contenido graso: entera (3.5% grasa), semidesnatada (1.55% grasa) y desnatada (0.2% grasa) procedientes de la misma muestra de leche cruda y todas ellas procesadas por tratamiento UHT de modo que, la única variable entre ellas es su contenido en grasa. El análisis ANOVA para estas muestras determina que existen diferencias significativas entre ellas tal y como puede observarse en la Figura nº 34 encontrándose una correlación estadísticamente significativa ( $r= 0.971$ ,  $p<0.05$ ) entre el contenido de grasa y la capacidad antioxidante total. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Chen *et al.* (2003) que cuando estudian la

capacidad antioxidante de la leche de vaca mediante el método ABTS<sup>•+</sup> encuentran que los valores de capacidad antioxidante total se incrementan significativamente con el contenido en grasa.

Cabe señalar, que la diferencia entre los valores de ORAC<sub>FL</sub> de la leche entera (14481±328 μM TE) y la leche desnatada (13109±234 μM TE) es muy pequeña (1372 μM TE) lo que demuestra la modesta contribución de la fracción lipídica a la capacidad antioxidante total de la leche.



**Figura nº 34.** Variación en los valores de ORAC<sub>FL</sub> en función del contenido de grasa de la leche.

### 5.3.3. Capacidad antioxidante del lactosero.

Los valores de ORAC<sub>FL</sub> para el lactosero obtenido por precipitación de la caseína con ácido acético se sitúan en el intervalo de 1319±27.2 μM TE a 192±9.6 μM TE (Cuadro nº 42). Estos valores corresponden principalmente a la contribución de las proteínas del lactosero que constituyen aproximadamente el 20% de las proteínas de la leche y están representadas principalmente por la β-lactoglobulina (β-Ig) y α-lactalbúmina (α-la) en un 70-80%, las

inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) y la albúmina sérica. En cantidades menores, se encuentran otras proteínas como la lactoferrina y proteínas de membrana.

Como puede observarse, los valores de  $ORAC_{FL}$  tanto para las muestras UHT como pasterizadas son muy pequeños en comparación con los obtenidos para la fracción entera de leche. Es por ello que puede afirmarse que el mayor contribuyente a la capacidad antioxidante total es la fracción caseica. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Chen *et al.* (2003) que observan que incluso la leche desnatada posee una mayor capacidad antioxidante (ABTS) que el suero y que por tanto el aporte principal a esos valores vendría dado por la caseína.

Por otro lado, se obtienen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para los valores de  $ORAC_{FL}$  del lactosuero según el tipo de tratamiento de conservación aplicado, de modo que las muestras UHT presentan valores de capacidad antioxidante menores que los obtenidos para las muestras pasterizadas (Cuadro nº 42).

#### **5.3.4. Capacidad antioxidante del suero deproteínizado.**

Los valores de  $ORAC_{FL}$  para el suero deproteínizado son, como cabe esperar, menores que los del lactosuero. El suero deproteínizado se obtiene por precipitación total de las proteínas de la leche mediante adición de ácido tricloroacético de modo que los únicos componentes antioxidantes que puede contener son el ácido ascórbico y el ácido úrico. Como puede observarse en el Cuadro nº 42, para algunas muestras de leche los valores de  $ORAC_{FL}$  del suero deproteínizado son imposibles de determinar ya que el área bajo la curva (AUC) es menor o igual a la del blanco (Figura nº 33). Del mismo modo que para el suero precipitado con ácido acético, los valores de  $ORAC_{FL}$  para el suero deproteínizado difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) entre las muestras UHT y las muestras pasterizadas, siendo mayores los valores para estas últimas. Estos resultados podrían explicarse por una mayor retención de vitamina C y antioxidantes hidrosolubles tras el tratamiento por pasterización.

Las diferencias de concentración de vitamina C entre ambos tipos de muestras se demostró en un artículo reciente (Burini, 2007). Además, según demuestran diversos estudios, la vitamina C y otras vitaminas hidrosolubles de la leche se pierden durante el tratamiento por calor así como durante el almacenamiento de la misma mientras las vitaminas liposolubles son más estables (Korhonen y Korpela, 1994).

Asimismo, se encuentra una correlación entre los valores de ORAC<sub>FL</sub> del lactosuero y del suero deproteinizado ( $r= 0.780$ ,  $p<0.001$ ). Sin embargo, no se encuentran correlaciones entre los valores de ORAC<sub>FL</sub> de la fracción entera de leche y los correspondientes al suero debido a la elevada contribución de la caseína a los valores de capacidad antioxidante total.

Este estudio y los datos obtenidos del mismo establecen que algunos componentes de la leche proporcionan una elevada capacidad antioxidante, siendo la fracción caseica la que produce las mayores aportaciones. Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Cervato *et al.* (1999) que evalúan la capacidad antioxidante de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\kappa$  caseína en modelos liposomiales encontrando que todas ellas son capaces de inhibir la peroxidación del ácido araquidónico inducida por el sistema Fe/ascorbato monitorizándola a través del índice de TBARS y, con los obtenidos por Laakso (1984) que encuentra que la caseína es capaz de inhibir la autooxidación lipídica catalizada por el enzima lipoxigenasa.

Para explicar la actividad antioxidante de la caseína, Laakso (1984) sugiere que el secuestro de los radicales libres se efectúa a través de la oxidación de los residuos de aminoácidos de la propia caseína. Esta actividad no puede ser sustituida por los propios aminoácidos ya que es la estructura primaria de la caseína la que juega un papel fundamental en el secuestro de dichos radicales libres. Estudios más recientes han demostrado que algunos péptidos derivados de la digestión péptica (pepsina, tripsina) de la caseína poseen actividad antioxidante (Suetsuna *et al.* 2000; Rival *et al.* 2001b; Kitts y Weiler, 2003; Diaz y Decker, 2004). Otros péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática con corolasa PP de  $\beta$ -lactoglobulina también demuestran dicha actividad (Hernández-



Ledesma *et al.* 2005). Este aspecto es realmente importante ya que como ha sido demostrado (Pihlanto, 2006), la hidrólisis de la caseína por los enzimas proteolíticos como la pepsina o tripsina que se produce a nivel gástrico produce péptidos activos que poseen una marcada actividad antioxidante.

#### 5.4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a partir del análisis  $ORAC_{FL}$  se deduce que la capacidad antioxidante de la leche es elevada y se debe principalmente a la fracción caseica. Asimismo, existen diferencias estadísticamente significativas según el tratamiento de conservación aplicado (UHT, pasteurización) y el contenido graso de la leche de modo que la leche entera presenta una ligera mayor capacidad antioxidante total ( $ORAC_{FL}$ ).

La capacidad antioxidante del lactosuero es mucho menor que la correspondiente a la fracción entera variando dicha capacidad según el tratamiento de conservación aplicado, siendo mayores los valores de  $ORAC_{FL}$  para la leche pasteurizada debido posiblemente a la sensibilidad al calor de la albúmina.

La capacidad antioxidante del suero deproteinizado es muy baja respecto al resto de fracciones y se debe principalmente a los antioxidantes de tipo hidrosoluble como vitamina C o ácido úrico. El suero deproteinizado de las muestras de leche pasteurizadas presenta valores de  $ORAC_{FL}$  significativamente superiores a los correspondientes a las muestras UHT.

Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación científica:

**Zulueta A.**, Maurizi, A., Frígola, A., Esteve, M.J., Coli, R., Burini, G. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Journal of Dairy Technology*, 2009, 380-385.



## **CAPÍTULO 6. Comparación de los métodos ORAC y TEAC para la medida de la capacidad antioxidante en muestras de zumo y leche.**

### **6.1. INTRODUCCION.**

Debido a la falta de métodos oficiales para la determinación de la capacidad antioxidante, las actuales recomendaciones indican que para cada tipo de alimento, dicha determinación debe realizarse por diversos métodos de análisis con fundamentos distintos. Es por ello que, una vez adquiridos los conocimientos y la destreza necesaria para la realización del ensayo ORAC en muestras de leche, se pone a punto el método en el laboratorio del área de Nutrición y Bromatología con las infraestructuras de las que se dispone y se compara con el método TEAC utilizado hasta el momento, con objeto de evaluar la idoneidad de ambos métodos para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de zumo de naranja, leche y bebidas de zumo de naranja y leche.

### **6.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **6.2.1 Muestras.**

Las muestras analizadas son: zumo fresco de naranja, leche semidesnatada y la mezcla de zumo de naranja y leche.

**6.2.2. Método TEAC.** (Ver capítulo 3, apartado 3.2.4.4.)

#### **6.2.3. Método ORAC.**

En este caso, en el laboratorio se cuenta con un fluorímetro automático VICTOR<sup>2</sup> (Perkin-Elmer, USA) siguiendo igualmente el método descrito por Ou *et al.* (2001).

#### 6.2.3.1. Material y Reactivos

- Fluoresceína (FL), Sigma-Aldrich.
- AAPH, 2,2'-azo-bis(2-metilpropionamidin) dihidrocloro, 97%, Sigma-Aldrich.
- Placas de 96 pocillos de fondo blanco y plano, Sero-Wel, Bibby Sterilin Ltd, Stone, UK.

#### 6.2.3.2. Instrumentación

- Wallac 1420 VICTOR<sup>2</sup> multilabel counter (Perkin-Elmer, USA)

#### 6.2.3.3. Preparación de reactivos.

- Fluoresceína (78 nM): Se prepara una disolución madre de FL pesando 44 mg de ésta y llevándola a 100 mL con tampón fosfato (75 mM, pH 7.0). La disolución madre se almacena en nevera (2°C) en completa oscuridad. La disolución de trabajo se prepara diariamente tomando 0.167 mL de la disolución anterior llevándola a 25 mL con tampón fosfato.
- AAPH (221.25 mM): Este reactivo se prepara diariamente pesando 600 mg de AAPH y se llevándolo a 10 mL con tampón fosfato.
- Trolox (20 µM): Se prepara diariamente desde una disolución madre de concentración 1 mM almacenada durante aproximadamente 2 meses en congelación a -20°C.

#### 6.2.3.4. Preparación de las muestras.

Debido a que el ensayo ORAC es muy sensible, las muestras deben diluirse previamente hasta obtener una solución limpia y transparente. En el caso de las muestras de leche, la dilución realizada es de 1:500 mientras para las muestras de zumo y zumo-leche se realiza una dilución 1:250.

### 6.2.3.5. Modo operatorio.

En cada pocillo de la placa se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de FL (78 nM) y 50  $\mu\text{L}$  de la muestra, blanco (tampón) o patrón (Trolox, 20  $\mu\text{M}$ ). Debido a la baja conductividad del material de la placa (polipropileno), pueden existir variaciones de temperatura entre los pocillos por lo que, previamente, la placa se incuba a 37°C durante 15 min y seguidamente se adicionan 25  $\mu\text{L}$  de AAPH (221.25 mM) en cada pocillo. La primera medida se efectúa inmediatamente después de la adición del radical y posteriormente se toman medidas cada 5 minutos por lo que el cálculo del área bajo la curva (AUC) se realiza utilizando la siguiente expresión:

$$\text{AUC} = (0.5 + f_5/f_0 + f_{10}/f_0 + \dots + f_{n+5}/f_0) \cdot 5$$

donde  $f_0$  es la fluorescencia inicial y  $f_n$  es la fluorescencia a tiempo n.

La reacción finaliza cuando los valores de fluorescencia obtenidos sean del 5% respecto a los valores iniciales.

Los valores de ORAC se calculan con la expresión:

$$\text{ORAC}(\mu\text{M TE}) = \frac{C_{\text{Trolox}} \cdot (\text{AUC}_{\text{muestra}} - \text{AUC}_{\text{Blanco}}) \cdot k}{(\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{Blanco}})}$$

## 6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.3.1. Parámetros analíticos.

Linealidad: En el ensayo ORAC, para calcular la linealidad, se preparan una serie de disoluciones de Trolox de concentraciones entre 0-100  $\mu\text{M}$  y se calcula el área bajo la curva descrita por la FL en cada caso. La ecuación de la curva de calibración obtenida es:  $y = 31.983 x + 999.57$  ( $r^2 = 0.991$ ).

En el ensayo TEAC, se prepara una recta patrón con concentraciones de Trolox entre 0-250  $\mu\text{M}$  y se toma la medida de la absorbancia inhibida por los antioxidantes a  $\lambda=734$  nm. La ecuación de la curva de calibración obtenida es:  $y = 0.2183x - 1.31$  ( $r^2 = 0.997$ ).

Precisión: La precisión instrumental y del método se calcula mediante medida de seis repeticiones consecutivas de una misma muestra y mediante determinación de la capacidad antioxidante de 6 alícuotas independientes de la muestra respectivamente. Para el ensayo ORAC, la precisión instrumental expresada como coeficiente de variación fue del 5.2% mientras la precisión del método fue del 6.7%. Para el ensayo TEAC, la precisión instrumental fue del 5.1% y la precisión del método fue del 5.7%.

Límites de detección: El límite de detección (LOD) se calcula preparando 10 blancos de reactivos y aplicando el cociente entre el triple de la desviación estandar ( $\sigma$ ) y la pendiente ( $m$ ) de la curva de calibración obtenida ( $LOD = 3.3 \cdot \sigma / m$ ). Los límites de detección obtenidos fueron de 8.1  $\mu$ M TE y 10.5  $\mu$ M TE para el método ORAC y TEAC respectivamente.

El límite de cuantificación (LOQ) corresponde a una cantidad, a partir de la cual, se puede cuantificar sin incertidumbre ( $LOQ = 10 \cdot \sigma / m$ ). Los límites de cuantificación fueron de 24.6  $\mu$ M TE y 31.9  $\mu$ M TE para el método ORAC y TEAC respectivamente.

Robustez: La robustez del método se evalúa analizando una solución de Trolox 20  $\mu$ M durante un periodo de 7 semanas a razón de una medida semanal. La reproducibilidad así analizada y expresada como coeficiente de variación fue de 9.9%. Para el ensayo TEAC, la robustez del método se evaluó analizando una solución de Trolox 50  $\mu$ M siendo la reproducibilidad del 8.5%.

### **6.3.2. Capacidad antioxidante de sustancias de referencia.**

Para comprobar la eficacia de cada método en la medida de la capacidad antioxidante, se analizan diferentes patrones de vitaminas y otros compuestos con capacidad antioxidante presentes en las muestras que se encuentran disponibles comercialmente: ácido ascórbico (Merck), ácido gálico  $\beta$ -caroteno, luteína, zeaxantina, y albúmina (Sigma-Aldrich). Aunque algunos autores otorgan la principal capacidad antioxidante de la leche a la fracción caseica, actualmente no se comercializan patrones de la misma.

Ácido ascórbico, ácido gálico y albúmina se preparan mediante disolución en agua destilada mientras que los carotenoides se disuelven en etanol por su naturaleza lipofílica. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro nº 43.

**Cuadro nº 43.** Capacidad antioxidante (ORAC y TEAC) de los patrones de referencia.

<b>Patrón</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>TEAC (<math>\mu</math>M TE)</b>	<b>ORAC (<math>\mu</math>M TE)</b>
Ácido ascórbico	0.026	90.5 $\pm$ 2.7	40.4 $\pm$ 2.1
Ácido gálico	0.900	160.8 $\pm$ 4.8	110.5 $\pm$ 5.8
Albúmina	0.015	97.1 $\pm$ 6.4	1190.1 $\pm$ 63.1
$\beta$ -caroteno	0.001	239.5 $\pm$ 21.2	582.4 $\pm$ 30.3
Luteína	0.001	40.2 $\pm$ 3.1	1246.5 $\pm$ 6.6
Zeaxantina	0.001	31.4 $\pm$ 1.6	1108.1 $\pm$ 5.9

Como puede observarse la capacidad antioxidante obtenida para el ácido ascórbico mediante ensayo TEAC es superior a la obtenida en el ensayo ORAC. Los resultados obtenidos para ácido gálico son similares para ambos métodos y la albúmina presenta mayor capacidad antioxidante por el método ORAC que por el TEAC. Cao *et al.* (1998) encuentran que la contribución del ácido ascórbico a la capacidad antioxidante total en suero era dos veces mayor mediante el método TEAC que por el método ORAC mientras la albúmina contribuía por igual en ambos métodos. Por otro lado, la capacidad antioxidante de los carotenoides determinada mediante el método TEAC tiene el siguiente orden:  $\beta$ -caroteno>luteína>zeaxantina coincidiendo estos resultados con los obtenidos por Miller *et al.* (1996). Sin embargo, mediante el método ORAC luteína y zeaxantina superan al  $\beta$ -caroteno en el valor obtenido, lo que puede deberse a la presencia de grupos OH en los anillos terminales.

Paralelamente, se preparan curvas de calibrado de concentración creciente para ácido ascórbico (20-40 mg/100 mL), ácido gálico (50-120 mg/mL) y albúmina (35-45 g/L) con objeto de comprobar la respuesta de ambos métodos frente a las diferentes concentraciones de dichos compuestos. Al aumentar la concentración de ácido ascórbico aumenta la capacidad antioxidante medida por ambos métodos TEAC ( $r^2=0.968$ ) y ORAC ( $r^2=0.958$ ). Los mismos resultados se observan para el ácido gálico ( $r^2=0.931$  y  $r^2=0.981$ , para TEAC y ORAC, respectivamente). Sin embargo, la concentración de albúmina se correlaciona con la capacidad antioxidante total cuando se mide por el método ORAC ( $r^2=0.946$ ) lo que no ocurre mediante el método TEAC ( $r^2=0.678$ ).

Además, durante el ensayo TEAC, se observa que la acción frente al radical ABTS•+ varía según los distintos patrones ensayados de modo que la vitamina C reacciona rápidamente con el radical ABTS•+ encontrándose la inhibición máxima tras un minuto de reacción y manteniéndose constante a lo largo del tiempo, resultados que, coinciden con los obtenidos por Re *et al.* (1999). Sin embargo, el ácido gálico, la albúmina, y los carotenoides prolongan su acción inhibitoria durante más tiempo por lo que será necesario optimizar el tiempo de inhibición en la medida de la capacidad antioxidante para el método TEAC. Re *et al.* (1999) estiman que el tiempo de medida de inhibición oscila entre 1 y 6 min.

### **6.3.3. Capacidad antioxidante de las bebidas a base de zumo y leche.**

Los valores de capacidad antioxidante total de la bebida de zumo de naranja y leche (50:20, v/v) ensayada mediante los métodos ORAC y TEAC (tiempo inhibición= 3 min) es de  $9648 \pm 361$   $\mu\text{mol/L TE}$  y  $3028 \pm 146$   $\mu\text{mol/L TE}$ , respectivamente. La capacidad antioxidante obtenida para el zumo de naranja es de  $10897 \pm 593$   $\mu\text{mol/L TE}$  (ORAC) y  $4875 \pm 293$   $\mu\text{mol/L TE}$  (TEAC) mientras que para la leche desnatada (0.1% grasa) los valores de capacidad antioxidante son de  $20867 \pm 742$   $\mu\text{mol/L TE}$  (ORAC) y  $2649 \pm 91$   $\mu\text{mol/L TE}$  (TEAC). La



diferencia de capacidad antioxidante ( $\mu\text{mol/L TE}$ ) según el método aplicado se debe a la distinta naturaleza de ambos ensayos.

Los valores de TEAC obtenidos para zumo de naranja, son similares a los obtenidos por Proteggente *et al.* (2003) que encuentran valores de  $4790\pm 80 \mu\text{mol/L TE}$  (variedad Navel); Pellegrini *et al.* (2003) que obtienen un valor aproximado de  $3020 \mu\text{mol TE/L}$  y Arena *et al.* (2001) que calculan un valor de  $5090 \mu\text{mol/L TE}$  para zumo recién exprimido. Mediante ensayo ORAC Wang *et al.* (1996) obtienen un valor de capacidad antioxidante para zumo de naranja ligeramente inferior ( $6820 \mu\text{mol/L TE}$ ) al obtenido en este estudio lo que puede explicarse por la utilización de la  $\beta$ -ficoeritrina ( $\beta$ -PE) como sonda fluorescente en lugar de la FL ya que como señalan Ou *et al.* (2001) los resultados obtenidos mediante empleo de la FL son de dos a tres veces mayores que los encontrados con la  $\beta$ -PE.

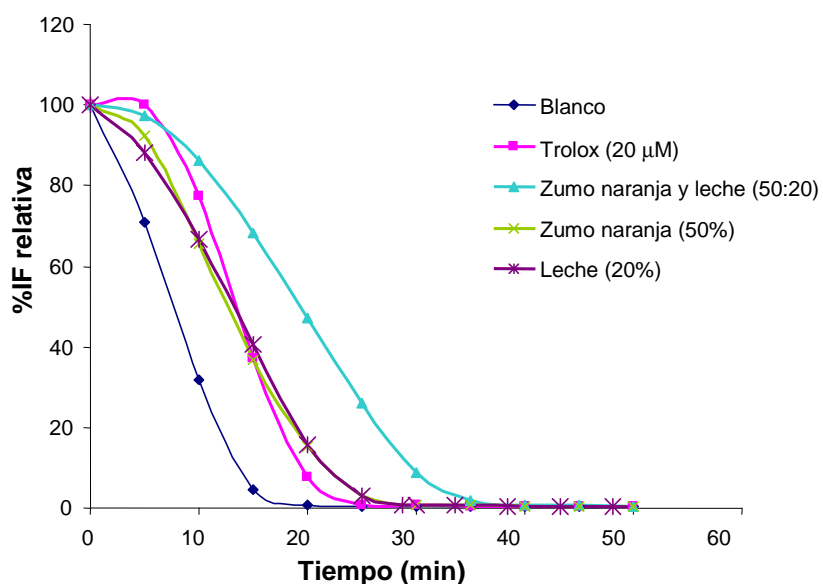
En cuanto a los valores de capacidad antioxidante en muestras de leche, Chen *et al.* (2003) obtienen valores de TEAC entre  $1246$ - $4560 \mu\text{mol/L TE}$  (dependiendo del pH del medio de reacción) para leche desnatada mientras Wegrzyn *et al.* (2008) para leche desnatada en polvo reconstituida obtienen valores de ORAC de  $20000 \mu\text{mol/L TE}$  lo que coindiría con los obtenidos en este estudio.

Con objeto de determinar la contribución de la leche y del zumo de naranja en la bebida, se preparan independientemente tres combinaciones, (1) la bebida original: zumo, leche, agua (50:20:30, v/v); (2) zumo-agua (50:50, v/v) y (3) leche: agua (20:80, v/v) respetando las proporciones de la mezcla original. La Figura nº 35 muestra la curva de decaimiento de la FL para las tres muestras. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro nº 44 donde puede observarse que la suma de los valores de ORAC en la mezcla zumo-agua (50:50) más la mezcla leche-agua (20:80) darían un valor próximo al de la combinación zumo-leche (50:20). Sin embargo, cuando se realiza la medida mediante ensayo TEAC, la leche aporta un menor valor de capacidad antioxidante que el zumo y la combinación zumo-leche no responde al valor

suma de las dos mezclas independientes, siendo similar a la del zumo: agua (50:50, v/v). Esta observación, hace preveer que para el ensayo TEAC la capacidad antioxidante hallada se deba a la fracción correspondiente al zumo.

**Cuadro nº 44.** Comparación de valores ORAC y TEAC en las muestras de zumo-leche (50:20, v/v), zumo (50%) y leche (20%).

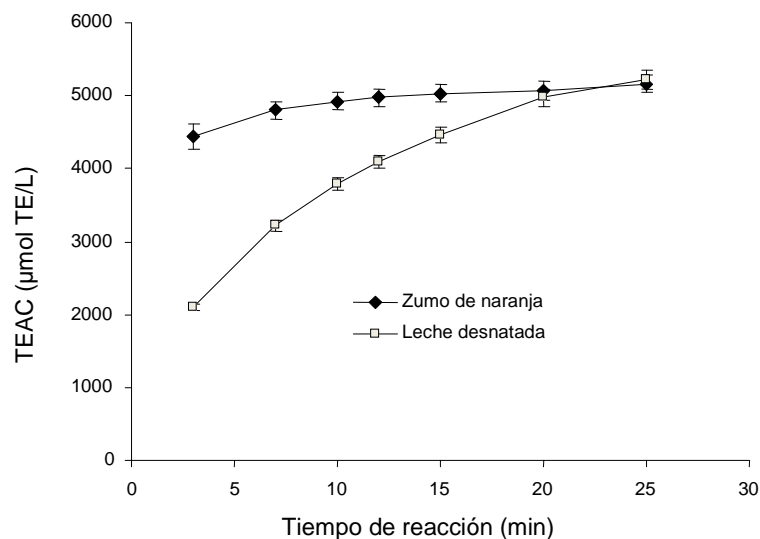
	ORAC ( $\mu\text{mol of TE/L}$ )	TEAC ( $\mu\text{mol of TE/L}$ )
Zumo:leche (50:20)	9472.91 $\pm$ 276.89	3636.67 $\pm$ 46.07
Zumo: agua (50:30)	4894.51 $\pm$ 288.66	3599.33 $\pm$ 125.15
Leche:agua (20:80)	3991.03 $\pm$ 156.54	2288.00 $\pm$ 157.95



**Figura nº 35.** Curva de decaimiento de la fluorescencia durante el ensayo ORAC en presencia de zumo de naranja, zumo de naranja-leche y leche.

Cabe señalar que el método ORAC es el único que hasta el momento considera el tiempo de inhibición total garantizando que a tiempo final todos los antioxidantes presentes en la muestra habrán reaccionado con los radicales libres presentes en el medio. Wang *et al.* (2004) comparan los métodos TEAC y ORAC para el análisis de antioxidantes en plasma encontrando que para el ensayo TEAC a los 3 minutos se produce una “subestimación” de la capacidad antioxidante total de las muestras y que son necesarios al menos 30 minutos para determinar la capacidad antioxidante de las mismas, momento a partir del cual se alcanzaba una situación de *plateau*. Samaniego-Sanchez *et al.* (2007) analizan la capacidad antioxidante mediante el método TEAC de diferentes aceites de oliva extendiendo la reacción hasta 30 min ya que a los 2 min la capacidad antioxidante observada era considerablemente menor.

Con objeto de optimizar el periodo de incubación para la completa inhibición del radical ABTS<sup>•+</sup> se extiende el tiempo de reacción monitorizando los cambios producidos cada 3 minutos. Los resultados muestran que, mientras el zumo de naranja inhibe rápidamente el radical ABTS<sup>•+</sup> (manteniéndose el porcentaje de inhibición constante con el tiempo), la leche presenta un bajo porcentaje de inhibición a tiempo inicial incrementándose paulatinamente hasta alcanzar a los 20 minutos un valor de capacidad antioxidante similar al del zumo 100% (Figura nº 36).



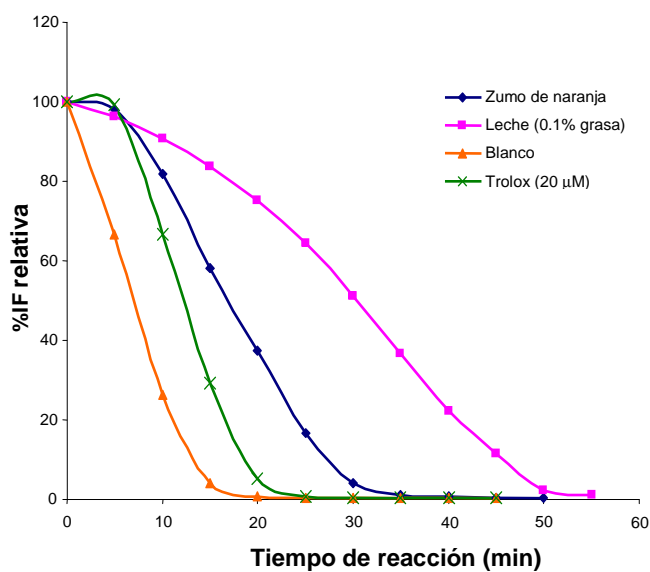
**Figura nº 36.** Evolución de los valores de capacidad antioxidante (TEAC, mmol TE/L) para zumo de naranja y leche desnatada a medida que avanza el tiempo de reacción.

Para el ensayo ORAC se estudian los cambios en el porcentaje de inhibición de la fluorescencia (%IF) a medida que transcurre la reacción (Cuadro nº 45 y Figura nº 37), observándose que durante los primeros minutos, el %IF es mayor para una muestra de zumo de naranja (100%) que para una muestra de leche (100%) igual que ocurre durante el ensayo TEAC. Es entre ocho-diez minutos cuando se observa que el %IF para la leche supera al %IF del zumo. Estos resultados corroboran que los antioxidantes presentes en estas dos matrices, al ser de diversa naturaleza presentan cinéticas de inhibición distintas.

**Cuadro nº 45.** Porcentaje de fluorescencia relativa (IF%) en función del tiempo de reacción transcurrido para una muestra de zumo de naranja y una muestra de leche desnatada.

% leche desnatada	% zumo naranja	IF %		
		3 min	5 min	10 min
10	50	98.39	90.74	66.19
20	50	98.91	93.79	74.02
30	50	98.31	92.52	74.48
40	50	98.95	96.05	84.82
50	50	99.45	96.31	86.82
20	10	96.17	86.36	61.72
20	20	96.83	88.54	67.94
20	30	97.27	90.41	71.24
20	40	98.16	91.05	72.39
20	50	99.60	95.91	75.64
20	60	98.26	95.06	78.07
20	70	98.92	96.04	80.57
20	80	99.25	97.32	84.88
100	-	98.64	96.14	90.72
-	100	99.13	97.76	85.93

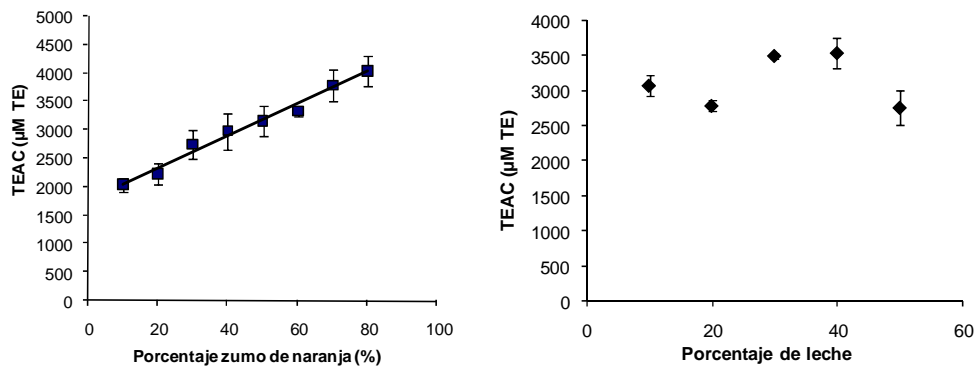
IF: intensidad de fluorescencia



**Figura nº 37.** Curva de decadencia de la fluoresceína (FL) en presencia de una muestra de zumo de naranja y una muestra de leche desnatada.

Para comprobar el efecto de cada una de las matrices (zumo de naranja y leche) en cada uno de los métodos de medida se lleva a cabo (1) un ensayo con concentraciones crecientes de leche manteniendo el porcentaje de zumo constante (50%) y (2) un ensayo con concentraciones crecientes de zumo de naranja en la mezcla manteniendo el porcentaje de leche constante (20%). La medida para el ensayo TEAC se extiende durante un periodo de 20 min con medidas cada 3 min.

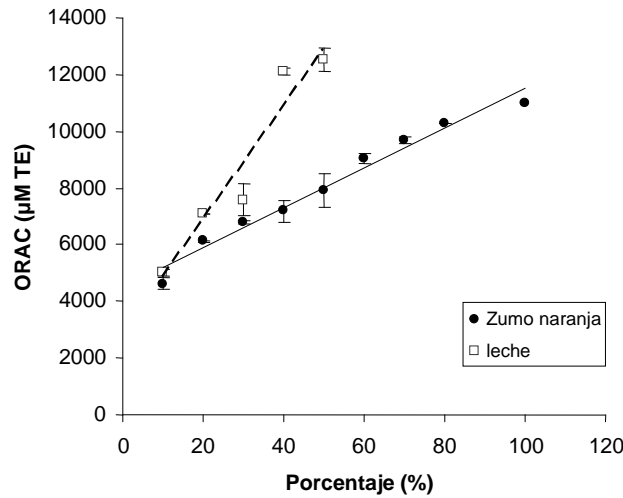
Tras el análisis se observa que para el ensayo TEAC, el aumento de la concentración de zumo se corresponde con un aumento en la capacidad antioxidante de modo que, los datos experimentales ajustan a una recta ( $y=28.343x + 1764.9$ ,  $r^2=0.984$ ) sin embargo, aumentos del porcentaje de leche en la bebida no se reflejan en incrementos de la capacidad antioxidante (Figura nº 38). Los mismos resultados son observados por Chen *et al.* (2003) cuando determinan la capacidad antioxidante de la leche mediante ensayo TEAC de modo que concentraciones crecientes de leche no se corresponden con una mayor capacidad antioxidante.



**Figura nº 38.** Variación de la capacidad antioxidante (TEAC, µM TE) en función del porcentaje de zumo de naranja (A) o leche (B) en la bebida.

Al realizar esta misma prueba mediante el ensayo ORAC se observa que tanto concentraciones crecientes de zumo como de leche (Figura nº 39) se

corresponden con una mayor capacidad antioxidante ajustándose significativamente ambos a una recta ( $r^2= 0.973$  y  $r^2= 0.921$ , respectivamente).



**Figura nº 39.** Variación de la capacidad antioxidante  $ORAC_{FL}$  ( $\mu M$  TE) en función del porcentaje de zumo de naranja o leche en la bebida.

Estos resultados pueden deberse a que el zumo de naranja es principalmente rico en ácido ascórbico que como indican los resultados obtenidos en el apartado anterior reacciona rápidamente con el radical ABTS viéndose su acción favorecida con este método ya que es una reacción de tipo redox. Pellegrini *et al.* (2007) encuentran para zumo de naranja que los antioxidantes hidrosolubles son los principales contribuyentes a la capacidad antioxidante total. Sin embargo, la contribución de los antioxidantes hidrosolubles (ácido úrico, vitamina C, etc.) en leche, especialmente desnatada, es muy modesta, residiendo su capacidad antioxidante principal en la fracción liposoluble así como en su fracción proteica que posee un potente efecto antioxidante gracias a su composición en aminoácidos como tirosina, triptófano, histidina, lisina y metionina según han demostrado diversos autores (Cervato *et al.* 1999; Rival *et al.* 2001b). Hernández-Ledesma *et al.* (2005) encuentran que los grupos fenólicos e indólicos del triptófano y la tirosina en la leche actúan

como dadores de hidrógeno siendo los responsables de la capacidad antioxidante mostrada por estos aminoácidos, es por ello que al ser el método ORAC una reacción basada en la transferencia de átomos de H, estos grupos presentes en la leche pueden verse mejor analizados mediante este ensayo.

#### **6.3.4. Correlación entre los métodos ORAC y TEAC.**

Cuando se comparan los resultados de capacidad antioxidante obtenidos mediante el método TEAC con los obtenidos mediante el método ORAC se encuentran buenas correlaciones entre ambos métodos cuando cambian las concentraciones de zumo de naranja ( $r= 0.955$ ,  $p<0.05$ ) ya que para ambos métodos la capacidad antioxidante se incrementa con el incremento del porcentaje de zumo. Sin embargo, no se encuentran correlaciones estadísticamente significativas entre ambos métodos para cambios en la concentración de leche ya que muestra capacidades distintas en cada método de medida.

Diversos autores han obtenido correlaciones entre los resultados encontrados tras analizar la capacidad antioxidante por el método TEAC y ORAC. Sin embargo, esto parece ser cierto para alimentos donde los principales antioxidantes son de tipo hidrosoluble para los cuales se ha observado que mediante ambos métodos se ve reflejada su capacidad antioxidante. Proteggente *et al.* (2002) encuentran una buena correlación entre los métodos ORAC, FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) y TEAC entre diferentes frutas y vegetales. Taipong *et al.* (2006) obtienen resultados comparables de capacidad antioxidante para zumos de guayaba mediante los métodos TEAC, DPPH, FRAP y ORAC y Stintzing *et al.* (2005) hallan correlaciones significativas ( $r=0.974$ ) para zumo de “cactus pear” entre los métodos ORAC y TEAC. Sin embargo, Silva *et al.* (2007) cuando comparan los métodos ORAC y TEAC para medir la capacidad antioxidante de 15 plantas de Brasil, encuentran que existe una moderada correlación entre los resultados hallados mediante ambos métodos ( $r= 0.551$ ,  $p<0.01$ ) concluyendo que el



método ORAC debe considerarse mejor ya que mide la actividad antioxidante de otros compuestos además de los fenólicos lo que no se observa con el método TEAC. Por otro lado, Pérez *et al.* (2000) cuando comparan los métodos ORAC, TEAC y TRAP en muestras de vino tinto y vino blanco no encuentran correlaciones entre estos tres métodos. Cao *et al.* (1998) cuando comparan los métodos ORAC, FRAP y TEAC en muestras de suero sanguíneo encuentran una ligera correlación entre ORAC y FRAP no encontrando correlaciones entre ORAC y TEAC. Estos autores, apuntan que el método ORAC posee una mayor especificidad y es capaz de responder ante un mayor número de compuestos antioxidantes que los otros dos métodos ensayados.

#### 6.4. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio hacen preveer que cuando una muestra es compleja o posee antioxidantes de muy diversa naturaleza la correlación entre métodos ORAC y TEAC es baja debido a las diferentes cinéticas y mecanismos de reacción de los distintos antioxidantes presentes y que, el método TEAC subestima la capacidad antioxidante de la leche.

Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación científica:

**Zulueta, A.**, Esteve, M.J., Frígola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chemistry, 2009, 114, 310-316.



## **CAPÍTULO 7. Almacenamiento de las bebidas de zumo y leche tratadas por PEAI y pasterización. Vida útil del producto.**

### **7.1 INTRODUCCION**

Los pulsos eléctricos de alta intensidad son un tratamiento alternativo a los tradicionales por calor y equivalen a los tratamientos por pasterización suave, es por ello que la comercialización posterior del producto debe realizarse bajo condiciones de refrigeración (0-4°C) para preservar la salubridad del alimento, evitando posibles alteraciones como consecuencia del crecimiento de microorganismos.

Con objeto de comparar la vida útil de las bebidas a base de zumo de naranja y leche tratadas mediante pasterización (90°C, 20 s) o PEAI se prepara la bebida de zumo de naranja y leche y se divide en tres alícuotas: control (sin tratamiento de conservación), tratamiento por pasterización (90°C, 20 s) y tratamiento por PEAI (25 kV/cm, 280 µs). El tratamiento por PEAI elegido se establece en base a los resultados obtenidos en el Capítulo 3, junto con aquellos obtenidos para la destrucción de microorganismos (*L. plantarum* y *E.Coli*) en esta bebida (Sampedro *et al.* 2006; Rivas *et al.* 2006b) por el grupo de investigación del Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA, CSIC).

Tras los diversos tratamientos aplicados, las muestras son almacenadas a 4±2°C y 10±2°C, temperaturas que representan las condiciones normales de refrigeración (4±2°C) y las temperaturas que se alcanzan (10±2°C) en caso de una rotura en la cadena del frío durante la comercialización del producto. El estudio se realiza durante 6 semanas consecutivas (42 días), observando que, a las seis semanas de almacenamiento las bebidas almacenadas a 10°C presentan alteraciones en su composición debido al crecimiento de microorganismos por lo que se descarta la realización de los análisis.

## **7.2. MATERIAL Y METODOS.**

### **7.2.1. Muestras.**

Para preparar la bebida de zumo de naranja y leche se utilizan naranjas de la variedad Navel adquiridas en un comercio local en el mes de octubre. La formulación de la bebida es la descrita en el capítulo 2 apartado 2.2.1.1.

### **7.2.2. Tratamiento por PEAI.**

Las condiciones elegidas para el tratamiento por PEAI son: campo eléctrico= 25 kV/cm; tiempo de tratamiento= 280  $\mu$ s; amplitud de pulso= 2  $\mu$ s y, temperatura del baño= 35°C. Estas condiciones son elegidas en función de los resultados obtenidos en el apartado anterior y aquellos de enzimas y microorganismos obtenidos en paralelo por el grupo de investigación del IATA (CSIC).

### **7.2.3. Tratamiento por calor.**

Se sigue el procedimiento descrito en el Capítulo 3, apartado 3.2.3.

### **7.2.4. Condiciones de almacenamiento.**

Las bebidas frescas (control) y las tratadas por PEAI (25 kV/cm, 280  $\mu$ s) y pasterización (90°C, 20 s) se almacenan en envases estériles en una cámara de flujo laminar en perfectas condiciones higiénicas. Los envases debidamente cerrados se almacenan en dos cámaras a  $4\pm 2^\circ\text{C}$  y  $10\pm 2^\circ\text{C}$ , en oscuridad y con control de la humedad relativa. Las bebidas son analizadas inmediatamente tras el tratamiento (tiempo cero) y después de 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días de almacenamiento.

### **7.2.5. Parámetros nutricionales**

7.2.5.1. Ácido ascórbico. *Ver capítulo 1, apartado 1.2.3.1.*

7.2.5.2. Carotenoides y vitamina A. *Ver capítulo 1, apartado 1.2.3.2.*

7.2.5.3. Fenoles solubles totales. *Ver capítulo 1, apartado 1.2.3.3.*

**7.2.6. Capacidad antioxidante total**

7.2.6.1. Método TEAC. (*Ver capítulo 3, apartado 3.2.4.4*).

7.2.6.2. Método ORAC. (*Ver capítulo 6, apartado 6.2.2*).

**7.2.7. Parámetros físico-químicos.**

7.2.7.1. pH. (*Ver capítulo 1, apartado 1.2.2.1*)

7.2.7.2. °Brix. (*Ver capítulo 1, apartado 1.2.2.2*)

7.2.7.3. Color. (*Ver capítulo 1, apartado 1.2.2.4*).

7.2.7.4. Hidroximetilfurfural. (*Ver capítulo 4, apartado 4.3.2.3.3*).

7.2.7.5. Densidad. (*Ver capítulo 1, apartado 1.2.2.3*)

7.2.7.6. Índice de turbidez.

La turbidez de los zumos y bebidas a base de estos, depende principalmente de los sólidos en suspensión en el zumo y su deterioro es indicativo de la pérdida de calidad. La pulpa en suspensión suele estar formada principalmente por tejido desintegrado, que contiene fibra celulósica y pectinas y partículas lipoides. Estos componentes, le confieren viscosidad y cuerpo al alimento.

**Instrumentación y material**

- Centrífuga Jouan Mod. GT 422.
- Espectrofotómetro UV/Vis. Perkin-Elmer Lambda 2.
- Material de uso corriente en el laboratorio

**Modo operatorio**

En un tubo de ensayo, se colocan 3 mL de muestra y se centrifuga a 1500 rpm, 10 min a 20°C. Se toman 1.5 mL del sobrenadante y se colocan en la cubeta de medida para proceder a su determinación espectrofotométrica a  $\lambda = 660$  nm.

### **7.2.8. Análisis estadístico.**

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DE (desviación estandar). Con objeto de detectar posibles diferencias entre el tratamiento aplicado (pasterización o PEAI), la temperatura de almacenamiento (4 y 10°C) y el tiempo de almacenamiento (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas), se aplica un ANOVA de tres factores a los valores de retención ( $C/C_0$ ) de los distintos micronutrientes analizados durante el periodo de almacenamiento. En aquellos parámetros con más de dos niveles (tiempo de almacenamiento) para los que se encuentran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se realiza un análisis de la varianza aplicando el test de Tukey a fin de identificar entre qué niveles se encuentran dichas diferencias. Por otro lado, se establecen correlaciones bivariadas entre los diferentes parámetros analizados utilizando el test de Pearson. El análisis estadístico se realiza mediante el paquete SPSS 15.0<sup>®</sup> (SPSS Inc., Chicago, USA).

## **7.3. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **7.3.1. Ácido ascórbico.**

Las concentraciones de ácido ascórbico (mg/100 mL) durante el periodo de almacenamiento para las bebidas de zumo de naranja y leche tratadas por PEAI (25 kV/cm, 280  $\mu$ s) y pasterización (90°C, 20 s), se muestran en el Cuadro nº 46. A tiempo inicial, se encuentran diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las concentraciones de vitamina C para las bebidas pasterizadas (25.2 $\pm$ 0.5 mg/100 mL) respecto a las bebidas sin tratar (29.2 $\pm$ 0.1 mg/100 mL), y las tratadas por PEAI (28.5 $\pm$ 1.0 mg/100 mL). Tras el tratamiento térmico, las bebidas pasterizadas presentan una reducción del 13.7% en las concentraciones de ácido ascórbico mientras la disminución es del 2.4% para las bebidas tratadas por PEAI, manteniéndose el contenido prácticamente constante.

**Cuadro nº 46.** Concentraciones de ácido ascórbico (mg/100 mL) durante el almacenamiento a 4 y 10°C en las bebidas de zumo y leche tratadas por pasteurización y PEAI.

Tiempo (días)	Temperatura almacenamiento			
	4 °C		10 °C	
	PEAI	Pasterizado	PEAI	Pasterizado
0	28.5±1.0 <sup>aA</sup>	25.2±0.5 <sup>aB</sup>	28.5±1.0 <sup>aA</sup>	25.2±0.5 <sup>aB</sup>
7	26.4±0.3 <sup>abA</sup>	24.4±0.1 <sup>abB</sup>	25.6±0.3 <sup>bcC</sup>	22.8±0.3 <sup>abbB</sup>
14	25.0±0.4 <sup>bA</sup>	22.4±0.2 <sup>bbB</sup>	21.9±1.5 <sup>caB</sup>	21.6±1.3 <sup>baB</sup>
21	21.3±0.5 <sup>caA</sup>	20.7±0.7 <sup>bcA</sup>	20.8±0.2 <sup>cdAC</sup>	16.1±1.2 <sup>cbC</sup>
28	19.9±0.1 <sup>caA</sup>	19.0±0.9 <sup>caA</sup>	18.3±0.2 <sup>deA</sup>	14.6±0.6 <sup>cbB</sup>
35	18.9±1.1 <sup>caA</sup>	17.5±0.1 <sup>daA</sup>	16.9±0.9 <sup>eaA</sup>	13.1±0.4 <sup>cbB</sup>
42	15.0±0.3 <sup>daA</sup>	13.8±0.3 <sup>eaA</sup>	*	*

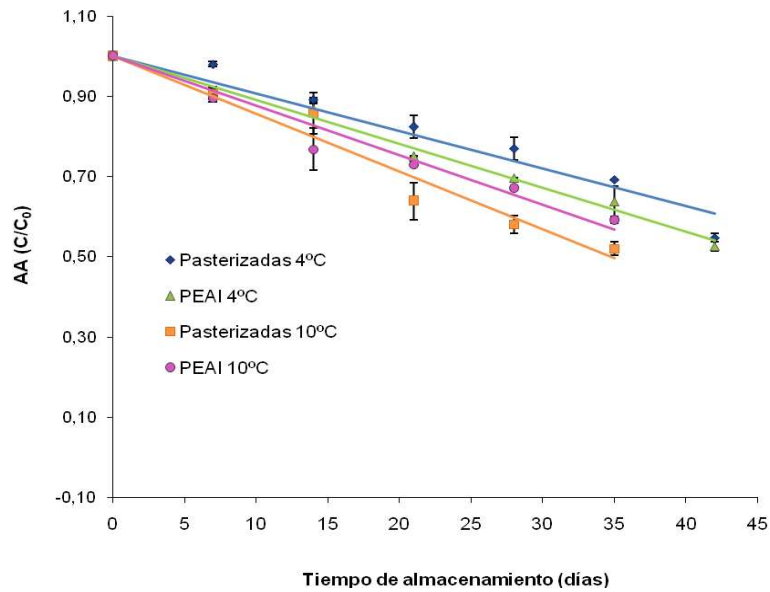
\*a-e distintas letras minúsculas para los valores de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

\*A-C distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento aplicado.

\* bebidas estropeadas.

Las variaciones en las concentraciones de ácido ascórbico ( $C/C_0$ ) durante el periodo de almacenamiento se ajustan a diferentes modelos cinéticos: orden cero (concentración frente a tiempo), primer orden ( $\ln$  de la concentración frente a tiempo) y segundo orden (concentración<sup>-1</sup> frente al tiempo). Tras aplicar los diferentes modelos, se observa que los datos ajustan mejor a una cinética de degradación de orden cero ( $C=C_0-kt$ ) (Figura nº 40) con coeficientes de regresión entre 0.958 y 0.974 (Cuadro nº 47). Aunque, algunos autores encuentran que la cinética de degradación del ácido ascórbico en zumos de fruta y vegetales durante el almacenamiento sigue una cinética de primer orden (Lee y Coates, 1999; Rodrigo *et al.* 2003; Polydera *et al.* 2005a; Burdulu *et al.* 2006; Torregrosa *et al.* 2006), Ozkan *et al.* (2004) observan para zumos de naranja, uva y granada almacenados a 20, 30 y 40°C que la degradación del ácido ascórbico, ajusta mejor a una cinética de orden cero,

mostrándose de acuerdo con los resultados obtenidos. Otros autores han encontrado, incluso, ajustes a cinéticas de segundo orden en zumos de fruta (Robertson y Samaniego, 1986) y fórmulas infantiles (Singh *et al.* 1976).



**Figura nº 40.** Degradación del ácido ascórbico en las bebidas almacenadas a 4°C y 10°C tratadas por PEA y pasterización.

**Cuadro nº 47.** Constantes de degradación ( $k_T$ ) y coeficientes de correlación ( $R^2$ ) del ácido ascórbico durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C para las bebidas pasterizadas y tratadas por pulsos.

	Ácido ascórbico (mg/100 mL)	$k_T$ (días <sup>-1</sup> )	$R^2$
<b>4°C</b>	t=0		
Pasterizadas	25.17±0.46	-0.0095	0.959
PEA	28.47±1.02	-0.0106	0.974
<b>10°C</b>	t=0		
Pasterizadas	25.17±0.46	-0.0144	0.958
PEA	28.47±1.02	-0.0126	0.963

t: tiempo



Con objeto de conocer la influencia del tratamiento de conservación aplicado (pasterización o PEAI), la temperatura (4 o 10°C) y el tiempo (1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) de almacenamiento sobre la cinética de degradación del ácido ascórbico ( $C/C_0$ ), se aplica un ANOVA de tres factores (Anexo I.a).

Efecto de la temperatura.

El ANOVA aplicado para evaluar el efecto de la temperatura sobre las concentraciones de ácido ascórbico ( $C/C_0$ ) indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambas temperaturas (4 y 10°C), correspondiendo las mayores reducciones a la temperatura más elevada (10°C). La vitamina C es termolábil de modo que el calor incrementa su velocidad de degradación (Gahler *et al.* 2003). Estos resultados coinciden con los obtenidos por diversos autores que, encuentran que a mayor temperatura de almacenamiento, las velocidades de degradación del ácido ascórbico se incrementan (Yeom *et al.* 2000; Polydera *et al.* 2004; Torregrosa *et al.* 2006, Cortés *et al.* 2008a).

Así mismo, existen interacciones entre la temperatura de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado, es decir, que el efecto de la temperatura sobre las concentraciones de vitamina C difiere entre las bebidas pasterizadas o tratadas por PEAI (Figura nº 41a) encontrándose las mayores reducciones en la muestra pasterizada almacenada a 10°C.

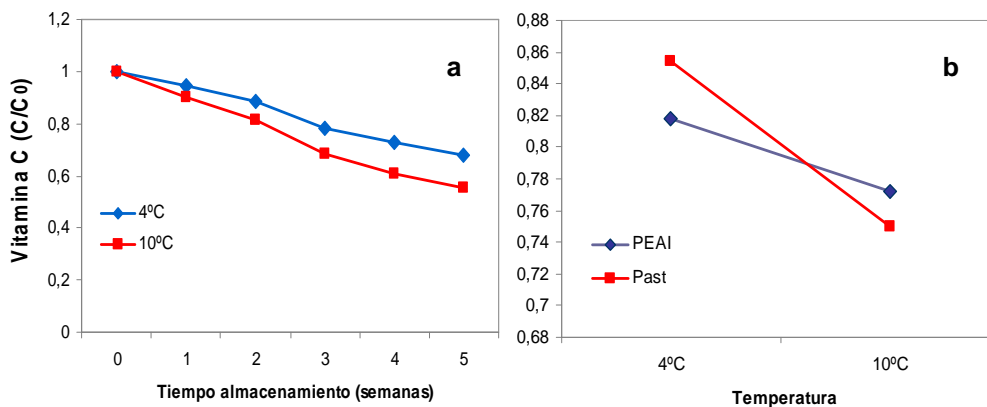
Efecto del tiempo de almacenamiento.

Durante el almacenamiento las concentraciones de ácido ascórbico disminuyen, siendo el tiempo de almacenamiento un factor significativo que incide sobre las concentraciones de vitamina C en la bebida.

El ANOVA realizado indica que no existen interacciones entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado de modo que la velocidad de degradación es similar para las bebidas pasterizadas y las tratadas por PEAI. Sin embargo, existe interacción entre el tiempo y temperatura de almacenamiento de modo que la degradación que se observa durante el

periodo de almacenamiento, es más rápida para temperaturas de almacenamiento más elevadas (10°C) (Figura nº 41b).

Respecto a los tratamientos de conservación, Plaza *et al.* (2006) observan para zumo de naranja tratado por PEAI (35 kV/cm, 750 µs) y pasterización (70°C, 30 s) que, el zumo pasterizado presenta mayores concentraciones de ácido ascórbico durante el almacenamiento a 4°C. Sin embargo, para temperaturas de pasterización similares a las del presente trabajo (90°C, 20 s), Torregrosa *et al.* (2006) y Cortés *et al.* (2008a) obtienen que la degradación del ácido ascórbico es menor en las muestras tratadas por PEAI frente a las pasterizadas.



**Figura nº 41.** Vitamina C. Interacciones tiempo de almacenamiento-temperatura (a) y temperatura -tratamiento de conservación (b).

Teniendo en cuenta el efecto significativo del tiempo y la temperatura de almacenamiento en la degradación del ácido ascórbico (C/C<sub>0</sub>), se aplica un análisis de regresión lineal para cuantificar el efecto de dichos factores. El modelo obtenido,  $C/C_0 = 1.103 - 0.014t - 0.010T$ , explicaría el 87% de los casos siendo "t"= tiempo de almacenamiento (días) y "T"= temperatura de almacenamiento (°C).

La vida útil de las bebidas pasteurizadas y tratadas por pulsos almacenadas a 4 y 10°C, se calcula como el tiempo necesario para que las concentraciones de ácido ascórbico se reduzcan a la mitad del valor inicial, utilizando las constantes de degradación obtenidas en el modelo cinético. La vida útil de las bebidas de zumo de naranja y leche (Cuadro nº 48) es mayor cuando éstas se almacenan a 4°C, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de conservación.

**Cuadro nº 48.** Vida útil (días) de las bebidas de zumo de naranja y leche almacenadas a 4 y 10°C tratadas por PEAI y pasteurización.

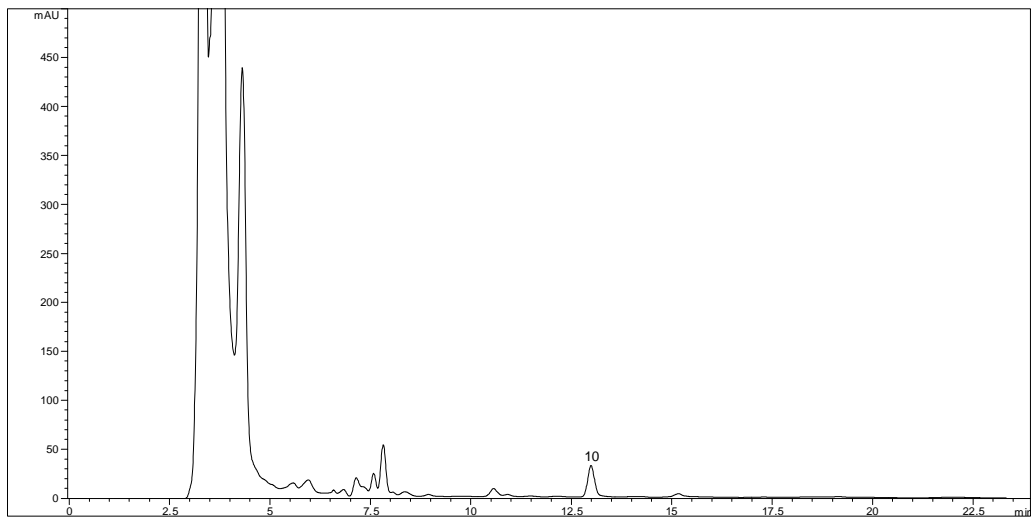
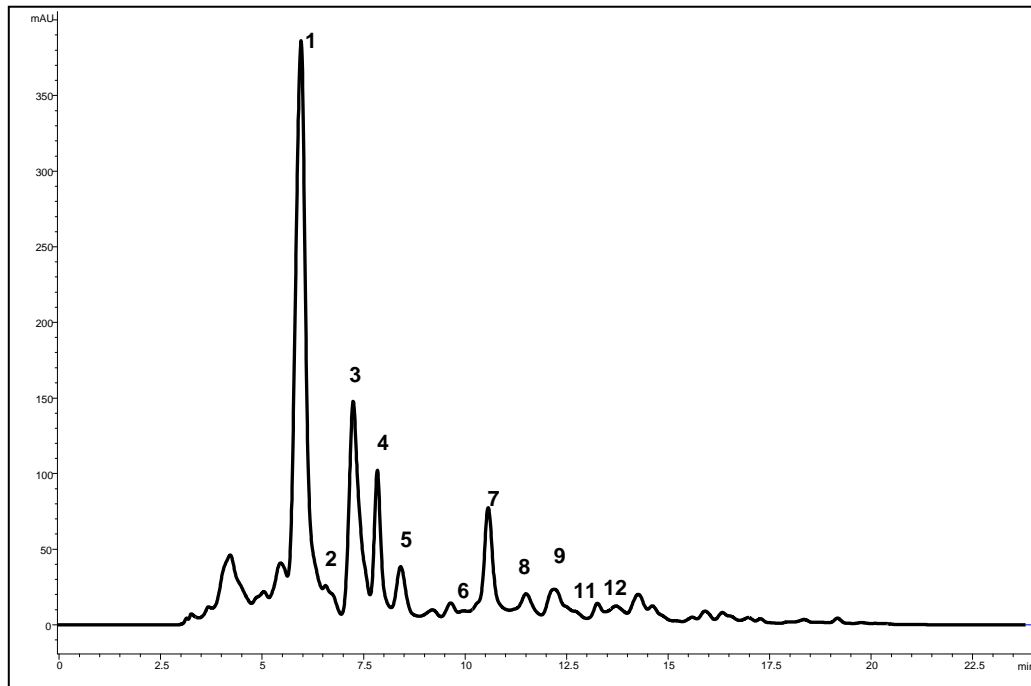
T (°C)	Vida útil (días)	
	PEAI	Pasteurización
4°C	47	52
10°C	39	34

La comparación de los resultados obtenidos con otros autores resulta imposible por la falta de trabajos similares para bebidas de zumo y leche. Sin embargo, existen trabajos similares en zumos de fruta y/o vegetales. Así, Torregrosa *et al.* (2006) para zumo de naranja-zanahoria, encuentran una vida útil de 62 y 19 días para los zumos tratados por PEAI (25 kV/cm, 280 µs) almacenados a 2 y 10°C, frente a 11 y 5 días para los zumos pasteurizados (90°C, 20 s) almacenados a 2 y 10°C, respectivamente. Del mismo modo, Cortés *et al.* (2008a) obtienen para zumo de naranja una vida útil de 277 días y 90 días para los zumos tratados por PEAI y pasteurización almacenados a 2°C, mientras la vida útil se reduce a 199 y 30 días para las muestras tratadas por PEAI y pasteurización, respectivamente, almacenadas a 10°C. Yeom *et al.* (2000) cuando estudian el efecto de los PEAI (35 kV/cm, 59 µs) y el calor (94.6°C, 30 s) sobre las concentraciones de ácido ascórbico en zumo de naranja almacenado a 4°C y 22°C obtienen que los zumos tratados por PEAI retienen más ácido ascórbico que los tratados térmicamente durante el almacenamiento

a 4°C siendo la vida útil de 47 y 31 días respectivamente mientras que, cuando las muestras son almacenadas a 22°C, las diferencias no son significativas entre los tratamientos obteniendo una vida útil de 13 y 12 días, respectivamente. Choi *et al.* (2002) encuentran para zumo de naranja pasteurizado (90°C, 90 s), almacenado a 4.5 °C que la vida útil de estas muestras es de 3 semanas y que, a las 5 semanas de almacenamiento la degradación de la vitamina C es completa.

### **7.3.2. Perfil de carotenoides y vitamina A.**

Las concentraciones medias de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y vitamina A (RAE) a tiempo inicial en las bebidas sin tratar, pasteurizadas (90°C, 20 s) o tratadas por pulsos (25 kV/cm, 280  $\mu\text{s}$ ) se muestran en el Cuadro nº 49. El perfil de las bebidas sin tratar se muestra en la Figura nº 42 mientras los carotenoides detectados con sus tiempos de retención se indican en el Cuadro nº 49.



**Figura nº 42.** Cromatograma a  $\lambda=450$  nm (arriba) y  $\lambda= 290$  nm (abajo) de la bebida de zumo de naranja y leche fresca.

El total de carotenoides presentes en la bebida sin tratar es de 355.61±18.02 µg/100 mL. Tras el tratamiento por PEAI, las concentraciones de carotenoides no sufren cambios significativos, reduciéndose un 2.2%. Sin embargo, tras el tratamiento por pasterización, el total de carotenoides muestra una reducción del 13% aunque dicha reducción no es significativa ( $P>0.05$ ).

La concentración de vitamina A, no sufre cambios tras el tratamiento por PEAI, mientras que la pasterización produce una reducción no significativa del 12.9% lo que, como se indica en el capítulo 3, se debe a la estabilidad térmica de los carotenoides con actividad provitamina A según señalan diversos autores (Lee y Coates, 2003; Bull *et al.* 2004; Torregrosa *et al.* 2005).

**Cuadro nº 49.** Concentración de carotenoides (µg/100 g) a tiempo inicial en las bebidas sin tratar, tratadas por PEAI y pasterizadas.

Pico	Carotenoides	t <sub>retención</sub>	λ (nm)	Control	PEAI	Pasterizado
1	9-Z-violaxantina	5.960	430	155.31±17.11	137.75±1.32	125.35±10.28
2	Z-anteraxantina	6.563	430	9.29±0.87 <sup>a</sup>	5.79±0.14 <sup>b</sup>	7.79±0.98 <sup>ab</sup>
3	Anteraxantina	7.242	430	47.373±5.87	42.56±0.05	39.53±2.92
4	Luteina	7.836	450	23.03±3.14	21.05±0.01	19.14±1.62
5	Zeaxantina	8.409	450	16.24±2.26	14.34±1.32	12.91±1.23
6	α-cryptoxantina	10.292	450	4.79±0.53	5.09±0.77	4.34±0.20
7	β-cryptoxantina	10.565	450	32.72±3.37	30.50±0.95	27.88±0.46
8	9-Z-α-caroteno	11.499	430	6.79±0.52	7.81±0.40	5.56±0.40
9	α-caroteno	12.254	450	8.06±1.54	9.72±0.07	7.27±0.15
10	Fitoeno	12.992	290	4.93±0.47	5.19±0.37	4.09±0.07
11	ζ-caroteno	13.097	430	3.10±0.23 <sup>a</sup>	1.79±0.11 <sup>b</sup>	1.71±0.07 <sup>b</sup>
12	all-E-β-caroteno	13.259	450	2.85±0.65	3.02±0.83	2.67±0.32
13	9-Z-β-caroteno	13.726	450	3.62±0.27	4.14±0.58	3.59±0.35
Carotenoides tot.				355.61±18.02	347.88±11.06	309.49±28.39
Vitamina A (RAE)				1.94±0.13	1.93±0.14	1.69±0.10

<sup>a-b</sup> letras distintas indican que existen diferencias significativas ( $p<0.05$ ) según el tratamiento de conservación aplicado.

En los Cuadros nº 50 al nº 55 se muestran las variaciones en el perfil de carotenoides en las bebidas de zumo y leche tratadas por PEAI y pasterización durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C. Las muestras almacenadas a 10°C no se analizan después de 35 días porque presentan alteraciones.

**Cuadro nº 50.** Variación en las concentraciones de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en las bebidas de zumo y leche sin tratar durante el almacenamiento a 4°C.

Carotenoide	Tiempo (días)						
	0	7	14	21	28	35	42
Z-antheraxantina	9.29 <sup>a</sup> (9.40)	7.18 <sup>b</sup> (8.06)	5.50 (3.47)	4.93 (1.65)	- -	- -	* *
Luteina	23.03 <sup>a</sup> (3.65)	17.72 <sup>a</sup> (0.40)	19.03 <sup>ab</sup> (7.04)	18.35 <sup>b</sup> (2.75)	15.07 <sup>b</sup> (1.74)	13.28 <sup>c</sup> (2.79)	
Zeaxantina	16.24 <sup>ab</sup> (11.1)	14.13 <sup>a</sup> (4.78)	17.01 <sup>a</sup> (0.16)	13.00 <sup>ab</sup> (0.21)	12.97 <sup>a</sup> (5.07)	11.93 <sup>b</sup> (3.88)	* *
$\alpha$ -cryptoxantina	4.79 <sup>a</sup> (10.3)	7.07 <sup>b</sup> (11.7)	- -	- -	- -	- -	
$\beta$ -cryptoxantina	32.72 <sup>a</sup> (7.63)	29.86 <sup>ab</sup> (9.45)	27.98 <sup>a</sup> (3.30)	27.38 <sup>ab</sup> (4.44)	25.09 <sup>b</sup> (8.74)	25.75 <sup>b</sup> (3.71)	* *
9-Z- $\alpha$ -caroteno	6.79 <sup>a</sup> (9.10)	8.21 <sup>a</sup> (5.25)	6.82 <sup>b</sup> (5.87)	6.17 <sup>c</sup> (10.2)	8.54 (6.21)	- -	
Fitoeno	4.94 <sup>ad</sup> (9.53)	4.52 <sup>a</sup> (9.15)	4.79 <sup>b</sup> (3.10)	6.57 <sup>c</sup> (10.6)	4.76 <sup>bd</sup> (5.20)	3.74 <sup>a</sup> (10.2)	* *
$\zeta$ -caroteno	3.10 <sup>ab</sup> (10.1)	2.04 <sup>a</sup> (4.52)	2.22 <sup>bc</sup> (7.01)	1.62 <sup>ce</sup> (4.36)	2.15 <sup>d</sup> (5.49)	1.87 <sup>e</sup> (5.71)	
all-E- $\beta$ -caroteno	2.86 <sup>ab</sup> (2.96)	2.95 <sup>a</sup> (3.90)	4.11 <sup>bc</sup> (3.92)	2.74 <sup>c</sup> (5.81)	3.08 <sup>c</sup> (8.51)	4.06 <sup>a</sup> (0.74)	* *
9-Z- $\beta$ -caroteno	3.62 <sup>a</sup> (7.42)	4.64 <sup>a</sup> (13.8)	2.90 <sup>b</sup> (10.7)	4.72 <sup>a</sup> (6.29)	6.81 <sup>c</sup> (1.35)	5.51 <sup>a</sup> (5.44)	* *

<sup>a-e</sup> diferente superíndice indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento.

- No detectado.

\* Bebidas estropeadas.

() entre paréntesis se indica en coeficiente de variación (%)

**Cuadro nº 51.** Variación en las concentraciones de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en las bebidas de zumo y leche sin tratar durante el almacenamiento a  $10^{\circ}\text{C}$ .

Carotenoides	Tiempo de almacenamiento (días)					
	0	7	14	21	28	35
Z-antheraxantina	9.29 <sup>a</sup> (9.40)	6.14 <sup>b</sup> (13.1)	5.22 <sup>a</sup> (0.20)	-	*	*
Luteína	23.03 <sup>a</sup> (3.65)	19.92 <sup>ab</sup> (5.75)	16.49 <sup>b</sup> (2.61)	15.44 <sup>b</sup> (1.54)	*	*
Zeaxantina	16.24 <sup>ab</sup> (11.1)	14.34 <sup>ab</sup> (4.47)	14.00 <sup>a</sup> (2.98)	12.99 <sup>ab</sup> (0.51)	*	*
$\alpha$ -cryptoxantina	4.79 <sup>a</sup> (10.3)	6.71 <sup>b</sup> (4.47)	-	-	*	*
$\beta$ -cryptoxantina	32.72 <sup>a</sup> (7.63)	27.33 <sup>a</sup> (4.27)	26.24 <sup>ab</sup> (7.40)	22.10 <sup>ab</sup> (2.80)	*	*
9-Z- $\alpha$ -caroteno	6.79 <sup>a</sup> (9.10)	7.88 <sup>ab</sup> (5.62)	5.16 <sup>bc</sup> (13.9)	-	*	*
Fitoeno	4.94 <sup>ad</sup> (9.53)	4.29 <sup>ac</sup> (5.56)	3.30 <sup>ac</sup> (6.22)	3.62 <sup>b</sup> (0.68)	*	*
$\zeta$ -caroteno	3.10 <sup>ab</sup> (10.1)	2.02 <sup>ab</sup> (6.69)	1.54 <sup>bc</sup> (7.79)	4.80 <sup>ab</sup> (3.15)	*	*
all-E- $\beta$ -caroteno	2.86 <sup>ab</sup> (2.96)	2.82 <sup>a</sup> (4.73)	3.24 <sup>a</sup> (3.56)	3.10 <sup>a</sup> (5.80)	*	*
9-Z- $\beta$ -caroteno	3.62 <sup>a</sup> (7.42)	5.64 <sup>a</sup> (0.73)	4.43 <sup>a</sup> (4.82)	5.10 <sup>b</sup> (8.43)	*	*

<sup>a-d</sup> diferente superíndice indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento.

- No detectado.

\* Bebidas estropeadas.

() entre paréntesis se indica en coeficiente de variación (%)



**Cuadro nº 52.** Variación en la concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en las bebidas de zumo y leche tratadas por PEAI durante el almacenamiento a  $4^\circ\text{C}$ .

Carotenoides	Tiempo de almacenamiento (días)						
	0	7	14	21	28	35	42
Z-antheraxantina	5.79 <sup>a</sup> (2.49)	7.35 <sup>b</sup> (3.04)	5.76 <sup>a</sup> (10.19)	4.98 <sup>c</sup> (9.55)	4.97 <sup>c</sup> (8.02)	3.92 <sup>d</sup> (7.12)	1.93 <sup>e</sup> (4.33)
Luteína	21.05 <sup>a</sup> (0.05)	19.34 <sup>ab</sup> (5.16)	17.61 <sup>b</sup> (1.11)	17.79 <sup>b</sup> (7.23)	15.27 <sup>c</sup> (10.20)	13.99 <sup>c</sup> (9.75)	13.94 <sup>c</sup> (8.12)
Zeaxantina	14.34 <sup>a</sup> (9.17)	13.60 <sup>ab</sup> (5.48)	14.12 <sup>a</sup> (5.16)	12.58 <sup>ab</sup> (8.68)	11.64 <sup>b</sup> (8.92)	12.90 <sup>ab</sup> (4.28)	13.38 <sup>ab</sup> (9.30)
$\alpha$ -cryptoxantina	5.09 <sup>a</sup> (15.15)	7.30 <sup>b</sup> (7.80)	-	-	-	-	-
$\beta$ -cryptoxantina	30.50 <sup>a</sup> (3.11)	29.48 <sup>a</sup> (7.36)	28.97 <sup>ab</sup> (14.47)	27.89 <sup>ab</sup> (5.38)	28.82 <sup>ab</sup> (10.22)	27.18 <sup>ab</sup> (7.01)	25.84 <sup>b</sup> (3.28)
9-Z- $\alpha$ -caroteno	7.31 <sup>a</sup> (8.96)	7.41 <sup>ab</sup> (1.07)	6.05 <sup>bc</sup> (8.76)	6.63 <sup>ab</sup> (10.94)	8.20 <sup>a</sup> (2.19)	7.94 <sup>a</sup> (4.15)	4.95 <sup>c</sup> (6.72)
Fitoeno	5.69 <sup>a</sup> (8.48)	4.34 <sup>ac</sup> (3.27)	4.73 <sup>ac</sup> (3.51)	8.85 <sup>b</sup> (9.15)	4.98 <sup>a</sup> (4.72)	4.40 <sup>ac</sup> (3.94)	3.67 <sup>c</sup> (7.52)
$\zeta$ -caroteno	1.79 <sup>a</sup> (5.92)	1.97 <sup>ab</sup> (10.22)	2.13 <sup>bc</sup> (5.34)	1.98 <sup>ab</sup> (9.40)	2.36 <sup>cd</sup> (4.35)	2.57 <sup>d</sup> (7.44)	2.60 <sup>d</sup> (3.54)
all-E- $\beta$ -caroteno	3.02 <sup>a</sup> (2.74)	3.30 <sup>a</sup> (10.36)	3.71 <sup>a</sup> (8.34)	3.65 <sup>a</sup> (1.30)	3.85 <sup>a</sup> (3.47)	3.66 <sup>a</sup> (7.29)	3.76 <sup>a</sup> (7.52)
9-Z- $\beta$ -caroteno	4.23 <sup>a</sup> (3.09)	3.79 <sup>a</sup> (4.82)	3.76 <sup>a</sup> (12.57)	2.07 <sup>b</sup> (8.43)	6.52 <sup>c</sup> (2.28)	7.27 <sup>c</sup> (3.31)	6.53 <sup>c</sup> (2.49)

<sup>a-e</sup> diferente superíndice indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento.

- No detectado

() entre paréntesis se indica en coeficiente de variación (%)

**Cuadro nº 53.** Variación en la concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en las bebidas de zumo y leche tratadas por PEAI durante el almacenamiento a  $10^\circ\text{C}$ .

Carotenoides	Tiempo de almacenamiento (días)					
	0	7	14	21	28	35
Z-antheraxantina	5.79 <sup>a</sup> (2.49)	6.22 <sup>a</sup> (5.74)	-	-	-	-
Luteína	21.05 <sup>a</sup> (0.05)	20.72 <sup>a</sup> (3.54)	19.14 <sup>a</sup> (8.77)	19.06 <sup>a</sup> (12.05)	17.94 <sup>a</sup> (9.44)	14.45 <sup>b</sup> (2.63)
Zeaxantina	14.34 <sup>ab</sup> (9.17)	15.30 <sup>a</sup> (3.89)	14.77 <sup>a</sup> (8.86)	16.14 <sup>a</sup> (4.54)	15.00 <sup>a</sup> (6.81)	14.45 <sup>a</sup> (8.14)
$\alpha$ -cryptoxantina	5.09 <sup>a</sup> (5.15)	7.98 <sup>b</sup> (7.87)	-	-	-	-
$\beta$ -cryptoxantina	30.50 <sup>a</sup> (3.11)	26.42 <sup>ab</sup> (2.61)	26.79 <sup>b</sup> (2.89)	27.31 <sup>ab</sup> (9.30)	26.58 <sup>a</sup> (5.57)	26.18 <sup>ab</sup> (1.83)
9-Z- $\alpha$ -caroteno	7.81 <sup>a</sup> (0.67)	7.12 <sup>a</sup> (1.66)	-	-	-	-
Fitoeno	5.69 <sup>a</sup> (8.48)	4.85 <sup>a</sup> (5.68)	5.01 <sup>a</sup> (2.91)	8.88 <sup>b</sup> (3.34)	4.79 <sup>a</sup> (7.30)	4.71 <sup>a</sup> (2.58)
$\zeta$ -caroteno	1.79 <sup>a</sup> (5.92)	1.98 <sup>a</sup> (2.14)	2.21 <sup>a</sup> (0.96)	2.95 <sup>b</sup> (1.68)	3.04 <sup>b</sup> (2.97)	1.03 <sup>c</sup> (1.58)
all-E- $\beta$ -caroteno	3.02 <sup>ac</sup> (2.74)	3.57 <sup>ab</sup> (2.59)	4.10 <sup>b</sup> (3.71)	3.89 <sup>ab</sup> (6.57)	3.93 <sup>bc</sup> (7.56)	4.04 <sup>b</sup> (6.56)
9-Z- $\beta$ -caroteno	4.23 <sup>ab</sup> (3.09)	5.30 <sup>ac</sup> (0.92)	3.86 <sup>ab</sup> (5.93)	4.10 <sup>ab</sup> (5.43)	4.36 <sup>ab</sup> (13.95)	3.12 <sup>b</sup> (2.72)

<sup>a-c</sup> diferente superíndice indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento.

- No detectado

() entre paréntesis se indica en coeficiente de variación (%)

**Cuadro nº 54.** Variación en la concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en la bebida de zumo y leche tratada por pasterización durante el almacenamiento a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Carotenoides	Tiempo (días)						
	0	7	14	21	28	35	42
Z-antheraxantina	7.79 <sup>a</sup> (12.63)	6.35 <sup>b</sup> (5.84)	5.64 <sup>b</sup> (0.16)	4.33 <sup>c</sup> (3.71)	5.62 <sup>b</sup> (0.46)	3.05 <sup>cd</sup> (1.46)	2.55 <sup>d</sup> (2.77)
Luteína	19.14 <sup>a</sup> (8.47)	17.34 <sup>b</sup> (1.42)	17.89 <sup>ab</sup> (1.27)	17.87 <sup>ab</sup> (4.80)	15.77 <sup>b</sup> (4.72)	11.76 <sup>c</sup> (8.01)	10.89 <sup>c</sup> (7.53)
Zeaxantina	12.91 <sup>a</sup> (9.52)	13.40 <sup>a</sup> (1.78)	13.79 <sup>a</sup> (0.47)	13.25 <sup>a</sup> (1.05)	13.00 <sup>ab</sup> (11.68)	12.36 <sup>ab</sup> (7.31)	10.39 <sup>b</sup> (6.13)
$\alpha$ -cryptoxantina	4.34 (4.53)	-	-	-	-	-	-
$\beta$ -cryptoxantina	26.96 <sup>a</sup> (2.41)	26.19 <sup>a</sup> (0.42)	26.98 <sup>a</sup> (1.03)	24.18 <sup>b</sup> (1.38)	22.35 <sup>c</sup> (3.33)	22.59 <sup>c</sup> (3.59)	20.62 <sup>d</sup> (5.40)
9-Z- $\alpha$ -caroteno	5.56 <sup>a</sup> (7.25)	8.31 <sup>b</sup> (7.92)	5.52 <sup>a</sup> (0.46)	7.48 <sup>b</sup> (5.22)	8.35 <sup>b</sup> (10.70)	7.90 <sup>b</sup> (6.23)	5.40 <sup>a</sup> (10.71)
Fitoeno	4.09 <sup>a</sup> (9.02)	3.91 <sup>a</sup> (0.91)	5.24 <sup>b</sup> (0.50)	7.93 <sup>c</sup> (10.98)	4.49 <sup>ab</sup> (8.94)	3.99 <sup>a</sup> (5.15)	3.57 <sup>a</sup> (1.19)
$\zeta$ -caroteno	1.71 <sup>a</sup> (4.01)	1.93 <sup>ab</sup> (0.88)	2.96 <sup>b</sup> (1.31)	2.23 <sup>ab</sup> (6.86)	2.58 <sup>ab</sup> (7.61)	2.52 <sup>ab</sup> (10.45)	2.73 <sup>ab</sup> (7.25)
all-E- $\beta$ -caroteno	2.67 <sup>a</sup> (12.01)	3.21 <sup>ac</sup> (4.89)	3.90 <sup>b</sup> (0.02)	4.14 <sup>b</sup> (1.02)	3.95 <sup>b</sup> (11.23)	3.73 <sup>bc</sup> (0.04)	3.19 <sup>a</sup> (3.97)
9-Z- $\beta$ -caroteno	3.59 <sup>a</sup> (9.85)	3.18 <sup>ab</sup> (0.58)	2.24 <sup>b</sup> (0.16)	3.54 <sup>ab</sup> (5.95)	6.29 <sup>c</sup> (8.99)	6.13 <sup>c</sup> (12.33)	5.97 <sup>c</sup> (3.79)

<sup>a-d</sup> diferente superíndice indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento

- No detectado

() entre paréntesis se indica en coeficiente de variación (%)

**Cuadro nº 55.** Variación en la concentración de carotenoides ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) en la bebida de zumo y leche tratada por pasterización durante el almacenamiento a  $10^\circ\text{C}$ .

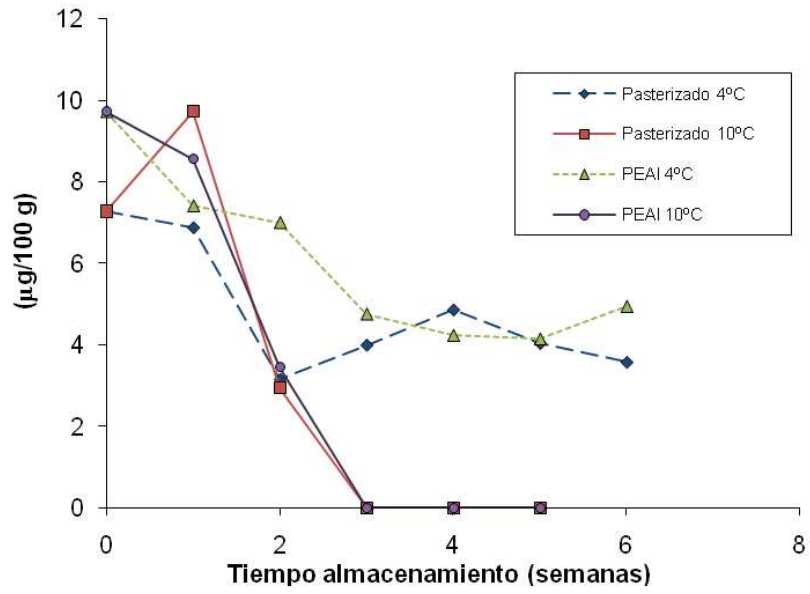
Carotenoide	Tiempo de almacenamiento (días)					
	0	7	14	21	28	35
Z-antheraxantina	7.79 <sup>a</sup> (12.63)	5.35 <sup>b</sup> (9.52)	- -	- -	- -	- -
Luteína	19.14 <sup>a</sup> (8.47)	18.93 <sup>a</sup> (3.13)	17.34 <sup>ab</sup> (2.97)	15.97 <sup>b</sup> (6.42)	15.95 <sup>b</sup> (0.65)	11.16 <sup>c</sup> (1.13)
Zeaxantina	12.91 <sup>ab</sup> (9.52)	13.99 <sup>a</sup> (3.24)	13.35 <sup>a</sup> (2.04)	12.48 <sup>ab</sup> (6.63)	13.37 <sup>a</sup> (0.91)	11.09 <sup>b</sup> (5.76)
$\alpha$ -cryptoxantina	4.34 <sup>a</sup> (4.53)	7.13 <sup>b</sup> (2.08)	- -	- -	- -	- -
$\beta$ -cryptoxantina	26.96 <sup>a</sup> (2.41)	24.69 <sup>ab</sup> (1.94)	25.96 <sup>a</sup> (1.12)	23.71 <sup>ab</sup> (6.37)	22.51 <sup>b</sup> (3.27)	21.87 <sup>b</sup> (3.06)
9-Z- $\alpha$ -caroteno	5.56 <sup>a</sup> (7.25)	5.39 <sup>a</sup> (6.47)	4.43 <sup>b</sup> (12.10)	6.41 <sup>c</sup> (3.94)	- -	- -
Fitoeno	4.09 <sup>ad</sup> (9.02)	3.87 <sup>a</sup> (4.24)	4.64 <sup>b</sup> (1.00)	7.86 <sup>c</sup> (1.02)	4.40 <sup>bd</sup> (4.10)	3.74 <sup>a</sup> (0.47)
$\zeta$ -caroteno	1.71 <sup>ab</sup> (4.01)	1.60 <sup>a</sup> (9.06)	1.89 <sup>bc</sup> (7.43)	2.06 <sup>ce</sup> (5.55)	2.44 <sup>d</sup> (0.98)	2.19 <sup>e</sup> (7.07)
all-E- $\beta$ -caroteno	2.67 <sup>ab</sup> (12.01)	2.49 <sup>a</sup> (24.05)	3.61 <sup>bc</sup> (12.40)	4.05 <sup>c</sup> (1.57)	3.96 <sup>c</sup> (1.11)	3.08 <sup>a</sup> (6.89)
9-Z- $\beta$ -caroteno	3.59 <sup>a</sup> (9.85)	3.70 <sup>a</sup> (8.45)	2.60 <sup>b</sup> (8.91)	3.55 <sup>a</sup> (9.12)	5.07 <sup>c</sup> (7.67)	3.99 <sup>a</sup> (8.46)

<sup>a-e</sup> diferente superíndice indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento.

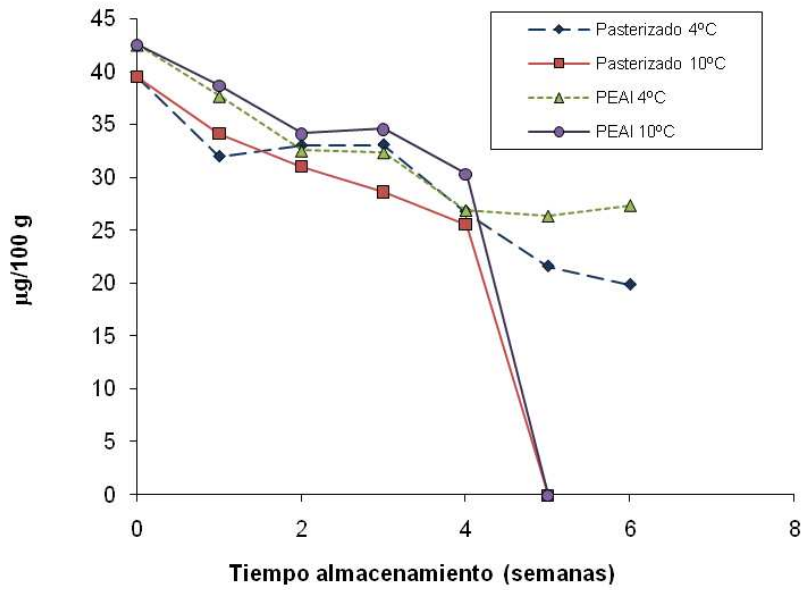
- No detectado

( ) Entre paréntesis se indica en coeficiente de variación (%)

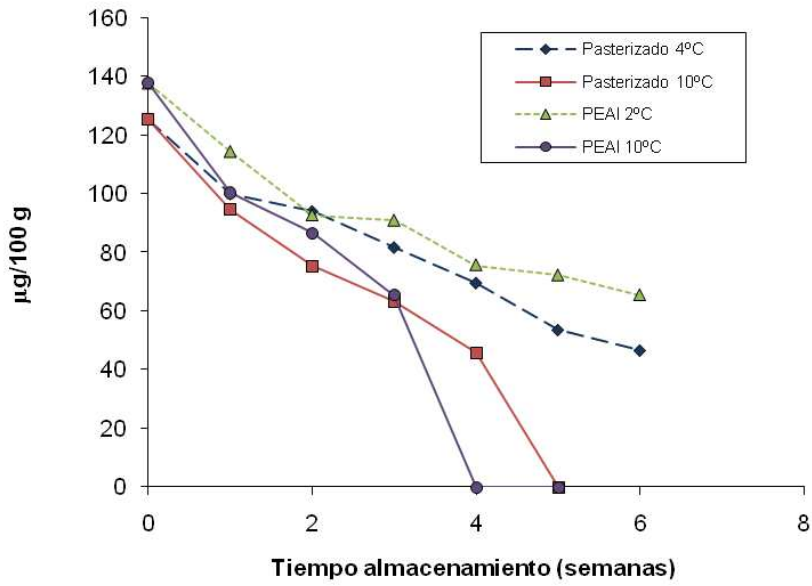
Las Figuras nº43-46 muestran las variaciones en las concentraciones de  $\alpha$ -caroteno, antheraxantina, mutatoxantina y 9-cis-violaxantina+zeinoxantina que se habían omitido en los Cuadros nº 50-55 por considerar que su representación gráfica ayuda más a la explicación de su comportamiento durante el almacenamiento en refrigeración.



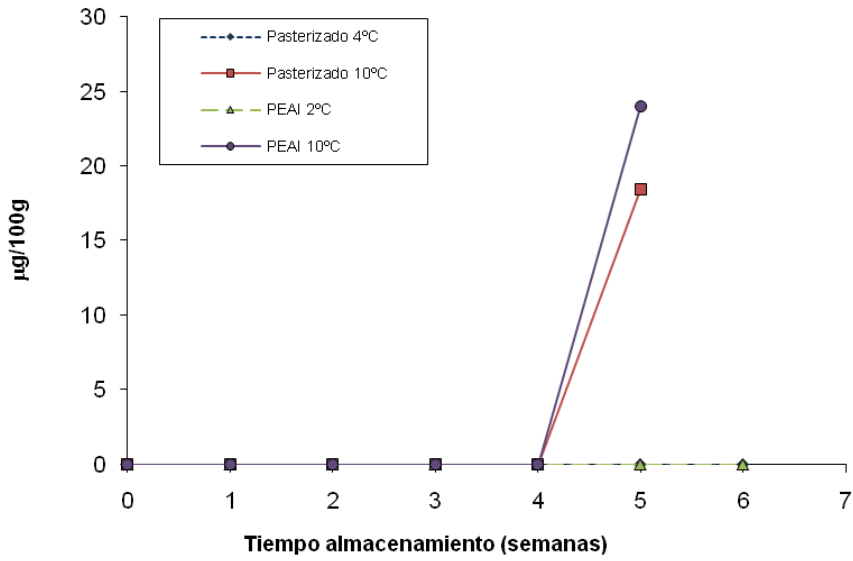
**Figura nº 43.** Degradación del α-caroteno durante el periodo de almacenamiento.



**Figura nº 44.** Degradación de la antheraxantina durante el periodo de almacenamiento.



**Figura nº 45.** Degradación de la 9-cis-violaxantina durante el periodo de almacenamiento.



**Figura nº 46.** Formación de la mutatoxantina durante el periodo de almacenamiento.

El Cuadro nº 56 muestra las concentraciones de carotenoides totales ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y vitamina A (RAE) en las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento.

**Cuadro nº 56.** Variación en las concentraciones de carotenoides totales ( $\mu\text{g}/100\text{ g}$ ) y vitamina A (RAE) en las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C.

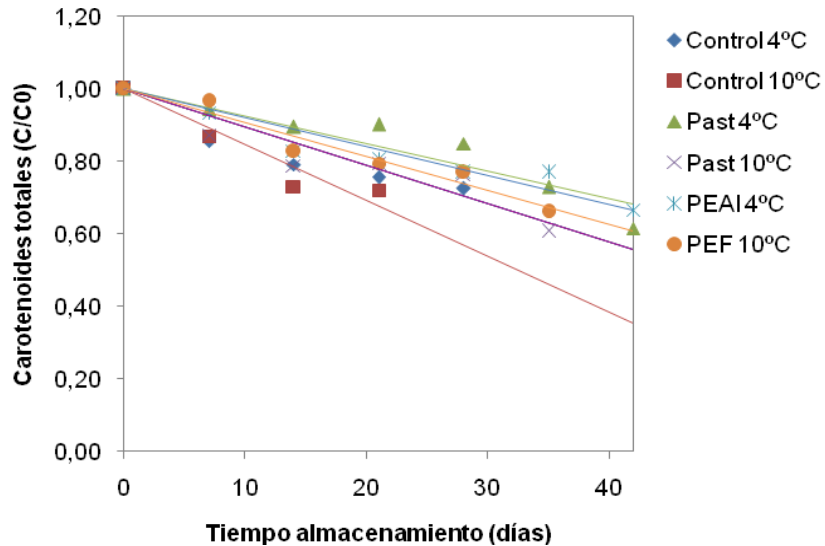
		Tiempo de almacenamiento (días)						
		0	7	14	21	28	35	42
<b>Carotenoides totales (<math>\mu\text{g}/100\text{ g}</math>)</b>								
4°C	Control	371.18 <sup>a</sup> (10.8)	317.54 <sup>b</sup> (8.96)	293.84 <sup>b</sup> (2.73)	280.62 <sup>b</sup> (1.67)	269.15 <sup>b</sup> (4.43)	246.39 <sup>b</sup> (9.52)	*
	Pasterizada	309.49 <sup>a</sup> (9.17)	292.33 <sup>ab</sup> (3.92)	277.15 <sup>ab</sup> (6.68)	279.11 <sup>ab</sup> (1.46)	263.22 <sup>b</sup> (9.09)	225.50 <sup>c</sup> (7.16)	190.47 <sup>c</sup> (0.74)
	PEAI	347.88 <sup>a</sup> (3.18)	324.96 <sup>a</sup> (1.09)	288.67 <sup>b</sup> (3.09)	281.41 <sup>b</sup> (9.11)	267.86 <sup>b</sup> (9.17)	267.62 <sup>b</sup> (7.58)	232.02 <sup>c</sup> (0.46)
10°C	Control	371.18 <sup>a</sup> (10.8)	323.64 <sup>b</sup> (13.3)	271.97 <sup>b</sup> (0.50)	267.61 <sup>b</sup> (12.6)	*	*	*
	Pasterizada	309.49 <sup>a</sup> (9.17)	270.03 <sup>ab</sup> (9.53)	243.54 <sup>ab</sup> (1.01)	245.97 <sup>ab</sup> (10.30)	236.55 <sup>abc</sup> (0.62)	188.11 <sup>bc</sup> (7.25)	*
	PEAI	347.88 <sup>a</sup> (3.18)	336.38 <sup>ab</sup> (0.20)	287.81 <sup>ab</sup> (1.35)	276.69 <sup>abc</sup> (12.79)	268.02 <sup>ab</sup> (3.53)	230.03 <sup>bc</sup> (5.81)	*
<b>Vitamina A (RAE)</b>								
4°C	Control	1.94 <sup>a</sup> (0.67)	1.85 <sup>a</sup> (2.68)	1.78 <sup>a</sup> (3.19)	1.66 <sup>a</sup> (3.61)	1.47 <sup>b</sup> (5.77)	1.48 <sup>b</sup> (9.52)	*
	Pasterizada	1.65 <sup>ac</sup> (0.43)	1.62 <sup>a</sup> (1.24)	1.58 <sup>ab</sup> (0.04)	1.52 <sup>b</sup> (5.48)	1.46 <sup>b</sup> (1.94)	1.42 <sup>b</sup> (8.49)	1.25 <sup>c</sup> (6.85)
	PEAI	1.93 <sup>a</sup> (7.33)	1.82 <sup>ab</sup> (1.93)	1.81 <sup>abc</sup> (12.50)	1.66 <sup>abc</sup> (2.97)	1.70 <sup>abc</sup> (7.07)	1.62 <sup>bc</sup> (9.66)	1.59 <sup>c</sup> (7.70)
10°C	Control	1.94 <sup>a</sup> (0.67)	1.87 <sup>a</sup> (7.56)	1.50 <sup>b</sup> (5.66)	1.22 <sup>c</sup> (9.98)	*	*	*
	Pasterizada	1.65 <sup>a</sup> (0.43)	1.59 <sup>a</sup> (0.88)	1.50 <sup>b</sup> (5.07)	1.33 <sup>b</sup> (8.64)	1.27 <sup>b</sup> (2.77)	1.17 <sup>b</sup> (3.63)	*
	PEAI	1.93 <sup>a</sup> (7.33)	1.80 <sup>a</sup> (7.18)	1.59 <sup>ab</sup> (3.75)	1.49 <sup>ab</sup> (2.38)	1.48 <sup>ab</sup> (1.21)	1.45 <sup>ab</sup> (3.06)	*

<sup>a-c</sup> diferente letra indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento

\* Bebidas estropeadas

() entre paréntesis se indica en coeficiente de variación (%)

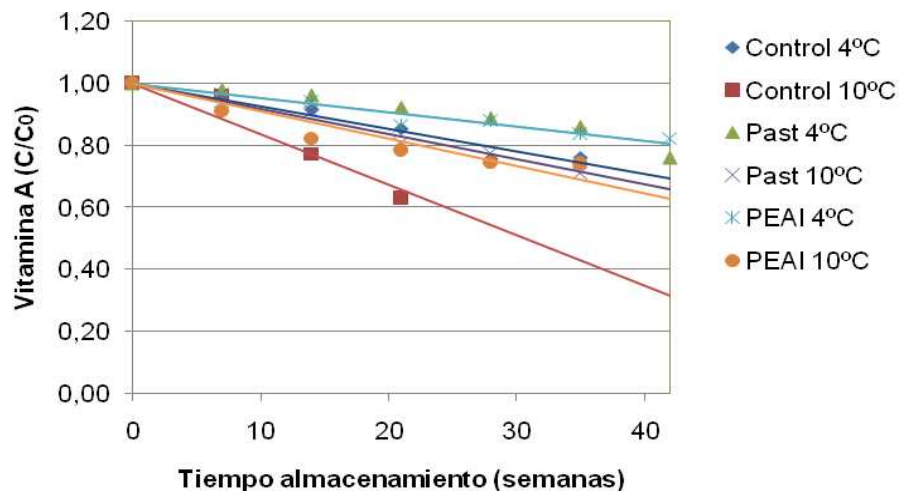
Cuando se estudia la cinética de degradación de los carotenoides totales presentes en la muestra se obtiene que se ajusta a una cinética de orden cero (Figura nº 47) no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre los zumos pasterizados o tratados por PEAI. La constante de degradación obtenida para los carotenoides totales, es de 18.02  $\mu\text{g}/100$  g-semana ( $R^2=0.896$ ,  $p=0.015$ ) y 17.25  $\mu\text{g}/100$  g-semana ( $R^2=0.931$ ,  $p=0.007$ ) para las bebidas pasterizadas y tratadas por PEAI respectivamente, almacenadas a 4°C y de 20.11  $\mu\text{g}/100$  g-semana ( $R^2= 0.896$ ,  $p=0.018$ ) y 23.01  $\mu\text{g}/100$  g-semana ( $R^2=0.950$ ,  $p=0.001$ ) para las bebidas pasterizadas y tratadas por PEAI respectivamente, almacenadas a 10°C. Las constantes de degradación obtenidas para las muestras control durante el almacenamiento a 4 y 10°C, son superiores a las de las bebidas tratadas por PEAI y calor, obteniéndose una pérdida de 22.35  $\mu\text{g}/100$  g-semana ( $R= 0.950$ ,  $P=0.001$ ) y 36.23  $\mu\text{g}/100$  g-semana ( $R=0.916$ ,  $P=0.011$ ) en las concentraciones de carotenoides totales a 4 y 10°C, respectivamente.



**Figura nº 47.** Cinética de degradación de carotenoides totales ( $C/C_0$ ) en las bebidas de zumo de naranja y leche durante el almacenamiento a 4 y 10°C.



Respecto a las concentraciones de vitamina A (Figura nº 48) las constantes de degradación obtenidas son de 0.060  $\mu\text{g}/100\text{g}\cdot\text{semana}$  ( $R^2=0.920$ ,  $P=0.001$ ) y 0.054  $\mu\text{g}/100\text{g}\cdot\text{semana}$  ( $R^2=0.909$ ,  $P=0.001$ ) para las bebidas pasterizadas y tratadas por PEAI almacenadas a 4°C y de 0.100  $\mu\text{g}/100\text{g}\cdot\text{semana}$  ( $R^2=0.980$ ,  $P=0.001$ ) y 0.101  $\mu\text{g}/100\text{g}\cdot\text{semana}$  ( $R^2=0.910$ ,  $P=0.001$ ) para las bebidas pasterizadas y tratadas por PEAI almacenadas a 10°C. Las constantes de degradación para la vitamina A son superiores en las bebidas sin tratar que en las tratadas por pasterización o PEAI obteniéndose pérdidas de 0.101  $\mu\text{g}/100\text{g}\cdot\text{semana}$  ( $R=0.956$ ,  $P=0.001$ ) y 0.253  $\mu\text{g}/100\text{g}\cdot\text{semana}$  ( $R=0.945$ ,  $P=0.002$ ) para las bebidas control almacenadas a 4 y 10°C respectivamente.



**Figura nº 48.** Cinética de degradación de la vitamina A en las bebidas de zumo y leche durante el almacenamiento a 4 y 10°C.

Para conocer la influencia del tratamiento de conservación aplicado (pasterización o PEAI), la temperatura (4 o 10°C) y el tiempo de almacenamiento (1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) sobre los valores de vitamina A se aplica un análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores (Anexo I.b.). El

mismo análisis estadístico se realiza sobre los valores de carotenoides totales (Anexo I.c)

Los resultados obtenidos a partir del ANOVA multifactorial indican que tanto el tratamiento de conservación aplicado como la temperatura y el tiempo de almacenamiento influyen sobre los valores de vitamina A y carotenoides totales de modo que disminuyen con el tiempo de almacenamiento y las concentraciones halladas en las bebidas son menores a temperaturas más altas.

Por otro lado, no se encuentran interacciones entre los parámetros estudiados (Anexo I.b y I.c) lo que indica que la evolución de la concentración de vitamina A y carotenoides totales es similar para ambas temperaturas y ambos tratamientos de conservación con el tiempo de almacenamiento.

Algunos carotenoides presentan degradaciones estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con el tiempo como 9-Z-violaxantina+zeinoxantina ( $r = -0.895$ ), Z-anteraxantina ( $r = -0.746$ ), anteraxantina ( $r = -0.884$ ), luteína ( $r = -0.839$ ), zeaxantina ( $r = -0.350$ ),  $\alpha$ -cryptoxantina ( $r = -0.753$ ),  $\beta$ -cryptoxantina ( $r = -0.572$ ) y  $\alpha$ -caroteno ( $r = -0.649$ ) mientras que también se observan incrementos para la mutatoxantina ( $r = 0.364$ ) y 9-Z- $\beta$ -caroteno ( $r = 0.522$ ). La disminución en la concentración de anteraxantina se corresponde con la aparición del carotenoide mutatoxantina ( $r = -0.388$ ,  $p < 0.05$ ) en las bebidas almacenadas a 10°C a partir de la cuarta semana de almacenamiento. Dicha conversión se explica por transformación de los carotenoides 5,6-epóxido a 5,8-epóxido a pH ácido (Giger, 2002). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Torregrosa *et al.* (2005) que observan para zumo de naranja-zanahoria la desaparición de la anteraxantina desde la tercera semana de almacenamiento a 10°C y Cortés *et al.* (2006) que observan para zumo de naranja que la anteraxantina deja de detectarse a las seis semanas de almacenamiento a 10°C.

Por otro lado, las concentraciones de  $\beta$ -caroteno y  $\zeta$ -caroteno permanecen invariables en las condiciones de almacenamiento ensayadas encontrándose incluso una correlación positiva significativa con el tiempo de

almacenamiento ( $r = 0.431$  y  $r = 0.640$ , respectivamente). Resultados similares son los obtenidos por Cortés *et al.* (2006) para zumo de naranja puesto que no observan cambios estadísticamente significativos en las concentraciones de  $\beta$ -caroteno durante el periodo de almacenamiento a 2 y 10°C.

### 7.3.3. Fenoles solubles totales.

El contenido en compuestos fenólicos (mg GAE/ 100 mL) durante el almacenamiento de la bebida tratada por PEAI y pasterización se muestra en el Cuadro nº 57. Como puede observarse, inicialmente no existen diferencias estadísticamente significativas según el tratamiento de conservación aplicado.

**Cuadro nº 57.** Variación de la concentración de compuestos fenólicos (mg GAE/100 mL) de las muestras pasterizadas y tratadas por PEAI almacenadas a 4 y 10°C.

Tiempo almacen. (días)	Temperatura almacenamiento			
	4 °C		10 °C	
	PEAI	Pasterizada	PEAI	Pasterizada
0	92.26±5.26 <sup>aA</sup>	85.7±0.20 <sup>aA</sup>	92.26±5.26 <sup>aA</sup>	85.7±0.20 <sup>aA</sup>
7	73.25±1.27 <sup>bA</sup>	74.95±5.5 <sup>aA</sup>	97.80±12.94 <sup>aA</sup>	96.05±0.42 <sup>abA</sup>
14	110.06±0.14 <sup>cA</sup>	117.46±2.97 <sup>bcB</sup>	131.91±0.78 <sup>bc</sup>	119.21±1.63 <sup>cb</sup>
21	111.52±0.28 <sup>cA</sup>	112.57±0.07 <sup>bA</sup>	129.67±1.77 <sup>bB</sup>	113.52±0.71 <sup>bcA</sup>
28	95.40±7.07 <sup>aA</sup>	104.45±2.33 <sup>bB</sup>	102.30±5.66 <sup>aA</sup>	116.80±1.98 <sup>bcC</sup>
35	114.69±0.21 <sup>cA</sup>	137.29±1.48 <sup>cb</sup>	124.54±4.95 <sup>bB</sup>	131.19±2.62 <sup>bcB</sup>
42	118.17±0.67 <sup>cA</sup>	127.12±1.73 <sup>bcA</sup>	*	*

<sup>a-e</sup> distintas letras minúsculas para los valores de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

<sup>A-C</sup> distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento aplicado.

\* bebidas estropeadas.

Con objeto de conocer la influencia del tratamiento de conservación aplicado (PEAI o pasterización), la temperatura (4 o 10°C) y el tiempo de

almacenamiento (1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) sobre el contenido en compuestos fenólicos (mg GAE/100 mL) se aplica un ANOVA de tres factores (Anexo I.d).

*Efecto de la temperatura de almacenamiento.*

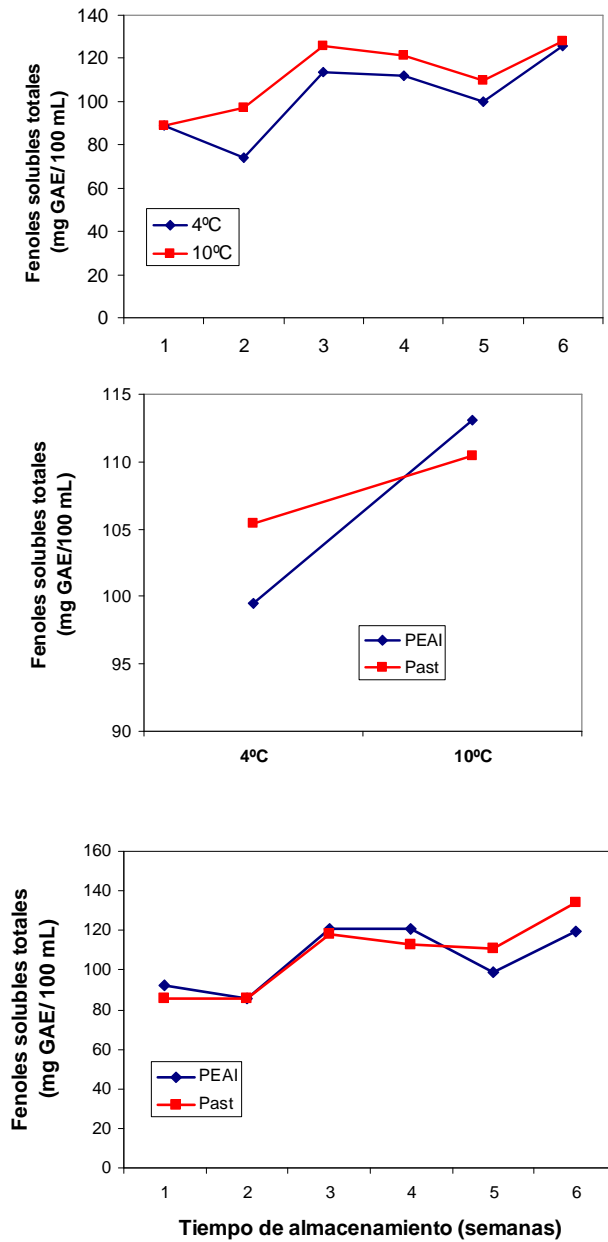
El análisis ANOVA aplicado indica que la temperatura es un parámetro que influye significativamente sobre el contenido de compuestos fenólicos de modo que el mayor contenido se encuentra para las muestras almacenadas a 10°C.

Así mismo, existen interacciones entre la temperatura de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado de modo que el contenido de compuestos fenólicos es mayor para las bebidas pasteurizadas almacenadas a 4 y 10°C (Figura nº 49a). Existe también interacción entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento de modo que el incremento en el contenido de compuestos fenólicos durante el almacenamiento es mayor para las muestras almacenadas a 10°C que a 4°C (Figura nº 49b).

*Efecto del tiempo de almacenamiento.*

El tiempo de almacenamiento también es un factor significativo de modo que el contenido en compuestos fenólicos se incrementa durante el mismo hallándose cantidades mayores al final del almacenamiento.

El ANOVA aplicado indica que existen interacciones entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado de modo que el contenido en compuestos fenólicos es superior para las bebidas pasteurizadas durante el tiempo de almacenamiento respecto a las bebidas tratadas por PEAI (Figura nº 49c).



**Figura nº 49.** Compuestos fenólicos. Interacciones temperatura-tiempo de almacenamiento (a), temperatura-tratamiento de conservación (b) y tiempo de almacenamiento-tratamiento de conservación (c).

De nuevo, los resultados obtenidos resultan difíciles de comparar por la falta de estudios en este tipo de bebidas. Sin embargo, Sánchez-Moreno *et al.* (2003b) encuentran para zumo de naranja almacenado a 4°C durante 10 días que no existen cambios significativos para el contenido en flavanonas (naringina y hesperidina) durante el tiempo de almacenamiento. Odriozola-Serrano *et al.* (2008) encuentran para zumo de tomate almacenado a 4°C que las concentraciones de compuestos fenólicos se mantienen sin variaciones significativas durante el periodo de almacenamiento (56 días) y son mayores para las muestras tratadas por PEAI (35 kV/cm, 1500  $\mu$ s) que por pasteurización (90°C, 30-60 s). Sin embargo, Del Caro *et al.* (2004) encuentran para zumo de naranja almacenado a 4°C durante 15 días, una reducción en el contenido total de compuestos fenólicos. Por otro lado, Klimczak *et al.* (2007) observan para zumo de naranja almacenado durante 6 meses a 18, 28 y 38°C que el contenido total en compuestos fenólicos se reduce progresivamente hasta los 4 meses de almacenamiento (7%, 11%, 20% para 18°C, 28°C y 38°C, respectivamente) experimentando un posterior incremento a los 6 meses atribuyendo este hecho a la posible formación de nuevos compuestos que son capaces de reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu incrementando así los valores finales y, destacan que las flavanonas presentan una elevada estabilidad durante el almacenamiento sin prácticamente variaciones.

#### **7.3.4. Capacidad antioxidante total (TEAC y ORAC)**

Los Cuadros nº 58-59 muestran los valores de capacidad antioxidante obtenidos para las bebidas de zumo de naranja y leche pasteurizadas y tratadas por pulsos (25 kV/cm, 280  $\mu$ s) durante el almacenamiento a 4 y 10°C obtenidos por el método TEAC (Re *et al.* 1999) y ORAC<sub>FL</sub> (Ou *et al.* 2001) respectivamente.

**Cuadro nº 58.** Variación de la capacidad antioxidante (TEAC) de las bebidas pasterizadas y tratadas por PEAI almacenadas a 4 y 10°C.

Tiempo almacenamiento (días)	TEAC (µmol TE/L)			
	4 °C		10 °C	
	PEAI	Pasterización	PEAI	Pasterización
0	5.08±0.32 <sup>aA</sup>	4.01±0.09 <sup>aA</sup>	5.08±0.32 <sup>aA</sup>	4.01±0.09 <sup>aB</sup>
7	3.20±0.07 <sup>bA</sup>	3.06±0.04 <sup>bAB</sup>	3.18±0.02 <sup>bA</sup>	2.91±0.07 <sup>bB</sup>
14	2.80±0.04 <sup>bA</sup>	2.46±0.11 <sup>cB</sup>	1.81±0.19 <sup>cC</sup>	2.40±0.28 <sup>bB</sup>
21	2.14±0.11 <sup>cA</sup>	1.78±0.03 <sup>dA</sup>	1.99±0.09 <sup>cA</sup>	1.38±0.03 <sup>cB</sup>
28	2.00±0.16 <sup>cA</sup>	1.99±0.08 <sup>dA</sup>	1.96±0.01 <sup>cAB</sup>	1.63±0.12 <sup>cC</sup>
35	2.03±0.06 <sup>cA</sup>	1.75±0.14 <sup>dA</sup>	3.17±0.15 <sup>bB</sup>	2.53±0.26 <sup>bB</sup>
42	1.78±0.02 <sup>cA</sup>	1.69±0.05 <sup>dA</sup>	*	*

<sup>a-d</sup> distintas letras minúsculas para los valores de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

<sup>A-C</sup> distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento aplicado.

\* bebidas estropeadas.

**Cuadro nº 59.** Variación de la capacidad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>) de las muestras pasterizadas y tratadas por PEAI almacenadas a 4 y 10°C.

Tiempo almacenamiento (días)	ORAC ± SD (mmol TE/L)			
	4 °C		10 °C	
	PEAI	Pasterización	PEAI	Pasterización
0	7.08±0.47 <sup>aA</sup>	6.90±0.38 <sup>aA</sup>	7.08±0.47 <sup>aA</sup>	6.90±0.38 <sup>aA</sup>
7	6.97±0.03 <sup>aA</sup>	7.23±0.44 <sup>aA</sup>	8.06±0.08 <sup>abB</sup>	6.85±0.45 <sup>aA</sup>
14	8.04±0.83 <sup>aA</sup>	7.25±0.05 <sup>aA</sup>	8.83±0.66 <sup>bA</sup>	7.36±1.11 <sup>abA</sup>
21	8.43±0.52 <sup>aA</sup>	8.80±0.14 <sup>abA</sup>	9.36±0.33 <sup>bAB</sup>	9.66±0.22 <sup>abcB</sup>
28	7.64±0.05 <sup>aA</sup>	6.99±0.76 <sup>aA</sup>	10.29±0.07 <sup>cB</sup>	11.88±0.84 <sup>cC</sup>
35	8.35±0.11 <sup>aA</sup>	8.94±1.33 <sup>abA</sup>	10.66±0.23 <sup>dB</sup>	10.34±0.35 <sup>bcB</sup>
42	8.44±0.38 <sup>aA</sup>	10.52±1.74 <sup>bA</sup>	*	*

<sup>a-d</sup> distintas letras minúsculas para los valores de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

<sup>A-C</sup> distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento aplicado.

\* bebidas estropeadas.

A tiempo inicial se encuentra que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para los valores de TEAC entre la bebida sin tratar ( $5.43 \pm 0.10$  mmol TE/L) y la bebida pasteurizada ( $4.01 \pm 0.09$  mmol TE/L) de modo que el tratamiento por pasteurización produce una reducción del 26% de la capacidad antioxidante total mientras, no se encuentran reducciones significativas en la bebida tratada por PEAI ( $5.08 \pm 0.32$  mmol TE/L) resultados que se muestran de acuerdo con los observados en el capítulo 3 donde se obtuvo un porcentaje similar de reducción tras el tratamiento por pasteurización. Sin embargo, mediante el ensayo ORAC, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los valores de capacidad antioxidante entre las bebidas sin tratar ( $8.83 \pm 0.91$  mmol TE/L), las bebidas pasteurizadas ( $6.90 \pm 0.38$  mmol TE/L), o las bebidas tratadas por PEAI ( $7.08 \pm 0.47$  mmol TE/L). Estos resultados coinciden con los aportados por Wegrzyn *et al.* (2008) para valores de ORAC en muestras de leche tratadas a  $120^\circ\text{C}$  durante 5 min donde observan que la capacidad antioxidante respecto a la leche fresca no varía tras la aplicación del tratamiento térmico.

Con objeto de conocer la influencia del tratamiento de conservación aplicado (pasteurización o PEAI), la temperatura (4 y  $10^\circ\text{C}$ ) y el tiempo (0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) de almacenamiento se aplica un ANOVA de tres factores para los valores de TEAC (Anexo I.e) y ORAC (Anexo I.f).

#### Efectos de la temperatura sobre los valores de TEAC

Los resultados del análisis ANOVA indican que la temperatura no es un factor influyente sobre la capacidad antioxidante (TEAC) de las bebidas encontrándose valores similares para las bebidas pasteurizadas o tratadas por PEAI a 4 y  $10^\circ\text{C}$ .

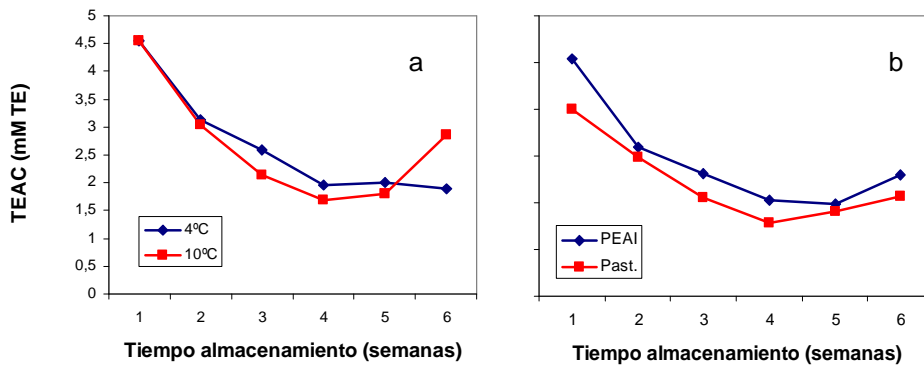
Sin embargo, existe interacción entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento ya que, la pérdida de capacidad antioxidante con el tiempo de almacenamiento ocurre de manera más rápida en las bebidas almacenadas a  $10^\circ\text{C}$  respecto a las de  $4^\circ\text{C}$  (Figura nº 50a).



### Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los valores de TEAC

El tiempo de almacenamiento es un factor influyente sobre la capacidad antioxidante de las muestras de manera que, a medida que éste transcurre la capacidad antioxidante (TEAC) disminuye. Para las bebidas almacenadas a 10°C se observa un pequeño incremento en la última semana de almacenamiento (35 días) posiblemente debido a la formación de nuevos compuestos con capacidad antioxidante como pueden ser las melanoidinas procedentes de las reacciones de Maillard ya que, según han demostrado diversos autores (Morales, 2005; Rufián-Heranes *et al.* 2007) éstas son capaces de secuestrar a los radicales libres.

A parte de la interacción comentada entre tiempo y temperatura de almacenamiento, existe una interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado (Figura nº 50b).



**Figura nº 50.** Capacidad antioxidante (TEAC). Interacciones tiempo-temperatura (a) y tiempo-tratamiento de conservación aplicado (b).

Al realizar correlaciones entre el contenido de compuestos bioactivos presentes en la bebida (vitamina C, compuestos fenólicos y carotenoides) durante el periodo de almacenamiento y los valores de TEAC se encuentra una correlación significativa con las concentraciones de vitamina C ( $r=0.767$ ,  $p<0.001$ ) de modo que la reducción de los valores de capacidad antioxidante

estaría principalmente determinada por la disminución en la concentración de ácido ascórbico, resultados que se muestran de acuerdo con los obtenidos en este trabajo tanto para las muestras comerciales (Capítulo 1) como tras los diferentes tratamientos por PEAI (Capítulo 3) donde se observa que la vitamina C es el mayor contribuyente a los valores de TEAC. De acuerdo a estos resultados, Odriozola-Serrano *et al.* (2008) observan durante el almacenamiento de zumo de tomate a 4°C tratado por PEAI (35 kV/cm, 1500  $\mu$ s) o pasteurizado (90°C, 60 s) que la capacidad antioxidante (DPPH) disminuye siguiendo una cinética de primer orden, debido a las reducciones de ácido ascórbico y licopeno a pesar de que la concentración de compuestos fenólicos se mantiene estable. Polydera *et al.* (2005) cuando determinan la capacidad antioxidante mediante el método ABTS en zumo de naranja pasteurizado y tratado por altas presiones almacenado a 0, 5, 10 y 15°C observan que la capacidad antioxidante de las muestras disminuye durante el periodo de almacenamiento debido principalmente a la reducción de la concentración de ácido ascórbico y, Dede *et al.* (2007) encuentran que los valores de capacidad antioxidante (DPPH) durante el almacenamiento a 4 y 25°C para zumo de tomate y zumo de zanahoria disminuyen significativamente atribuyendo ésta pérdida a la reducción de la concentración de ácido ascórbico.

#### *Efecto de la temperatura sobre los valores de ORAC<sub>FL</sub>*

Tras la aplicación del ANOVA multifactorial (Anexo I.f.) se encuentra que la temperatura es un factor determinante sobre los valores de ORAC<sub>FL</sub> en las bebidas de zumo y leche de manera que, dichos valores se incrementan para las bebidas almacenadas a 10°C respecto a las almacenadas a 4°C.

Así mismo, se encuentran interacciones entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Figura nº 51a) y la temperatura y el tratamiento de conservación aplicado (Figura nº 51b). Los valores de ORAC<sub>FL</sub> se incrementan con el tiempo de almacenamiento y en mayor grado en las muestras almacenadas a 10°C. A una temperatura dada los valores de ORAC<sub>FL</sub> de las bebidas pasteurizadas son superiores a los de las bebidas tratadas por PEAI.

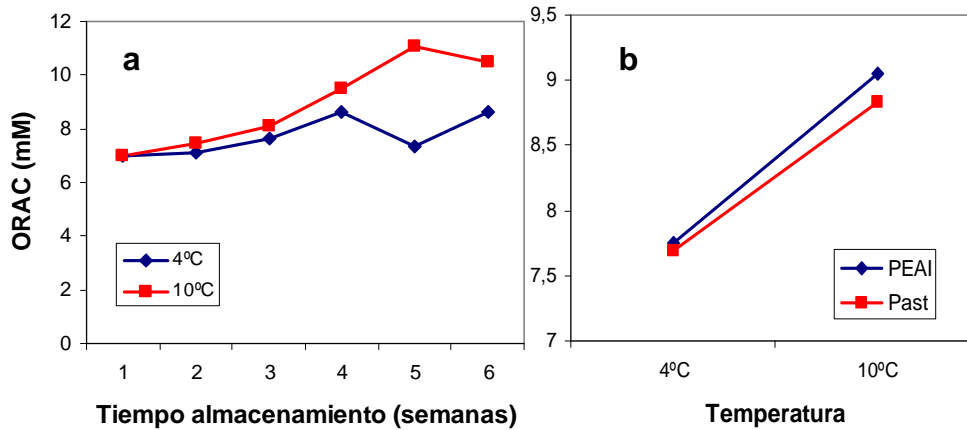
---

Efecto del tiempo de almacenamiento sobre los valores de ORAC<sub>FL</sub>

El ANOVA realizado indica que el tiempo de almacenamiento es un factor que incide sobre los valores de ORAC<sub>FL</sub> de modo que éstos incrementan a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento.

Como se ha comentado existen interacciones entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, no existen interacciones entre el tiempo y el tratamiento de conservación aplicado por lo que los valores de capacidad antioxidante ORAC<sub>FL</sub> evolucionan del mismo modo para ambos tratamientos a medida que transcurre el tiempo.

Los valores de ORAC<sub>FL</sub> en contraposición a lo que ocurre con los valores obtenidos mediante el ensayo TEAC, aumentan con la temperatura y tiempo de almacenamiento. El mantenimiento de los valores de ORAC durante las primeras semanas de almacenamiento e incluso el posterior incremento podría deberse a que, como se comenta en el Capítulo 6, la capacidad antioxidante determinada mediante el método ORAC para las bebidas de zumo y leche, se debe principalmente a la contribución de ésta última y en particular a la fracción caseica que sufre pocas alteraciones durante el almacenamiento, esto junto a la formación de nuevos compuestos con capacidad antioxidante y al incremento en las concentraciones de los compuestos fenólicos daría como resultado un aumento en los valores al final del periodo de almacenamiento. De nuevo, los resultados obtenidos resultan difíciles de comparar por la falta de trabajos similares en estas bebidas. Para periodos más cortos de almacenamiento, Skrede *et al.* (2004) encuentran en mezclas del 13% de zumo de baya con leche almacenados durante 3 semanas que los valores de ORAC no varían durante el periodo de almacenamiento mientras, Wegrzyn *et al.* (2008) indican para muestras de leche adicionadas con polifenoles de manzana que los valores de ORAC disminuyen durante el almacenamiento a 20°C y 38°C.



**Figura nº 51.** Capacidad antioxidante (ORAC). Interacciones tiempo-temperatura (a), temperatura-tratamiento de conservación (b).

Al realizar correlaciones bivariadas entre los valores de  $ORAC_{FL}$  y los diferentes compuestos bioactivos de la bebida, se encuentra una correlación significativa con los compuestos fenólicos ( $r=0.698$ ,  $p<0.001$ ) lo que coincide con los resultados obtenidos por diversos autores (Ehlenfeldt *et al.* 2001; Bisby *et al.* 2008).

### 7.3.5. Parámetros físico-químicos.

#### 7.3.5.1. pH

Los valores de pH de las bebidas almacenadas a 4 y 10°C se muestran en el Cuadro nº 60.

A tiempo inicial se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los valores de pH de las muestras pasterizadas ( $3.43\pm 6\cdot 10^{-3}$ ) respecto de las bebidas sin tratar ( $3.40\pm 6\cdot 10^{-3}$ ) y de las tratadas por PEAI ( $3.40\pm 5\cdot 10^{-3}$ ). Sin embargo, estas diferencias son prácticamente insignificantes.

**Cuadro nº 60.** Variación en los valores de pH de las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C.

T (días)	T <sub>alm</sub> = 4°C			T <sub>alm</sub> = 10°C		
	Control	PEAI	Past.	Control	PEAI	Past.
0	3.40±6*10 <sup>-3</sup> aA	3.40±5*10 <sup>-3</sup> acA	3.43±6*10 <sup>-3</sup> aB	3.40±6*10 <sup>-3</sup> aA	3.40±7*10 <sup>-3</sup> abB	3.43±5*10 <sup>-3</sup> aB
7	3.38±6*10 <sup>-3</sup> bA	3.39±5*10 <sup>-3</sup> bA	3.44±6*10 <sup>-3</sup> aB	3.40±6*10 <sup>-3</sup> aA	3.39±8*10 <sup>-3</sup> bB	3.44±4*10 <sup>-3</sup> aB
14	3.40±6*10 <sup>-3</sup> aA	3.41±5*10 <sup>-3</sup> aA	3.44±6*10 <sup>-3</sup> aB	3.34±6*10 <sup>-3</sup> bA	3.39±7*10 <sup>-3</sup> abB	3.42±4*10 <sup>-3</sup> abB
21	3.40±6*10 <sup>-3</sup> aA	3.39±5*10 <sup>-3</sup> cA	3.43±6*10 <sup>-3</sup> aB	3.25±6*10 <sup>-3</sup> cC	3.39±7*10 <sup>-3</sup> abB	3.42±4*10 <sup>-3</sup> abB
28	3.41±6*10 <sup>-3</sup> aA	3.41±5*10 <sup>-3</sup> acA	3.42±6*10 <sup>-3</sup> aA	*	3.39±7*10 <sup>-3</sup> aA	3.41±5*10 <sup>-3</sup> baA
35	3.27±6*10 <sup>-3</sup> cA	3.32±5*10 <sup>-3</sup> dB	3.32±6*10 <sup>-3</sup> bB	*	3.33±7*10 <sup>-3</sup> cA	3.32±5*10 <sup>-3</sup> cA
42	3.31±6*10 <sup>-3</sup> cA	3.34±5*10 <sup>-3</sup> dB	3.33±6*10 <sup>-3</sup> bB	*	*	*

<sup>a-e</sup> distintas letras minúsculas para los valores de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) con respecto al tiempo de almacenamiento.

<sup>A-C</sup> distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) con respecto al tratamiento aplicado.

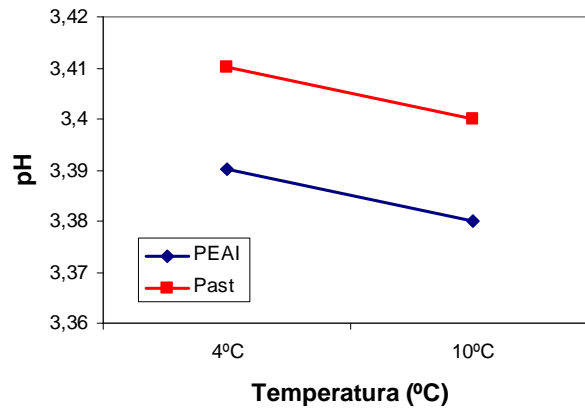
\* bebidas estropeadas.

Para conocer la influencia del tratamiento de conservación aplicado (pasterización o PEAI), la temperatura (4 o 10°C) y el tiempo de almacenamiento (1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas) sobre los valores de pH se aplica una análisis de la variancia de tres factores, calculando también las posibles interacciones entre dichos factores (Anexo I.g).

#### Efecto de la temperatura de almacenamiento

La aplicación del ANOVA de tres factores indica que la temperatura no es un factor incidente sobre los valores de pH de modo que no existen diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) para las dos temperaturas de almacenamiento ensayadas.

Sin embargo, existe interacción entre la temperatura y el tratamiento de conservación aplicado, es decir, los valores de pH son distintos en las bebidas pasterizadas respecto a las bebidas tratadas por PEAI según la temperatura de almacenamiento seleccionada (Figura nº 52) de modo que son más altos para las bebidas pasterizadas que para las tratadas por PEAI a ambas temperaturas de almacenamiento (4 y 10°C).



**Figura nº 52.** pH. Interacción temperatura-tratamiento de conservación aplicado.

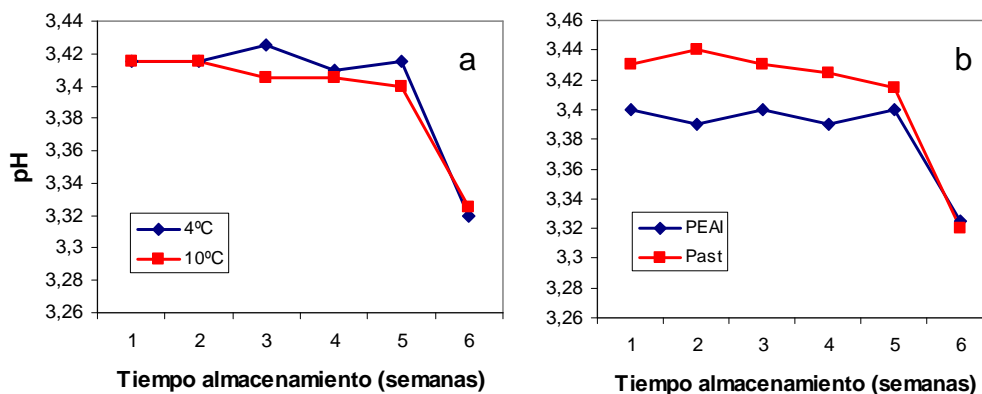
Efecto del tiempo de almacenamiento

La aplicación del ANOVA de tres factores muestra que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los valores de pH en función del tiempo de almacenamiento, observándose un descenso de los valores de pH a partir de la cuarta semana. Las diferencias estadísticamente significativas obtenidas para los distintos tiempos de almacenamiento se indican en el Cuadro nº 60.

La reducción en los valores de pH puede deberse al crecimiento de microorganismos como bacterias acidolácticas. De acuerdo con estos resultados, Odriozola-Serrano *et al.* (2008b) observan en el zumo de tomate

tratado por PEAI (35 KV/cm, 1000  $\mu$ s) y pasterización (90°C, 30-60 s) que el pH disminuye a los 56 días de almacenamiento a 4°C debido al crecimiento de microorganismos. Sin embargo, Élez-Martínez *et al.* (2006) encuentran para zumo de naranja tratado por PEAI (35 kV/cm, 1000 ms) y pasterización (90°C, 60 s) almacenado a 4°C y 22°C que los valores de pH se incrementan a partir de 56 días de almacenamiento en los zumos almacenados a 22°C debido al deterioro ocasionado por el crecimiento de microorganismos. En este caso, el incremento en los valores de pH puede deberse al crecimiento de levaduras ya que, según señalan Arranz *et al.* (2000) y Sodeko *et al.* (1987) éstas son capaces de degradar los ácidos orgánicos, con el consecuente aumento del pH.

Existen interacciones, estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), entre el tiempo de almacenamiento y la temperatura (Figura nº 53a) o el tratamiento de conservación aplicado (Figura nº 53b). En función de la temperatura de almacenamiento los valores de pH más bajos corresponden a las bebidas almacenadas a 10°C ya que el crecimiento de microorganismos es más favorable a temperaturas más altas. En función del tratamiento de conservación aplicado, las bebidas pasterizadas presentan valores ligeramente superiores de pH inmediatamente tras el tratamiento mientras a partir de la quinta semana, los valores de pH se igualan.



**Figura nº 53.** pH. Interacción tiempo de almacenamiento-temperatura (a) y tiempo – tratamiento de conservación (b).

### 7.3.5.2. °Brix

Los resultados obtenidos para los °Brix durante el periodo de almacenamiento se muestran en el Cuadro nº 61. A tiempo inicial, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos de conservación aplicados y la bebida sin tratar.

**Cuadro nº 61.** Cambios en los °Brix de las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C.

tiempo (días)	T <sub>alm</sub> =4°C			T <sub>alm</sub> = 10°C		
	Sin tratar	PEAI	Past.	Sin tratar	PEAI	Past.
0	13.5±0.08 <sup>aA</sup>	13.6±0.07 <sup>aA</sup>	13.5±0.09 <sup>aA</sup>	13.5±0.08 <sup>aA</sup>	13.6±0.07 <sup>aA</sup>	13.5±0.09 <sup>abA</sup>
7	13.4±0.08 <sup>abA</sup>	13.6±0.09 <sup>aB</sup>	13.4±0.08 <sup>aC</sup>	13.2±0.08 <sup>bA</sup>	13.2±0.08 <sup>bA</sup>	13.4±0.09 <sup>aB</sup>
14	13.2±0.09 <sup>bcA</sup>	13.6±0.08 <sup>aB</sup>	13.5±0.09 <sup>aB</sup>	13.2±0.09 <sup>bA</sup>	12.8±0.08 <sup>cb</sup>	13.5±0.08 <sup>abC</sup>
21	13.4±0.07 <sup>abA</sup>	13.5±0.10 <sup>aB</sup>	13.7±0.09 <sup>aB</sup>	13.5±0.09 <sup>aA</sup>	8.0±0.08 <sup>dB</sup>	13.7±0.09 <sup>abC</sup>
28	13.1±0.07 <sup>cA</sup>	13.7±0.10 <sup>abB</sup>	13.7±0.09 <sup>aB</sup>	*	5.8±0.09 <sup>eA</sup>	13.6±0.10 <sup>abB</sup>
35	13.4±0.07 <sup>abA</sup>	13.9±0.10 <sup>bB</sup>	13.8±0.09 <sup>aB</sup>	*	5.4±0.07 <sup>fA</sup>	13.8±0.09 <sup>bB</sup>
42	13.4±0.07 <sup>abA</sup>	13.6±0.08 <sup>aB</sup>	13.6±0.09 <sup>aB</sup>	*	*	*

<sup>a-e</sup> distintas letras minúsculas para los valores de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

<sup>A-C</sup> distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento aplicado.

\* bebidas estropeadas.

Para conocer la influencia del tratamiento de conservación aplicado (pasterización o PEA), la temperatura (4 y 10°C) y el tiempo de almacenamiento (1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) sobre los °Brix, se aplica un ANOVA de tres factores (Anexo I.h).

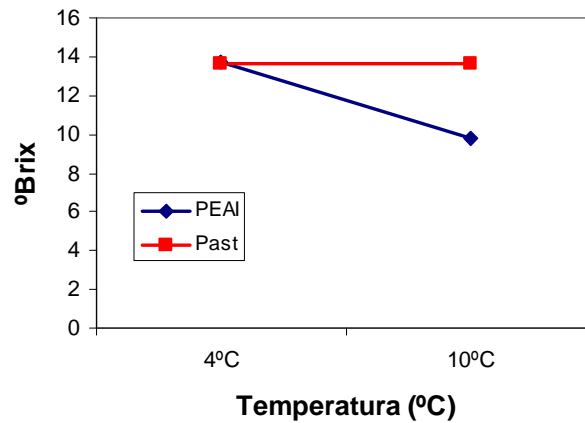
#### Efecto de la temperatura de almacenamiento

Tras el ANOVA multifactorial se encuentra que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para los °Brix en función de la



temperatura de almacenamiento (4°C o 10°C) siendo superiores los valores de las bebidas almacenadas a 4°C (Figura n° 54).

Asimismo, existe interacción entre la temperatura y el tratamiento de conservación aplicado, de modo que a una temperatura de almacenamiento dada las bebidas tratadas por PEAI presentan valores de °Brix inferiores a las pasteurizadas. Estas interacciones se deben a los datos obtenidos en la bebida tratada por PEAI almacenada a 10°C en la que los °Brix descienden a partir de la cuarta semana de almacenamiento debido probablemente al proceso de fermentación en estas bebidas. Dicha fermentación puede deberse al crecimiento de microorganismos que consumen los azúcares (sólidos solubles) de la muestra y causan la aparición de gas.

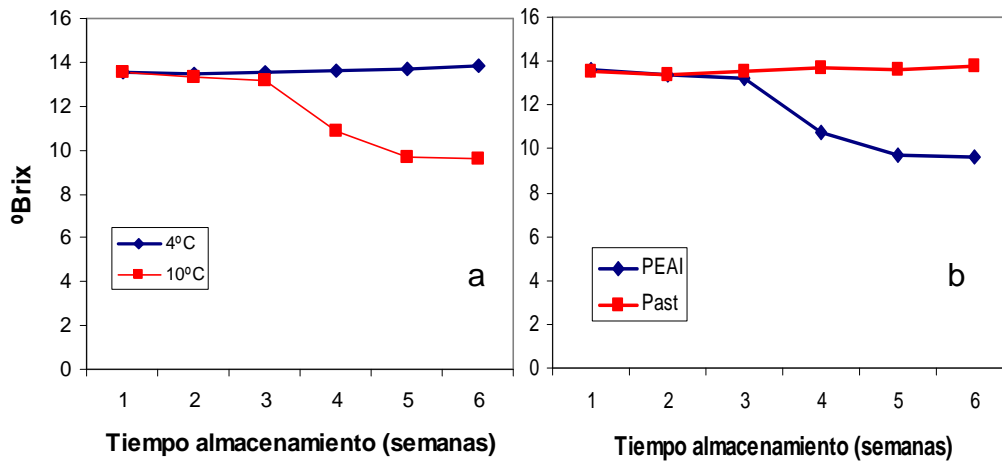


**Figura n° 54.** °Brix. Interacción temperatura-tratamiento de conservación.

#### Efecto del tiempo de almacenamiento

El ANOVA multifactorial realizado muestra que el tiempo de almacenamiento influye sobre los °Brix. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) para los distintos tiempos de almacenamiento se muestran en el Cuadro n° 61.

Existen interacciones ( $p < 0.05$ ), entre el tiempo de almacenamiento y la temperatura o el tratamiento de conservación aplicado (Figura nº 55). Durante el almacenamiento de las bebidas, se observan ligeros incrementos de los °Brix. A partir de la quinta semana, en la bebida tratada por PEAl almacenada a 10°C, se observa una ligera separación de fases a causa de una desestabilización de la pectina y una precipitación de la caseína al disminuir el pH de la bebida en las últimas semanas. Dicha separación de fases la observa también Sampedro (2008) para bebidas de zumo de naranja y leche sin tratar a partir de dos semanas de almacenamiento a 8°C. Sin embargo, debido a que dichos autores establecieron el tiempo de almacenamiento de la bebida en 4 semanas, no es posible comparar el efecto observado para un tiempo más prolongado. Otros autores no encuentran variaciones en los °Brix de zumo de naranja a distintos tiempos y temperaturas de almacenamiento (Ayhan *et al.* 2001; Élez-Martínez *et al.* 2006; Cortés *et al.* 2008a).



**Figura nº 55.** °Brix. Interacciones tiempo de almacenamiento-temperatura (a) y tiempo de almacenamiento-tratamiento de conservación (b).

### 7.3.5.3. Densidad

Las variaciones en la densidad de la bebida sin tratar, tratada por PEAI y por pasterización durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C se muestran en el Cuadro nº 62. A tiempo inicial, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de densidad de las bebidas sin tratar respecto a las tratadas por PEAI o por pasterización.

**Cuadro nº 62.** Densidad (g/mL) de las bebidas de zumo de naranja y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C.

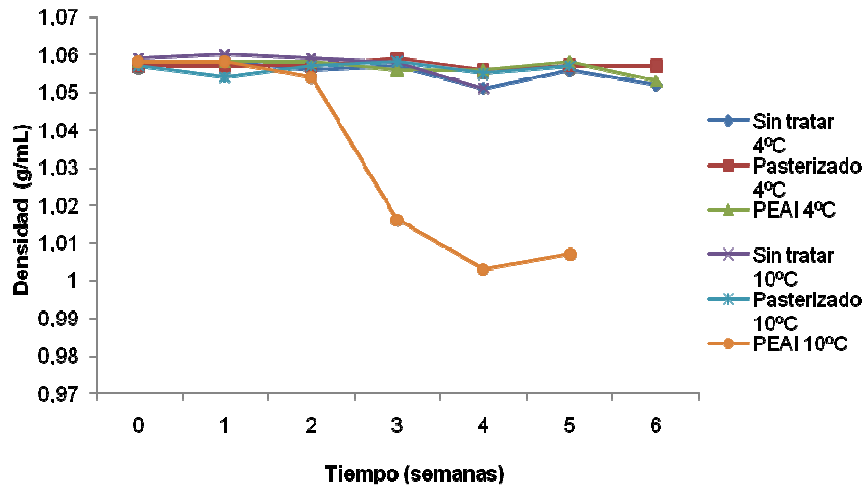
tiempo (días)	T <sub>alm</sub> = 4°C			T <sub>alm</sub> = 10°C		
	Sin tratar	PEAI	Past.	Sin tratar	PEAI	Past.
0	1.058 <sup>aA</sup>	1.058 <sup>aA</sup>	1.056 <sup>aA</sup>	1.058 <sup>aA</sup>	1.056 <sup>aA</sup>	1.056 <sup>aA</sup>
7	1.058 <sup>aA</sup>	1.058 <sup>aA</sup>	1.057 <sup>aA</sup>	1.060 <sup>bA</sup>	1.054 <sup>aB</sup>	1.054 <sup>bB</sup>
14	1.056 <sup>aA</sup>	1.058 <sup>aA</sup>	1.057 <sup>aA</sup>	1.059 <sup>abA</sup>	1.016 <sup>bB</sup>	1.057 <sup>aA</sup>
21	1.057 <sup>aA</sup>	1.056 <sup>aA</sup>	1.059 <sup>bB</sup>	1.051 <sup>cC</sup>	1.003 <sup>cD</sup>	1.056 <sup>aA</sup>
28	1.051 <sup>bA</sup>	1.056 <sup>aB</sup>	1.056 <sup>aB</sup>	*	1.007 <sup>cC</sup>	1.056 <sup>aA</sup>
35	1.053 <sup>bA</sup>	1.058 <sup>aB</sup>	1.057 <sup>aB</sup>	*	1.005 <sup>cC</sup>	1.058 <sup>aA</sup>
42	1.052 <sup>bA</sup>	1.053 <sup>bA</sup>	1.057 <sup>aB</sup>	*	*	*

<sup>a-c</sup> diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento.

<sup>A-D</sup> distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento aplicado.

\* bebidas estropeadas.

Como puede observarse la densidad de las muestras se mantiene prácticamente estable en las bebidas de zumo y leche para las condiciones y tratamientos de conservación ensayados (Figura nº 56). Sin embargo, la densidad en las bebidas tratadas por PEAI almacenadas a 10°C desciende a partir de la tercera semana de almacenamiento coincidiendo con los resultados obtenidos para los sólidos solubles en suspensión (°Brix). Esto se debe a que la densidad es un parámetro relacionado estrechamente con los sólidos solubles por lo que el consumo de éstos causan una reducción de la densidad del producto.



**Figura nº 56.** Cambios en la densidad de las bebidas durante el periodo de almacenamiento.

#### 7.3.5.4. Índice de turbidez

Los resultados de turbidez de las bebidas pasterizadas y tratadas por PEAI se muestran en el Cuadro nº 63 y Figura nº 57. A tiempo inicial no se observan diferencias estadísticamente significativas entre las bebidas sin tratar, pasterizadas o tratadas por PEAI.

Tal y como muestran los resultados, el índice de turbidez de las bebidas tratadas por PEAI almacenadas a 10°C decae progresivamente a partir de la segunda semana de almacenamiento ( $p < 0.05$ ) observando un mayor descenso a partir de la tercera semana. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para los °Brix. Las bebidas pasterizadas se mantienen sin variaciones a lo largo del periodo de almacenamiento o se observan, incluso, ligeros incrementos lo que puede ser debido a la pérdida de conformación de la bebida como se ha apuntado en apartados anteriores, que hace que se degrade parte de la pectina que estabiliza la mezcla y se encuentren sólidos en suspensión.

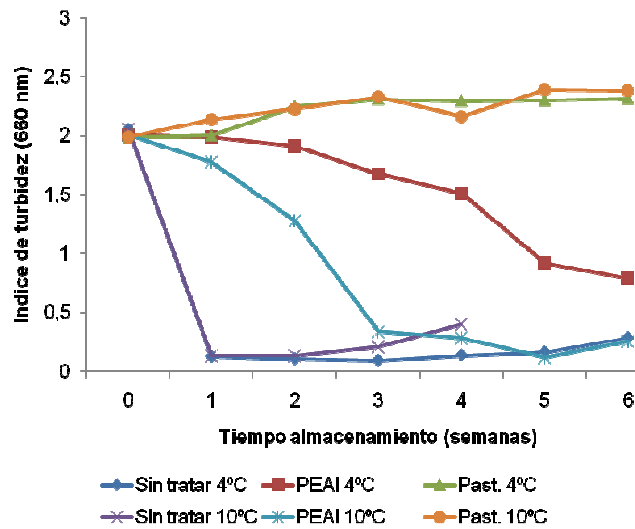
**Cuadro nº 63.** Índice de turbidez de las bebidas de zumo de naranja y leche durante el periodo almacenamiento a 4 y 10°C.

tiempo (días)	T <sub>alm</sub> =4°C		T <sub>alm</sub> = 10°C	
	PEAI	Pasterización	PEAI	Pasterización
0	2.01 <sup>a</sup>	1.99 <sup>a</sup>	2.01 <sup>a</sup>	1.99 <sup>a</sup>
7	1.99 <sup>a</sup>	2.01 <sup>a</sup>	1.78 <sup>a</sup>	2.14 <sup>a</sup>
14	1.91 <sup>a</sup>	2.25 <sup>b</sup>	1.28 <sup>b</sup>	2.23 <sup>ab</sup>
21	1.68 <sup>ab</sup>	2.32 <sup>b</sup>	0.34 <sup>c</sup>	2.33 <sup>b</sup>
28	1.51 <sup>b</sup>	2.30 <sup>b</sup>	0.29 <sup>c</sup>	2.16 <sup>ab</sup>
35	0.92 <sup>c</sup>	2.31 <sup>b</sup>	0.12 <sup>c</sup>	2.39 <sup>b</sup>
42	0.73 <sup>c</sup>	2.32 <sup>b</sup>	*	*

<sup>a-c</sup> diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento.

<sup>\*A-D</sup> distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento aplicado.

\* bebidas estropeadas.



**Figura nº 57.** Variaciones en el índice de turbidez durante el periodo de almacenamiento de las bebidas de zumo de naranja y leche.

#### **7.3.5.5. Parámetros de color.**

Los valores medios de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  así como los valores calculados para el Chroma ( $C^*$ ) y hue angle ( $h^\circ$ ) de las bebidas de zumo de naranja y leche almacenadas a 4 y 10°C se muestran en el Cuadro nº 64.

A tiempo inicial, coincidiendo con los resultados obtenidos en el capítulo 3, los cambios de color ( $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ ) de las bebidas pasteurizadas ( $\Delta E = 1.30$ ) respecto a las bebidas sin tratar son mayores que los obtenidos para las bebidas tratadas por pulsos ( $\Delta E = 0.85$ ).

**Cuadro nº 64.** Cambios en los parámetros de color en las bebidas de zumo y leche durante el periodo de almacenamiento a 4 y 10°C.

	Tiempo (días)	Sin tratar 4°C	Past. 4°C	PEAI 4°C	Sin tratar 10°C	Past. 10°C	PEAI 10°C
<b>L</b>	0	72.71 <sup>a</sup>	72.23 <sup>ad</sup>	72.18 <sup>a</sup>	72.71 <sup>a</sup>	72.23 <sup>a</sup>	72.18 <sup>a</sup>
	7	72.17 <sup>b</sup>	71.53 <sup>b</sup>	70.72 <sup>b</sup>	71.64 <sup>b</sup>	72.36 <sup>a</sup>	70.75 <sup>b</sup>
	14	72.52 <sup>a</sup>	73.02 <sup>c</sup>	71.16 <sup>c</sup>	71.63 <sup>b</sup>	72.28 <sup>a</sup>	70.90 <sup>b</sup>
	21	71.13 <sup>c</sup>	72.40 <sup>a</sup>	70.11 <sup>d</sup>	70.65 <sup>c</sup>	71.67 <sup>b</sup>	73.80 <sup>c</sup>
	28	72.72 <sup>a</sup>	73.25 <sup>c</sup>	71.42 <sup>e</sup>	*	72.46 <sup>a</sup>	74.05 <sup>c</sup>
	35	71.53 <sup>d</sup>	72.17 <sup>d</sup>	70.89 <sup>b</sup>	*	72.35 <sup>a</sup>	72.62 <sup>d</sup>
	42	72.07 <sup>b</sup>	74.81 <sup>e</sup>	72.83 <sup>f</sup>	*	*	*
<b>a*</b>	0	-3.35 <sup>a</sup>	-4.56 <sup>a</sup>	-3.57 <sup>ac</sup>	-3.35 <sup>a</sup>	-4.56 <sup>a</sup>	-3.57 <sup>ad</sup>
	7	-3.35 <sup>a</sup>	-4.63 <sup>a</sup>	-3.75 <sup>a</sup>	-3.59 <sup>b</sup>	-4.33 <sup>ab</sup>	-3.80 <sup>ab</sup>
	14	-2.93 <sup>bc</sup>	-4.04 <sup>bc</sup>	-3.31 <sup>bc</sup>	-3.15 <sup>ac</sup>	-4.10 <sup>b</sup>	-3.93 <sup>b</sup>
	21	-3.23 <sup>ab</sup>	-4.05 <sup>b</sup>	-3.55 <sup>ac</sup>	-3.03 <sup>c</sup>	-4.04 <sup>b</sup>	-3.07 <sup>c</sup>
	28	-2.79 <sup>c</sup>	-3.75 <sup>bc</sup>	-3.38 <sup>bc</sup>	*	-3.43 <sup>c</sup>	-3.30 <sup>cd</sup>
	35	-3.16 <sup>ab</sup>	-3.68 <sup>c</sup>	-3.20 <sup>b</sup>	*	-3.31 <sup>c</sup>	-3.21 <sup>e</sup>
	42	-4.35 <sup>d</sup>	-4.74 <sup>a</sup>	-4.24 <sup>d</sup>	*	*	*
<b>b*</b>	0	32.28 <sup>a</sup>	32.20 <sup>a</sup>	31.61 <sup>a</sup>	32.38 <sup>a</sup>	32.20 <sup>a</sup>	31.61 <sup>a</sup>
	7	35.63 <sup>b</sup>	36.51 <sup>b</sup>	36.34 <sup>b</sup>	34.36 <sup>b</sup>	35.06 <sup>b</sup>	35.98 <sup>bd</sup>
	14	33.02 <sup>c</sup>	35.32 <sup>c</sup>	34.13 <sup>c</sup>	35.98 <sup>c</sup>	36.24 <sup>c</sup>	36.01 <sup>bd</sup>
	21	36.46 <sup>d</sup>	38.04 <sup>b</sup>	37.99 <sup>d</sup>	38.08 <sup>d</sup>	40.50 <sup>d</sup>	35.62 <sup>b</sup>
	28	36.18 <sup>bd</sup>	36.28 <sup>d</sup>	35.86 <sup>e</sup>	*	36.24 <sup>c</sup>	37.71 <sup>c</sup>
	35	35.30 <sup>b</sup>	36.49 <sup>d</sup>	35.11 <sup>f</sup>	*	36.25 <sup>c</sup>	36.43 <sup>d</sup>
	42	33.41 <sup>c</sup>	32.47 <sup>a</sup>	33.34 <sup>g</sup>	*	*	*
<b>h*</b>	0	95.97 <sup>a</sup>	98.11 <sup>a</sup>	96.49 <sup>a</sup>	95.97 <sup>a</sup>	98.11 <sup>a</sup>	96.49 <sup>a</sup>
	7	95.42 <sup>b</sup>	97.09 <sup>b</sup>	95.78 <sup>b</sup>	96.01 <sup>a</sup>	97.09 <sup>b</sup>	96.08 <sup>a</sup>
	14	95.12 <sup>b</sup>	96.57 <sup>bc</sup>	95.59 <sup>bc</sup>	95.40 <sup>b</sup>	96.50 <sup>c</sup>	96.28 <sup>a</sup>
	21	95.11 <sup>b</sup>	96.13 <sup>cd</sup>	95.39 <sup>c</sup>	94.86 <sup>c</sup>	95.75 <sup>d</sup>	94.97 <sup>b</sup>
	28	94.46 <sup>d</sup>	95.95 <sup>d</sup>	95.43 <sup>c</sup>	*	95.46 <sup>de</sup>	95.05 <sup>b</sup>
	35	95.16 <sup>b</sup>	95.81 <sup>d</sup>	95.26 <sup>c</sup>	*	95.20 <sup>e</sup>	93.63 <sup>c</sup>
	42	97.47 <sup>e</sup>	98.35 <sup>a</sup>	97.29 <sup>d</sup>	*	*	*
<b>C*</b>	0	32.45 <sup>a</sup>	32.52 <sup>a</sup>	31.81 <sup>a</sup>	32.55 <sup>a</sup>	32.52 <sup>a</sup>	31.81 <sup>a</sup>
	7	35.79 <sup>b</sup>	37.79 <sup>b</sup>	37.53 <sup>b</sup>	34.55 <sup>b</sup>	35.33 <sup>b</sup>	36.18 <sup>bd</sup>
	14	33.15 <sup>c</sup>	35.55 <sup>c</sup>	34.29 <sup>c</sup>	33.80 <sup>c</sup>	36.47 <sup>c</sup>	36.22 <sup>bd</sup>
	21	36.60 <sup>d</sup>	38.25 <sup>b</sup>	38.16 <sup>d</sup>	36.11 <sup>d</sup>	40.70 <sup>d</sup>	35.75 <sup>b</sup>
	28	36.29 <sup>bd</sup>	36.47 <sup>d</sup>	36.02 <sup>e</sup>	*	36.40 <sup>c</sup>	37.85 <sup>c</sup>
	35	35.44 <sup>b</sup>	36.68 <sup>d</sup>	35.26 <sup>f</sup>	*	36.40 <sup>c</sup>	36.57 <sup>e</sup>
	42	33.69 <sup>c</sup>	32.81 <sup>a</sup>	33.61 <sup>g</sup>	*	*	*

<sup>a-g</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en función del tiempo de almacenamiento.

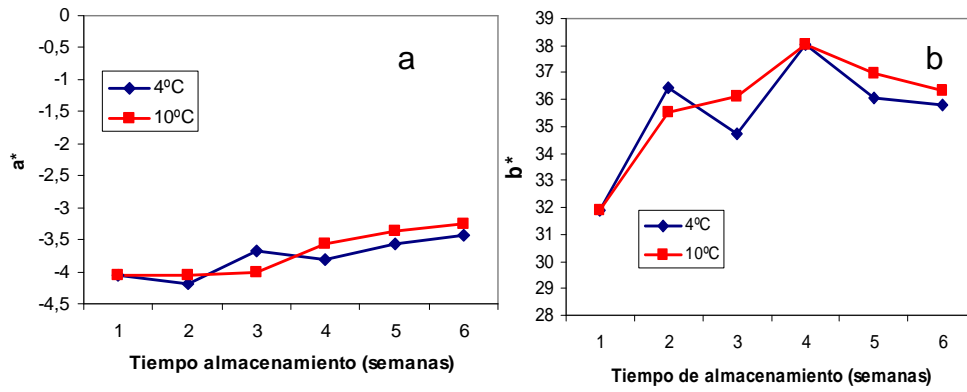
Para conocer el efecto del tratamiento de conservación aplicado (pasterización o PEAI), la temperatura (4 y 10°C) y el tiempo de almacenamiento (1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) sobre los parámetros de color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) se aplica un análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores (Anexo I.i, I.j, I.k).

#### Efecto de la temperatura de almacenamiento.

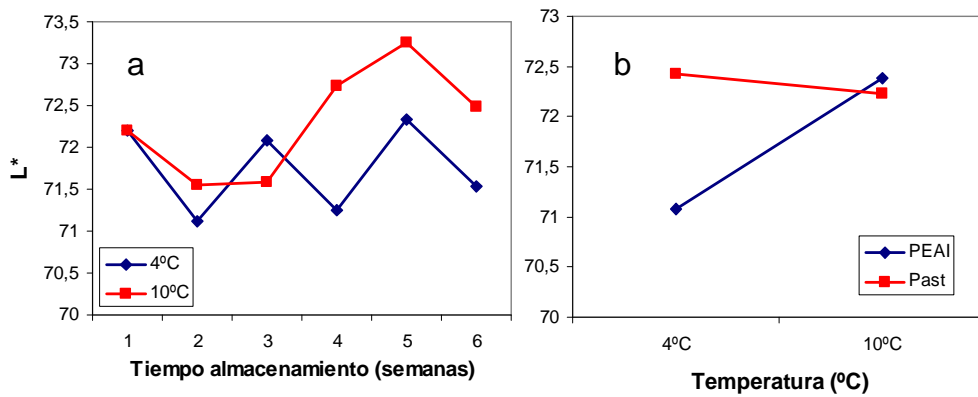
El ANOVA aplicado, indica que la temperatura de almacenamiento influye sobre los valores de  $a^*$  y  $L^*$  mientras que no existen diferencias estadísticamente significativas para los valores de  $b^*$ . Prácticamente, en todos los casos los mayores cambios se observan para las bebidas almacenadas a 10°C.

Para todos los parámetros de color, existen interacciones entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento de modo que, los valores de  $a^*$  y  $b^*$  incrementan durante el almacenamiento y en mayor grado a temperaturas de 10°C (Figura nº 58a y b). Sin embargo, para los valores de  $L^*$  no se observa una tendencia clara (Figura nº 59a) y se encuentra, además, una interacción entre la temperatura de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado (Figura nº 59b). Las bebidas tratadas por PEAI almacenadas a 4°C presentan menor luminosidad respecto a las pasterizadas almacenadas a la misma temperatura. Sin embargo, el efecto contrario se produce cuando la temperatura de almacenamiento es de 10°C. Estos resultados pueden deberse a la influencia de los sólidos solubles en suspensión en la determinación de la luminosidad de las muestras ya que, como se ha comentado en apartados anteriores, los °Brix difieren significativamente para las bebidas tratadas por PEAI almacenadas a 10°C.





**Figura nº 58.** Interacciones temperatura-tiempo de almacenamiento para los parámetros  $a^*$  (a) y  $b^*$  (b).

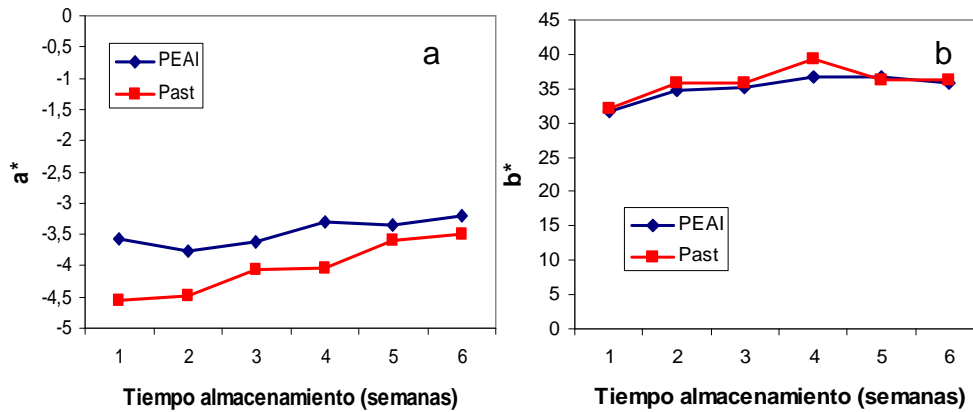


**Figura nº 59.** Interacciones temperatura-tiempo de almacenamiento (a), y temperatura-tratamiento de conservación aplicado (b) para el parámetro  $L^*$ .

Efecto del tiempo de almacenamiento.

Los resultados del ANOVA multifactorial muestran que el tiempo es un factor influyente en todos los parámetros de color determinados ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). Durante el almacenamiento, se incrementan los valores de  $a^*$  y  $b^*$  lo que indica un incremento en las características rojo-amarillentas del sistema (Calvo, 2004) y en mayor grado para las bebidas almacenadas a 10°C lo que concuerda con

la interacción tiempo-temperatura obtenida. Asimismo, existe interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado (PEAI o pasterización) de modo que los valores de  $a^*$  son superiores para las bebidas tratadas por PEAJ respecto a las pasterizadas (-3.47 vs -4.04, respectivamente) (Figura nº 60a). Las diferencias para los valores de  $b^*$  son menores pero también se encuentra una interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado (Figura nº 60b) de modo que las bebidas pasterizadas presentan valores ligeramente superiores frente a las bebidas tratadas por PEAJ (35.94 vs 35.11, respectivamente). Los incrementos de  $a^*$  y  $b^*$  durante el periodo de almacenamiento, pueden deberse al desarrollo de melanoidinas derivadas de la reacción de Maillard producidas por la reacción entre los azúcares de la bebida y los aminoácidos de la leche aunque, también podrían deberse a la estabilidad de los pigmentos que aportan dichas coloraciones ( $\beta$ -caroteno) ya que, se encuentra una correlación significativa entre las concentraciones de dicho carotenoide y los valores de  $b^*$  ( $r=0.434$ ,  $p=0.01$ ) pudiendo hacerse más notables al reducirse las concentraciones de otros pigmentos carotenoides con el tiempo de almacenamiento. Aumentos en los valores de  $a^*$  y  $b^*$  con el incremento de la temperatura y el tiempo de almacenamiento han sido descritos en muestras de leche por varios autores (Rampilli y Andreini, 1992; Rossi y Pompei, 1991; Ferrer *et al.* 2005) y para los valores de  $b^*$  en zumo de naranja (Lee y Chen, 2003).



**Figura nº 60.** Interacción tiempo-tratamiento de conservación para los parámetro  $a^*$  (a) y  $b^*$  (b).

Los valores de  $h^0$  disminuyen con el tiempo de almacenamiento ( $r = -0.382$ ,  $p < 0.001$ ) tendiendo hacia colores más puros y los valores de  $C^*$  se incrementan ( $r = 0.250$ ,  $p < 0.05$ ) denotando una saturación del color.

En la última semana de almacenamiento (42 días) se observa un cambio en la tendencia de los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para todas las bebidas analizadas por lo que se realizó la determinación de todos los parámetros durante una semana más (49 días) para comprobar si efectivamente existía un cambio en la tendencia de color. Los resultados obtenidos en la semana 7 (datos no mostrados) apoyaron los datos de la semana anterior. Estos cambios en la tendencia de color confirman la enorme complejidad de las reacciones que se dan en un alimento de naturaleza más compleja como es la bebida de zumo y leche.

La comparación de los resultados obtenidos con datos bibliográficos no es fácil, pues la información relativa a los diferentes parámetros de color de bebidas de zumo de fruta y leche es escasa. Sampedro (2008) obtiene para la misma bebida de zumo de naranja y leche tratada por PEA1 (30 kV/cm, 50  $\mu$ s) y pasterización (85°C, 66 s) almacenada entre 8-10°C durante 4 semanas que, los valores de  $L^*$  aumentan ligeramente durante las tres primeras semanas de

almacenamiento y luego decaen. Por otro lado, los valores de  $a^*$  se mantienen inalterables en la bebida sin tratar y tratada por PEAI durante las 3 primeras semanas y posteriormente se incrementan mientras que, la bebida pasteurizada se mantiene sin variaciones. Por último, los valores de  $b^*$  aumentan con el tiempo de almacenamiento para la bebida pasteurizada sin embargo disminuyen para la bebida tratada por PEAI y no sufren variaciones en la bebida sin tratar. Wegrzyn *et al.* (2008) observan para muestras de leche con zumo de manzana almacenadas a 20°C y 38°C durante 12 semanas, un incremento en los valores de  $a^*$  acompañados por un descenso en los valores de  $L^*$  y valores constantes de  $b^*$ .

Respecto a los cambios de color ( $\Delta E$ ) (datos no mostrados), se encuentra que existe una correlación positiva, no significativa, con el tiempo de almacenamiento ( $r= 0.325$ ,  $P>0.05$ ) de modo que los cambios observados en el color de las muestras se harían más visibles con el tiempo de almacenamiento no existiendo diferencias significativas en función del tipo de tratamiento aplicado (PEAI o pasteurización) ni de la temperatura de almacenamiento (4 y 10°C) aunque, las diferencias de color halladas son ligeramente mayores para las bebidas almacenadas a 10°C respecto a las almacenadas a 4°C. Dichas fluctuaciones en los cambios de color pueden ser debidas a las múltiples reacciones que se dan en la bebida de modo que, aparecen nuevos compuestos con pigmentación y se destruyen parte de los pigmentos (carotenoides) presentes de manera natural como se ha comentado anteriormente.

#### **7.3.5.6. Hidroximetilfurfural**

Los valores de HMF (mg/L) de las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4°C y 10°C se muestran en el Cuadro nº 65. A tiempo inicial existen diferencias estadísticamente significativas entre las bebidas pasteurizadas respecto a las bebidas sin tratar y las tratadas por PEAI puesto que las primeras presentan un ligero contenido en HMF (0.27 mg HMF/L) a tiempo cero mientras que dicho compuesto no se detecta en las bebidas frescas y las tratadas por PEAI.

**Cuadro nº 65.** Variación en las concentraciones de HMF (mg/L) en las bebidas de zumo de naranja y leche almacenadas a 4 y 10°C.

tiempo (días)	T <sub>alm</sub> = 4°C			T <sub>alm</sub> = 10°C		
	Sin tratar	PEAI	Past.	Sin tratar	PEAI	Past.
0	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0.27 <sup>aB</sup>	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>aA</sup>	0.27 <sup>aB</sup>
7	0 <sup>aA</sup>	0.33 <sup>Bb</sup>	1.16 <sup>bC</sup>	2.66 <sup>bD</sup>	0.63 <sup>bE</sup>	1.66 <sup>bF</sup>
14	0 <sup>aA</sup>	0 <sup>a</sup>	1.18 <sup>bB</sup>	1.73 <sup>cD</sup>	1.30 <sup>cE</sup>	1.78 <sup>cF</sup>
21	0 <sup>aA</sup>	0.09 <sup>cB</sup>	1.45 <sup>cC</sup>	2.49 <sup>dD</sup>	1.10 <sup>dE</sup>	1.70 <sup>dF</sup>
28	0 <sup>aA</sup>	0.42 <sup>dB</sup>	1.94 <sup>dC</sup>	*	1.30 <sup>eD</sup>	2.85 <sup>eE</sup>
35	0.41 <sup>bA</sup>	1.32 <sup>eB</sup>	2.01 <sup>dC</sup>	*	1.94 <sup>fD</sup>	4.19 <sup>fE</sup>
42	0.62 <sup>cA</sup>	1.90 <sup>fB</sup>	4.00 <sup>eC</sup>	*	*	*

\*a-f distintas letras minúsculas para los valores de una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tiempo de almacenamiento.

\*A-F distintas letras mayúsculas para los valores de una misma fila indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento aplicado.

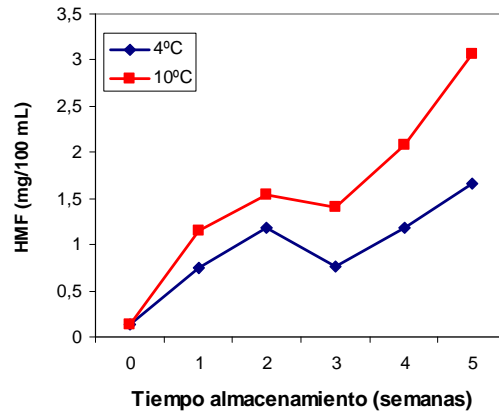
\* bebidas estropeadas.

Para conocer el efecto del tratamiento de conservación aplicado (pasterización o PEA), la temperatura (4 y 10°C) y el tiempo de almacenamiento (1, 2, 3, 4, 5 y 6 semanas) sobre los valores de HMF se aplica un análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores (Anexo I.I).

#### Efecto de la temperatura de almacenamiento.

El ANOVA realizado indica que la temperatura es un factor influyente sobre los valores de HMF durante el almacenamiento puesto que, a temperaturas de 10°C los contenidos en HMF son mayores.

Así mismo existe una interacción entre la temperatura y el tiempo de almacenamiento (Figura nº 61) de manera que los incrementos de HMF con el tiempo son más acusados para temperaturas de almacenamiento superiores (10°C).

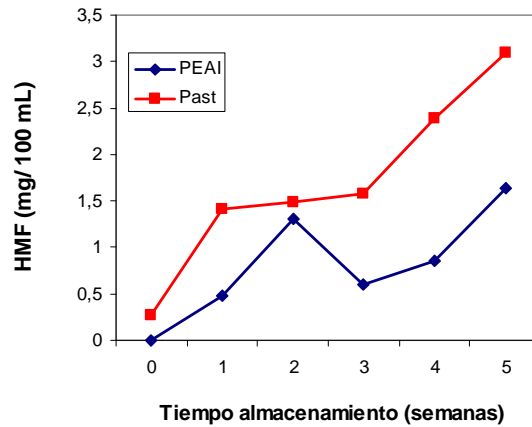


**Figura nº 61.** HMF. Interacción temperatura-tiempo de almacenamiento.

Efecto del tiempo de almacenamiento.

El ANOVA indica también la influencia del tiempo de almacenamiento sobre los valores de HMF de modo que estos se incrementan durante el mismo. Estos resultados coinciden con los observados por diversos autores que apuntan que la formación de HMF es directamente proporcional al tiempo y temperatura de almacenamiento (Naim *et al.* 1993; Solomon *et al.* 1994; Martín *et al.* 1995).

También, existe interacción entre el tiempo de almacenamiento y el tratamiento de conservación aplicado (Figura nº 62) de modo que el aumento en los valores de HMF son superiores para las bebidas pasteurizadas respecto a las tratadas por PEAI.



**Figura nº 62.** HMF. Interacción tiempo de almacenamiento-tratamiento de conservación aplicado.

Durante el periodo de almacenamiento, los niveles de HMF se mantienen siempre por debajo de los límites establecidos para zumos tratados térmicamente (5 mg/L) (AIJN, 1996). De acuerdo con estos resultados, Chavez-Servín *et al.* (2005) obtienen en fórmulas infantiles de leche que, los valores de HMF se incrementan a lo largo del periodo de almacenamiento (12 meses) cuando las muestras son almacenadas a 37°C. Sin embargo, cuando las mismas muestras se almacenan a 25°C, las concentraciones de HMF fluctúan durante el periodo de almacenamiento, incrementando y descendiendo continuamente lo que, según explican Morales *et al.* (1997) se debe al equilibrio entre los procesos de destrucción de dichos compuestos por reacciones de oxidación y la formación de los mismos a través de los precursores desencadenados por la reacción de Maillard.

Cserhalmi *et al.* (2006) observan que no existen diferencias en las concentraciones de HMF entre los zumos tratados por PEAI (28 kV/cm, 100 µs), respecto a los zumos frescos obteniendo valores de 0.22 y 0.25 para los zumos frescos y tratados por PEAI, respectivamente. Rodrigo *et al.* (2003) observan en muestras de zumo de naranja-zanahoria almacenadas durante 6 semanas a 4 y 10°C que el contenido en HMF se incrementa durante el periodo de almacenamiento siendo mayor en muestras almacenadas a 10°C pero siempre

por debajo de los límites establecidos. Cortés *et al.* (2008) encuentran los mismos resultados en zumos de naranja tratados por PEAI y pasterización almacenados durante 7 semanas a 2 y 10°C. Rivas *et al.* (2006) obtienen para zumo de naranja-zanahoria pasterizado y tratado por PEAI que, las concentraciones de HMF son muy pequeñas ( $0.013 \pm 0.001$  mg/L) y que no varían durante el almacenamiento a 2°C. Burdulu *et al.* (2006), cuando almacenan zumo de naranja concentrado a diferentes temperaturas (28°C, 37°C y 45°C) obtienen que las concentraciones de HMF se mantienen siempre por debajo de los límites máximos permitidos durante todo el periodo de almacenamiento (8 semanas). Solomon *et al.* (1995), estudian los valores de HMF en zumo de naranja reconstituido y pasterizado (95°C, 15 s) encontrando que dichos valores se incrementan ligeramente (cambios no significativos estadísticamente) durante el periodo de almacenamiento (50 días) a 8°C.

#### **7.4. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos del análisis de los distintos parámetros nutricionales y de la capacidad antioxidante total durante el almacenamiento en refrigeración de las bebidas de zumo de naranja y leche, indican que las bebidas tratadas por PEAI presentan resultados semejantes o incluso mejores que las pasterizadas. Sin embargo, se detectan algunos problemas físico-químicos y organolépticos cuando las bebidas tratadas por la tecnología no térmica se almacenan a 10°C puesto que pueden aparecer ligeras fermentaciones. El mantenimiento de la cadena del frío en la bebida de zumo y leche cuando se trata por PEAI resulta de fundamental importancia.



Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas y contribuciones en congresos:

- Autores: **Zulueta, A.**, Esteve, M.J., Frígola, A.

Título: **Ascorbic acid stability in refrigerated orange juice-milk beverage treated by pulsed electric fields and thermal pasteurization.**

Tipo de participación: Proceeding.

Congreso: Fruit, vegetable and potato processing.

Fecha y lugar de celebración: Del 4 al 5 de Noviembre de 2007, Gante (Bélgica).



## **5. CONCLUSIONES**

---

### **CONCLUSIONS**



## CONCLUSIONES

La revisión bibliográfica efectuada y los resultados obtenidos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. Del estudio realizado sobre las bebidas de zumo de fruta y leche enriquecidas con vitaminas A, C, D y E comercializadas en España, se concluye que:

- La concentración de vitamina C está comprendida entre 9 y 54 mg/100mL.

- El contenido de carotenoides en estas bebidas es muy variable y en muchos casos éstos se encuentran en forma de isómeros *cis* (*Z*) cuya actividad vitamínica es menor. Además, el análisis permite detectar la adición no declarada de carotenoides con actividad vitamínica en estas bebidas.

- La concentración de compuestos fenólicos solubles totales varía ampliamente de unas bebidas a otras (27-100 mg GAE/100 mL). Dichas concentraciones difieren significativamente según las condiciones de almacenamiento, siendo mayores para las bebidas refrigeradas.

- La capacidad antioxidante de las bebidas se correlaciona con el contenido de ácido ascórbico, siendo éste el principal contribuyente a la misma.

- Los parámetros físico-químicos, °Brix, pH y densidad, muestran una influencia positiva sobre los valores de capacidad antioxidante.

2. De los resultados obtenidos en el estudio realizado para evaluar los tratamientos por PEAI como alternativa a los tradicionales por calor, se comprueba que:

- Las concentraciones de ácido ascórbico, carotenoides, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante total, se reducen en menor medida tras la aplicación de los PEAI frente al tratamiento por pasterización.

- Los carotenoides con actividad vitamínica A y los compuestos fenólicos son más estables a los tratamientos por PEAI, incrementando incluso su contenido en algunos casos.

- Los parámetros físico-químicos, pH y °Brix, se mantienen invariables tras los tratamientos aplicados (PEAI y pasterización). El color de las bebidas tratadas por PEAI es similar al de la bebida sin tratar mientras que, en las bebidas pasterizadas los cambios son apreciables.

- La tecnología de PEAI no afecta significativamente a las concentraciones de ácidos grasos y los cambios encontrados, tanto cuali como cuantitativamente, son despreciables desde el punto de vista nutricional.

3. Durante el almacenamiento en refrigeración (4 °C) la evolución de los distintos parámetros nutricionales y de la capacidad antioxidante total de las bebidas de zumo de naranja y leche tratadas por PEAI es similar o incluso mejor que en las pasterizadas. Sin embargo, cuando se almacenan a 10°C aparecen ligeras fermentaciones. Por tanto, en la bebida de zumo y leche tratada por PEAI el mantenimiento de la cadena del frío resulta de fundamental importancia.

4. El estudio realizado sobre la capacidad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>) de la leche indica que:

- La fracción caseica es la que le confiere la alta capacidad antioxidante a la leche.
- El mayor contenido en grasa de la leche implica un aumento de la capacidad antioxidante.
- Existen diferencias estadísticamente significativas según el tratamiento de conservación aplicado (UHT, pasterización). La capacidad antioxidante es mayor en el lactosuero y suero deproteínizado de la leche pasterizada.

5. De la comparación de los métodos TEAC y ORAC se deduce que, cuando una muestra es compleja o posee antioxidantes de muy diversa naturaleza (hidrófilos, lipófilos o proteicos) la correlación entre ambos métodos es baja, puesto que el método TEAC subestima la capacidad antioxidante de alimentos con compuestos antioxidantes de naturaleza lipófila y proteica.





**CONCLUSIONS**

The literature review and the results obtained made possible to establish the following conclusions:

1. From the analysis of fruit juices-milk beverages marketed in Spain the main outcomes were:
  - a. Vitamin C concentrations ranged between 9 and 54 mg/100 mL.
  - b. Carotenoid contents varied highly among beverages and in many cases provitamin A carotenoids were present in its cis (*Z*) stereoisomer form which has a lower vitamin activity. Additionally, the HPLC analysis demonstrated the addition of vitamin A in some samples which was not declared on the label.
  - c. Phenolic compounds concentration varied from 27 to 100 mg GAE/ 100 mL. These concentrations differed significantly with storage conditions being higher for the refrigerated beverages.
  - d. The antioxidant capacity was correlated with ascorbic acid content being the main contributor to antioxidant capacity found.
  - e. Physicochemical parameters: pH, °Brix and density showed a significant influence on antioxidant capacity.
  
2. From the study of the evaluation of PEF technology as an alternative to pasteurization, it could be concluded that,
  - a. Concentrations of ascorbic acid, carotenoids and phenolic compounds, and the total antioxidant capacity were less affected after PEF treatments than after pasteurization.
  - b. Provitamin A carotenoids and phenolic compounds were more stable to PEF compared with pasteurization and their concentrations were even higher after some PEF treatments.
  - c. Physicochemical parameters, pH and °Brix, were neither affected by PEF nor pasteurization. Color of PEF-treated beverages was similar to fresh one whereas after pasteurization, color was noticeable changed.

- d. PEF technology caused no effect on fatty acid profile and from a nutritional point of view the changes observed were negligible.
3. During refrigerated storage (4°C), nutritional parameters and antioxidant capacity of PEF-treated orange juice-milk beverages were similar or even better than pasteurized ones. However, when PEF-treated beverages were stored at 10°C fermentation signs appeared. Therefore, cold-chain maintenance in PEF-treated fruit juice-milk beverages mixtures is extremely important.
  4. From the study of milk antioxidant capacity (ORAC<sub>FL</sub>) results shown that:
    - Casein fraction is the main contributor to the high antioxidant capacity of milk.
    - The higher fat content, the higher antioxidant capacity was.
    - Statistical significant differences were found depending on thermal treatment applied (UHT, pasterización). Antioxidant capacity of whey and deproteinized milk of pasteurized samples were higher than that obtained for UHT ones.
  5. From the comparison about TEAC and ORAC methods to measure the antioxidant capacity of beverage mixtures, it can be concluded that for complex matrixes such as orange juice-milk beverage which contains antioxidants of different natures (hydrophilic, lipophylic and proteic) no correlation between methods were found due to the fact that TEAC method underestimated the total antioxidant capacity of foods with lipophylic and proteic antioxidants.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

---

### **REFERENCES**



- ABRAM, F., Smelt, J.P.P.M., Bos, R. W., Wouters, P.C. (2003). Modeling and optimization of inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric field treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 571-579.
- AGUILAR-ROSAS, S.F., Ballinas-Casarrubias, M.L., Nevarez-Moorillon, G.V., Martin-Belloso, O., Ortega-Rivas, E. (2007). Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavour compounds. *Journal of Food Engineering*, 83, 41-46.
- ÁLVAREZ, I., Mañas, P., Condón, S., Raso, J. (2003). Resistance variation of *Salmonella enterica* serovars to pulsed electric fields treatments. *Journal of Food Science*, 68, 2316-2320.
- ANDLAUER, W., Fürst, P. (2002) Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35, 171-176.
- ANESE, M., Manzocco, L., Nicoli, M.C., Lerici, C.R. (1999) Antioxidante properties of tomato juice as affected by heating. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 750-754.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- APARICIO, P., Farré, R., Frígola, A. (1992). Determinación del ácido ascórbico en vegetales por polarografía diferencial de impulsos. *Anales de Bromatología*, XLIV, 257-261.
- ARENA, E., Fallico, B., Maccarone, E. (2001). Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chemistry*, 74, 423-427.
- ARNAO, M.B., Cano, A., Acosta, M. (1998) Estimación de la actividad antioxidante total de cítricos y su relación con el contenido de vitamina C. *Fruticultura*, 93, 48-54.
- ARRANZ, I.J. (2000). Caracterización físico-química y de calidad del zumo fresco de naranja y de naranja-zanahoria. Tesis de Licenciatura. Universitat de València. Valencia.
- AIJN. Association of the industry of juices and nectars from fruits and vegetables. (1996). Association of the industry of juices and nectars of the European Economic Community code practice for evaluation of fruit and vegetable juices. Brussels: AIJN.
- AWIKA, J.M., Rooney, L.W., Wu, X., Prior, R.L., Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6657-6662.
- AYHAN, Z., Yeom, H.W., Zhang, H., Min, D.B. (2001). Flavor, color, and vitamin C retention of pulsed electric field processed orange juice in different packaging materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 669-674.
- BAKER, R., Günter, C. (2004). The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 484-488.
- BARÓ, L., Fonollá, J., Peña, J.L., Martínez-Férez, A., Lucena, A., Jiménez, J., Boza, J.J., López-Huertas, E. (2003). n-3 fatty acids plus oleic acid and vitamin supplemented

- milk consumption reduces total and LDL cholesterol, homocysteine and levels of endothelial adhesion molecules in healthy humans. *Clinical Nutrition*, 22, 175–182.
- BARSOTI, L., Dumay, E., Mu, T.H., Fernandez, M.D., Cheftel, J.C. (2001). Effects of high voltage electric pulses on protein based food constituents and structures. *Trends in Food Science Technology*, 12, 136-144.
- BAUERNEFEIND, J.C (1984). Natural food colors. In J.C. Bauernfeind, Carotenoids as colorants and vitamin A precursors, 1-37. New York: Academic Press
- BENDICHO, S., Espachs, A., Arántegui, J., Martín, O. (2002). Effects of high pulsed electric fields and heat treatments on vitamins of milk. *Journal of Dairy Research*, 69, 113-123.
- BISBY, R.H., Brooke, R., Navaratnam, S. (2008). Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. *Food Chemistry*, 108, 1002-1007.
- 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. *LWT - Food Science and Technology*, 37, 171-175.
- BOE (Boletín Oficial del Estado). (2003). Anexo II. Sustancias vitamínicas y sales minerales que pueden utilizarse en la fabricación de complementos alimenticios. *Real Decreto 1275/2003 de 10 de octubre relativo a los complementos alimenticios*. Madrid.
- BRADDOCK, R.J. (1999). Single strength orange juices and concentrate. In Handbook of Citrus by-products and Processing Technology; Wiley, J.; New York, 53-83.
- BRITTON, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1551-1558.
- BUCHHEIM, W., Schrader, K., Morr, C.V., Frede, E., Schütt, M. (1995). Effects of high pressure on the protein, lipid and mineral phase of milk. In *Heat treatments and alternative methods* (pp 202-213). Special Issue nº 9602. Brussels: International Dairy Federation.
- BUCHHEIM, W., Schütt, M., Frede, E. (1996). High pressure effects on emulsified fats. In R. Hayashi, C. Balny (eds.), *High pressure bioscience and biotechnology* (pp. 331-336). Amsterdam: Elsevier.
- 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.
- BURDULU, H.S., Koca, N., Karandeniz, F. (2006). Degradation of vitamin C in citrus juices concentrates during storage. *Journal of Food Engineering*, 74, 211-216.
- BURINI G. (2007). Development of a quantitative method for the analysis of total l-ascorbic acid in foods by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1154, 97–102.

- 
- CALLIGARIS, S., Manzocco, L., Anese, M., Nicoli, M.C. (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant and prooxidant activity of milk. *International Dairy Journal*, 14, 421-427.
- CALVO, C., Salvador, A., Fiszman, S.M. (2001). Influence of colour intensity on the perception of colour and sweetness in various fruit flavoured yoghurts. *European Food Research and Technology*, 213, 99-103.
- CALVO, C. (2004). Optical properties. En Nollet, L. M. L. *Handbook of food analysis. Physical characterization and nutrient analysis*, vol. 1. New York: Marcel Dekker, Inc. pp.1-19.
- CAO, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical and Biology Medicine*, 14, 303-311.
- CAO, G., Prior, R.L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44, 1309-1315.
- CARDONA, A., Castelo, M., Sanjuán, E., Millán, R., Gómez, R. (1992). Zumos de fruta. Principios generales de elaboración y estabilidad. *Alimentaria*. Abril, 53-56.
- CARLE, R. (1999). Physical and chemical stability of ATBC drinks. *Fruit Processing*, 9, 342-349.
- CERVATO, G., Cazzola, R., Cestaro, B. (1999). Studies on antioxidant activity of milk caseins. *International Journal Food Science and Nutrition*, 50, 291-296.
- CHÁVEZ-SERVÍN, J., Castelloe, A., López-Sabater, M.C. (2005). Evolution potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage. *Food Research International*, 39, 536-543.
- CHEN., T.M., Chen, B.H. (1994). Optimization of mobile phases for HPLC of cis-trans carotene isomers. *Chromatographia*, 39, 346-354.
- CHEN, B.H., Peng, H.Y., Chen, H.E. (1995). Changes of carotenoids, color and vitamina A contents during storage of carrot juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 1912-1918.
- CHEN, J., Lindmark-Mansson, H., Gorton, L., Akesson, B. (2003). Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. *International Dairy Journal*, 13, 927-935.
- 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.
- CIE. Commission Internationale L'Eclairage. (1978). Recommendations on uniform color spaces, color-difference equations, psychometric color terms. CIE publication no. 15 (E- 1.3.1). Supplement 2. Vienna: Bureau Central de la CIE.
- CONNOR, W.E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, 71, 171-175.
- CORTÉS, C. (2006b). Estudio de parámetros nutritivos y de calidad en alimentos líquidos de origen vegetal procesados por tecnologías no térmicas. *Tesis de Licenciatura*.
-

- CORTÉS, C., Esteve, M.J., Frígola, A. (2008b). Color of orange juice treated by High Intensity Pulsed Electric Fields during refrigerated storage and comparison with pasteurized juice. *Food Control*, 19, 151-158.
- CORTÉS, C., Esteve, M.J., Frígola, A. (2008a). Effect of refrigerated storage on ascorbic acid content of orange juice treated by pulsed electric fields and thermal pasteurization. *European Food Research and Technology*, 227, 629-635.
- 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.
- CORTÉS, C., Esteve, M.J., Rodrigo, D., Torregrosa, F., Frígola, A. (2006a). Changes of colour and carotenoids contents during high intensity pulsed electric field treatment in orange juices. *Food and Chemical Toxicology*, 1932-1939.
- CRAFT, N. E. (1992). Carotenoid reversed-phase high performance liquid chromatography methods: Reference compendium. *Methods in Enzymology*, 185-205. Ed.; Academic Press: New York.
- CSERHALMI, Z., Sass-Kiss, A., Toth-Markus, M., Lechner, N. (2006). Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 49-54.
- DEDE, S., Alpas, H., Bayindirli, A. (2007). High hydrostatic pressure treatment and storage of carrot and tomato juices: Antioxidant activity and microbial safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 773-782.
- DEL CARO, A., Piga, A., Vacca, V., Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food Chemistry*, 84, 99-105.
- DÍAZ, M., Decker, E.A. (2004). Antioxidant mechanisms of caseinophosphopeptides and casein hydrosylates and their application in ground beef. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8208-8213.
- EHLENFELDT, M.K., Prior, R.L. (2001). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2222-2227.
- ÉLEZ-MARTÍNEZ, P., Martín-Belloso, O. (2007). Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, 102, 201-209.
- ÉLEZ-MARTÍNEZ, P., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2006). Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric field or heat treatment. *European Food Research and Technology*, 22, 321-329.
- 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.
- ESPINOSA, A., Salinas, F., Berzas, J.J. (1992). Hydroxymethylfurfural by derivative spectrophotometry. *Journal of AOAC International*, 75, 678-684.



- 
- 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., 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. *Lebensmittel Unters Forsch A*, 208, 144-147.
- ESTEVE, M.J., Frígola, A., Rodrigo, C., Rodrigo D. (2005). Effect of storage period under variable conditions on the chemical and physical composition and color of Spanish refrigerated orange juices. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1413-1422.
- EUROPEAN Parliament and Council. (1994). Directive 94/36/EC of 30 June 1994 on colours for use in foodstuffs. OJ No. L237, European Parliament and Council, pp. 13-29.
- FEDERAL REGISTER. (1997). Part V, Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, vol. 62, No 96, p. 27463.
- FELDMAN, E.B. (1999). Assorted monounsaturated fatty acids promote healthy hearts. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 953-954.
- FERRER, E., Alegría, A., Farré, R., Clemente, G., Calvo, C. (2005). Fluorescence, browning index, and color in infant formulas during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4911-4917.
- FIORÉ, A., La Fauci, L., Cervellati, R., Guerra, M.C., Speroni, E., Costa, S., Galvano, G., De Lorenzo, A., Bacchelli, V., Fogliano, V., Galvano, F. (2005). Antioxidant activity of pasteurized and sterilized commercial red orange juices. *Molecular nutrition and Food Research*, 49, 1129.
- FIPJF. (1974) Méthodes d'Analyses. Fédération Internationale des Producteurs de Jus de Fruits (FIPJF), c/o Schweiz Obstverband, CH-6300 Zug 2, Switzerland.
- FLOURY, J., Grosset, N., Leconte, N., Pasco, M., MAdec, M.N., Jeantet, R. (2006). Continuous raw skim milk processing by pulsed electric field at non-lethal temperature: effect on microbial inactivation and functional properties. *Lait*, 86, 43-57.
- FOLCH, J., Lees, M., Sloane-Stanley G.H. (1957). A Simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biology and Chemistry*, 226, 497-509.
- FUNK, C.D. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294, 1871-1875.
- GAHLER, S., Otto, K., Böhm, V. (2003). Alterations of vitamin C, total phenolics and antioxidant capacity as affected by processing tomatoes to different products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7962-7968.
- GAMMA J.J.T., de Sylos C.M. (2007). Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chemistry*, 100, 1686-1690
-

- GARDE-CERDÁN, T., Arias-Gil, M., Marsellés-Fontanet, R., Ancín-Azpilicueta, C., Martín-Belloso, O. (2007). Effects of thermal and non-thermal processing treatments on fatty acids and free amino acids of grape juice. *Food Control*, 18, 473-479.
- 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.
- GIGER, A. (2002). Chemical synthesis project. A new Bellow Carotenoids. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 1383-1390.
- GIL-IZQUIERDO, A., Gil, M., Ferreres, F. (2002). Effect of processing techniques at industrial scale on orange juice antioxidant and beneficial health compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5107- 5114.
- GOFF, H. D. Hill, A. R. (1993). *Chemistry and Physics*. In *Dairy Science and Technology Handbook. Vol 1. Principles and Properties* (Ed. Y. H. Hui) 1 pp. 182, VHC Publ., New York.
- GÓMEZ, N., García, D., Álvarez, I., Condón, S., Raso, J. (2005). A model describing the kinetics of inactivation of *Lactobacillus plantarum* in a buffer system of different pH and in orange and apple juice. *Journal of Food Engineering*, 70, 7-14.
- 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. *LWT - Food Science and Technology*, 35, 375-388.
- GORINSTEIN, S., Martín-Belloso, O., Park, Y., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., Caspi, A., Libman, I., Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, 74, 309-315.
- HARRIS, W.S. (2003). n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids reduce risk of coronary heart disease death: extending the evidence to the elderly. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77, 279–280.
- 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.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 588-593.
- IOM. (2001). Dietary Reference Intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC. *National Academy Press*.
- JOHNSON, J.R., Braddock, R.J., Chen, C.S. (1995). Kinetics of Ascorbic Acid loss and nonenzymatic browning in orange juice serum: experimental rate constants. *Journal of Food Science*, 60, 502-505.
- KITTS, D.D., Weiler, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9, 1309-1323.

- KLIMCZAK, I., Malecka, M., Szlachta, M., Gliszczynska-Swiglo, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313-322.
- KORHONEN, H., Korpela, R. (1994). The effects of dairy processes on the components and nutritional value of milk. *Scandinavian Journal of Nutrition/ Næringsforskning*, 38, 166-172.
- KRIS-ETHERTON, P.M., Pearson, T.A., Wan, Y., Hargrove, R.L., Moriarty, K., Fishell, V., Etherton, T. (1999). High monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 1009–1015.
- KWOK, K.C., MacDougall, D.B., Nirajam, K. (1999). Reaction kinetics of heat-induced colour changes in soymilk. *Journal of Food Engineering*, 40, 15-20.
- LAAKSO, S. (1984). Inhibition of lipid peroxidation by casein. Evidence of molecular encapsulation of 1,4-pentadiene fatty acids. *Biochimica et Biophysica acta- lipids and lipid metabolism*, 792, 11-15.
- LANDRUM, J.T., Bone, R.A. (2001). Lutein, Zeaxanthin, and the Macular Pigment. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385, 28-40.
- LARSSON, S.C, KumLin, M., Ingelman-Sundberg, M., Wolk, A. (2004) Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: A review of potential mechanisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 935-945.
- 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., (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.
- LEE, H.S., Coates, G.A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Food Science and Technology*, 36, 153-156.
- LESSIN, W.J., Catignani, 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.
- LIAO, M.L., Seib, P.A. (1987). Selected reactions of L-ascorbic acid related to foods. *Food Technology*, 11, 104-111.
- LINDMARK-MANSSON, H., Akesson, B. (2000). Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, 84, S103–S110.
- LO SCALZO, R., Iannocari, T., Summa, C., Morelli, R., Rapisarda, P. (2004). Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. *Food Chemistry*, 85, 41-47.
- MANGLANO, P. (1999). Estudio de la fracción lipídica de fórmulas para lactantes: compuestos e indicadores de oxidación. *Tesis de Licenciatura*. Valencia.
- MARTÍN, J.J., Solanes, E., Bota, E., Sancho, J. (1995). Evolución química y organoléptica del zumo de naranja pasteurizado. *Alimentaria*, 4, 59-63.

- MARX, M., Schieber, A., Reinhold, C. (2000). Quantitative determination of carotene stereoisomers in carrot juices and vitamin supplemented (ATBC) drinks. *Food Chemistry*, 70, 403-408.
- MATA, P., Alonso, R., Mata, N. (2004). Los omega-3 y omega-9 en la enfermedad cardiovascular. Libro blanco de los omega-3. Ed. Médica Paramericana; Madrid. pp. 49-64.
- MCGOOKIN, B.J., Austin, M. (1991). Antioxidant activity of casein and Maillard reaction products from casein-sugar mixtures. *Journal of Dairy Science*, 58, 313-320.
- MELÉNDEZ-MARTINEZ, A.J., Britton, G., Vicario, I.M., Heredia, F.J. (2007). Relationship between color and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, 101, 1145-1150.
- MERCADANTE, A.Z., Britton, G., Rodriguez-Amaya, D.B. (1998b). Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4102-4106.
- MERCADANTE, A.Z., Rodriguez-Amaya, D.B. (1998a). Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 128-130.
- MICHALAC, S., Alvarez, V., Ji, T., Zhang, Q.H. (2003). Inactivation of selected microorganism and properties of pulsed electric field processed milk. *Journal of Food Processing and preservation*, 27, 137-151.
- MILLÁN, F.R., Roa, V. (2001). Uso de la metodología de superficie de respuesta en la evaluación del pardeamiento en Cambur procesado por impregnación al vacío. *INCI*, 26, pp. 290-295. ISSN 0378-1844.
- MILLER, N.J., Sampson, J., Candeias, L.P., Bramley, P.M., Rice-Evans, C.A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384, 240-242.
- MIN, S., Jin, Z.T. Min, S.K., Yeom, H., Zhang, Q.H. (2003). Commercial-scale pulsed electric field processing of orange juice. *Journal of Food Science*, 68, 1265-1271.
- MIN, S., Reina L., Zhang, H. (2002). Water activity and the inactivation of *Enterobacter cloacae* inoculated in chocolate liquor and a model system by pulsed electric field treatment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 26, 323-337.
- MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I., Hornero-Mendez, D., Pérez-Galvez, A. (2002). Carotenoids and provitamin A in functional foods. In W.J. Hurst (ed), *Methods of analysis for functional foods and nutraceuticals* (pp.101-157). Boca Raton, Londo, New York, Washington, DC: CRC Press.
- MORALES, F.J. (2005). Assessing the non-specific hydroxyl radical scavenging properties of melanoidins in a Fenton-type reaction system. *Analytica Chimica Acta*, 534, 171-176.
- MORALES, F.J., Romero, C., Jiménez-Pérez, S. (1997). A kinetic study on 5-hydroxymethyl-furfural formation in Spanish UHT milk stored at different temperaturas. *Journal of Food Science and Technology*, 34, 28-32.
- NAIM, M., Wainish, S., Zehavi, U., Peleg, H., Rouseff, H.P., Nagy, S. (1993). Inhibition by thiol compounds of off-flavor formation in stored orange juice. 1. Effect of L-cysteine and N-acetyl-L-cysteine on 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2h)-furanone formation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 41, 1355-1358.

- NEEDS, E., Capellas, M., Bland, P., Manoj, P., MacDougal, D., Paul, G. (2000). Comparison of heat and pressure treatments of skim milk, fortified with whey protein concentrate, for set yogurt preparation: effects on milk proteins and gel structure. *Journal of Dairy Research*, 67, 329-348.
- NISHA, P., Shinghal, R.S., Panditt, A.B. (2004). A study on degradation kinetic of ascorbic acid in amla (*Phyllanthus emblica* L.) during cooking. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 55, 415-422.
- ODRIOZOLA-SERRANO, I., Soliva-Fortuny, R., Gimeno-Añó, V., Martín-Belloso, O. (2008a). Modelling changes in health-related compounds of tomato juice treated by high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 89, 210-216.
- ODRIOZOLA-SERRANO, I., Soliva-Fortuny, R., Martín-Belloso, O. (2008b). Changes of health-related compounds throughout cold storage of tomato juice stabilized by thermal or high intensity pulsed electric field treatments. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 272-279.
- OLIVER J. Palou A., 2000, *Chromatographic determination of carotenoids in foods*. *Journal of Chromatography A*, 881, 543-555.
- 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, 36-42.
- OU, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- OZKAN, M., Kirca, A., Cemeroglu, B. (2004). Effects of hydrogen peroxide on the stability of AA during storage in various fruit juices. *Food Chemistry*, 88, 591-597.
- PELLEGRINI, N., Colombi, B., Salvatore, S., Brenna, O., Galaverna, G., Del Rio, D., Bianchi, M., Bennett, R., Brighenti, F. (2007). Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. *Journal of Science and Food Agriculture*, 87, 103-111.
- PELLEGRINI, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133, 2812-2819.
- PÉREZ, D., Leighton, F., Aspee, A., Aliaga, A., Lissi, E. (2000). A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities. *Biology Research*, 33, 71-77.
- PÉREZ, O.E., Pilosof, A.M.R. (2004). Pulsed electric effects on the molecular structure and gelation of  $\beta$ -lactoglobulin concentrate and egg white. *Food Research International*, 37, 102-110.
- PIHLANTO, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16, 1306-1314.
- PLAZA L., Sánchez-Moreno, C., Élez-Martínez, P., De Ancos, B., Martín-Belloso, O., Cano, M.P. (2006). Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity of orange juice processed by high-pressure or pulsed electric fields with regard to low pasteurization. *European Food Research and Technology*, 223, 487-493.

- POLYDERA, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2004). The effect of storage on the antioxidant activity of reconstituted orange juice which had been pasteurized by high pressure or heat. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 783-791.
- POLYDERA, A.C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2005a). Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh Navel orange juice: nutritional parameters and shelf life. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 1-9.
- POLYDERA, C., Stoforos, N.G., Taoukis, P.S. (2005b). Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice. *Food Chemistry*, 91, 495-503.
- PRIOR, R.L., Wu, X., Schovich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 52–63.
- PROTEGGENTE, A.R., Pannala, A., Paganga, G., Van Buren, L., Wagner, E., Wiseman, S., Van de Put, F., Dacombe, C., Rice-Evans, C. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36, 217–233.
- PROTEGGENTE, A.R., Saija, A., De Pasquale, A., Rice-Evans, C. (2003). The compositional characterisation and antioxidant activity of fresh juices from Sicilian sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) varieties. *Free Radical Research*, 37, 681–687.
- 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, 5132-5138.
- RAMPILLI, M., Andreini, R. (1992). Evaluation of colour components in sterilized milk. *Italian Journal of Food Science*, 4, 285-291.
- RAPISARDA, P, Tomaino, A, Lo Cascio, R., Bonina, F., de Pasquale, A., Saija, A. (1999) Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juice. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4718-4723.
- RE, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay. *Free Radical and Biology Medicine*, 26, 1231–1237.
- RICE-EVANS C., Miller, N.J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in enzymology*, 234, 279-293.
- RICE-EVANS,C.A., Miller, N.J. (1996) Antioxidant activities of flavonoids as bioactive food components. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-800.
- RIVAL, S.G., Boeriu, C.G., Wichers, H.J. (2001a). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 295–302.
- RIVAL, S.G., Fornaroli, S., Boeriu, C.G., Wichers, H.J. (2001b). Caseins and casein hydrolysates 1. Lipoxygenase inhibitory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 287-294.

- RIVAS, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Barbosa-Cánovas, G.V., Rodrigo, M. (2006a). Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *LWT*, 39, 1163-1170.
- RIVAS, A., Sampedro, F., Rodrigo, D., Martínez, A., Rodrigo, M. (2006b). Nature of the inactivation of *Escherichia Coli* suspended in an orange juice and milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223, 541-545.
- 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, 184-187.
- RODRIGO D, Arranz, J.I, Koch, S., Frígola, A., Rodrigo, M.C., Esteve, M.J., Calvo, C., Rodrigo, M. (2003). Physicochemical characteristics and quality of refrigerated Spanish orange-carrot juices and influence of storage conditions. *Journal of Food Science*, 68, 2111.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. (1997). Carotenoids and Food Preparation: The retention of provitamin A Carotenoids in prepared, processed and stored foods, OMNI Project, Washington DC, pp. 13–51.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. (1999). Changes in carotenoids during processing and storage of foods. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49, 38S-47S.
- RODRÍGUEZ-AMAYA, D.B. (2001). A guide to carotenoid analysis in foods. Washington DC: ILSI Press.
- 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.
- RUFÍÁN-HENARES, J.A., Morales, F.J. (2007). Functional properties of melanodins: in vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities. *Food Research International*, 40, 995-1002.
- SALEH, M.H., Tan, B. (1991). Separation and identification of cis/trans carotenoid isomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1438-1443.
- SAMANIEGO-SÁNCHEZ, C., Troncoso-González, A.M., García-Parrilla, M.C., Quesada-Granados, J.J., López-García de la Serrana, H., López-Martínez, M.C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytical Chimica Acta*, 593, 103–107.
- SAMPEDRO, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Rodrigo, M. (2006). Effect of temperature and substrate on PEF inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice-milk beverage. *European Food Research and Technology*, 223, 30-34.
- SAMPEDRO, F., Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Rodrigo, M. (2007). Pulsed electric fields inactivation of *Lactobacillus plantarum* in an orange juice- milk based beverages: Effects of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 80, 931-938.
- SAMPEDRO, F. (2008). Impacto del tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad y altas presiones hidrostáticas sobre la calidad y seguridad microbiológica de un alimento mezcla de zumo de naranja y leche. Tesis doctoral europea.

- SÁNCHEZ-MORENO, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, P. (2003a) 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.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. (2003b). Effect of high-pressure processing on the health promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis* L.) during chilled storage. *European Food Research and Technology*, 216, 18-22.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, P. (2006). Nutritional characterization of commercial traditional pasteurized tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chemistry*, 98, 749-756.
- SÁNCHEZ-MORENO, C., Plaza, L., Elez-Martinez, P., De Ancos, B., Martin-Belloso, O., Cano, M.P. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4403-4409.
- SILVA, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101, 1012-1018.
- SINGH, R.P., Heldman, D.R., Kirk, J.R (1976). Kinetics of quality degradation: ascorbic acid oxidation in infant formula during storage. *Journal of Food Science*, 41, 304-308.
- SINGLETON, V.L., Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- SKREDE, G., Bryhn Larsen, V., Aaby, K., Skivik Jorgensen, A., Birkeland, S.E. (2004). Antioxidative properties of commercial fruit preparation and stability of bilberry and black currant extracts in milk products. *Journal of Food Science*, 69, S351-S356.
- SODEKO, O.O., Izuagde, Y.S., Ukhun, M.E. (1987). Effect of different preservative treatments on the microbial population of Nigerian orange juice. *Microbios*, 51, 133-143.
- SOLOMON, O., Svanberg, U., Sahlström, A. (1995). Effect of oxygen and fluorescent light on the quality of orange juice during storage at 8°C. *Food Chemistry*, 53, 363-368.
- STINTZING, F., Herbach, K., Mosshammer, M., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C., Bunch, R., Felger, P. (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 442-451.
- SUETSUNA, K., Ukeda, H., Ochi, H. (2000). Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11, 128-131.
- TAIPONG, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Hawkins, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.



- TANNENBAUM, S. (1976). Ascorbic acid. In O. Fennema (Ed.), Principles of food science, Part I, Food Chemistry (2nd ed., pp. 477-544). New York: Marcel Dekker.
- TANNEBAUM, S.R., Archer, M.C., Young, V.R. (1985). Vitamins and minerals. In O.R. Fennema (ed.) Food Chemistry (2<sup>nd</sup> ed.) pp. 488-493. New York: Marcel Dekker, Inc.
- 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, 577-584.
- TAYLOR, M.J., Richardson, T. (1980). Antioxidant activity of skim milk: Effect of heat and resultant sulfhydryl groups. *Journal of Dairy Science*, 63, 1783-1795.
- TONG, L. M., Sasaki, S., McClements, D. J., Decker, E. A. (2000). Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1473-1478.
- TORREGROSA, F., Cortés, C., Esteve, M.J., Frígola, A. (2005). Effect of High-intensity pulsed electric fields processing and conventional heat treatment on orange-carrot juice carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9519-9525
- TORREGROSA, F., Esteve, M.J., Frígola, A., Cortés, C. (2006). Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. *Journal of Food Engineering*, 73, 339-345.
- 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.
- VEGA-MERCADO, H., Pothakamury, U.R., Chang, F., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1996). Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles. *Food Research International*, 29, 117-121.
- WALLACE, J.M.W., McCabe, A.J., Robson, P.J., Keogh, M.K., Murray, C.A., Kelly, P.M., Marquez-Ruiz, G., McClynn, H., Gilmore, W.S., Strain, J.J. (2000). Bioavailability of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in foods enriched with microencapsulated fish oil. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 44, 157-162.
- WANG, C.C., Chu, C.Y., Chu, J.O., Choy, K.W., Khaw, K.S., Rogers, M.S., & Pang, C.P. (2004). Trolox-equivalent antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma. *Clinical Chemistry*, 50, 952-954.
- WANG, H., Cao, G., & Prior, R.L. (1996). Total antioxidant capacity of fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 701-705.
- WEGRZYN, T.F., Farr, J.M., Hunter, D.C., Au, J., Wohlers, M.W., Skinner, M.A., Stanley, R.A., Sun-Waterhouse, D. (2008). Stability of antioxidants in an apple polyphenol-milk model system. *Food Chemistry*, 109, 310-318.
- WOUTERS, P.C., Alvarez, I., Raso, J. (2001). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric fields food processing. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 112-121.
- WU, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

- XU, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106, 545-551.
- YANO, M., Kato, M., Ikoma, Y., Kawasaki, A., Fukazawa, Y., Sugiura, M., Matsumoto, H., Oohara, Y., Nagao, A., Kazunori, O. (2005). Quantitation of carotenoids in raw and processed fruits in Japan. *Food Science and Technology Research*, 11, 13-18.
- YEOM, H.W., Streaker, C.B., Zhang, Q.H., Min, D.B. (2000). 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.
- ZEMEL, G.P., Sims, C.A., Marshall, M.R., Balaban, M. (1990). Low pH inactivation of polyphenoloxidase in apple juice. *Journal of Food Science*, 55, 562-563.
- ZHONG, K., Wu J., Wang, Z., Chen F., Liao, X., Hu, X., Zhenhua, Z. (2007). Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry*, 100, 115-123.

## **ANEXOS**

Anexo I. Análisis estadístico del estudio de almacenamiento.

Anexo II. Publicaciones.



### Anexo I. Análisis estadístico.

**Anexo I.a.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de retención de vitamina C ( $C/C_0$ ) en las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	0,924288	5	0,184858	151,01	0,0000
B:temperatura	0,067168	1	0,067168	54,87	0,0000
C:tratamiento	0,00187049	1	0,00187049	1,53	0,2251
INTERACTIONS					
AB	0,0191887	5	0,00383775	3,14	0,0201
AC	0,0110499	5	0,00220998	1,81	0,1390
BC	0,0203782	1	0,0203782	16,65	0,0003
RESIDUAL	0,0403968	33	0,00122415		
TOTAL (CORRECTED)	1,08899	51			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Anexo I.b.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de vitamina A de las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	0,228583	5	0,0457165	24,06	0,0000
B:temperatura	0,075157	1	0,075157	39,56	0,0000
C:tratamiento	0,012921	1	0,012921	6,80	0,0145
INTERACTIONS					
AB	0,0153739	5	0,00307478	1,62	0,1878
AC	0,022849	5	0,0045698	2,41	0,0619
BC	0,0000891553	1	0,0000891553	0,05	0,8301
RESIDUAL	0,0531991	28	0,00189997		
TOTAL (CORRECTED)	0,418392	46			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Anexo I.c.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los carotenoides totales de las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	50383,3	5	10076,7	31,74	0,0000
B:temperatura	2763,37	1	2763,37	8,70	0,0062
C:tratamiento	12487,8	1	12487,8	39,33	0,0000
INTERACTIONS					
AB	1686,43	5	337,286	1,06	0,4013
AC	1780,33	5	356,066	1,12	0,3710
BC	1295,01	1	1295,01	4,08	0,0528
RESIDUAL	9208,22	29	317,525		
TOTAL (CORRECTED)	79604,5	47			

**Anexo I.d.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los contenidos de fenoles solubles totales en las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	12407,3	5	2481,46	99,90	0,0000
B:temperatura	1330,04	1	1330,04	53,55	0,0000
C:tratamiento	245,3	1	245,3	9,88	0,0038
INTERACTIONS					
AB	766,099	5	153,22	6,17	0,0005
AC	2110,94	5	422,188	17,00	0,0000
BC	365,921	1	365,921	14,73	0,0006
RESIDUAL	720,336	29	24,8392		
TOTAL (CORRECTED)	17945,9	47			

**Anexo I.e.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de capacidad antioxidante (TEAC) de las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	37,1072	5	7,42144	218,49	0,0000
B:temperatura	0,00653	1	0,00653	0,19	0,6642
C:tratamiento	1,1907	1	1,1907	35,05	0,0000
INTERACTIONS					
AB	2,66374	5	0,532748	15,68	0,0000
AC	1,11872	5	0,223745	6,59	0,0003
BC	0,00213	1	0,002133	0,06	0,8039
RESIDUAL	0,98504	29	0,033967		
TOTAL (CORRECTED)	43,0741	47			

**Anexo I.f.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de capacidad antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>) de las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	116,891	5	23,3783	30,09	0,0000
B:temperatura	54,1784	1	54,1784	69,74	0,0000
C:tratamiento	8,08806	1	8,08806	10,41	0,0023
INTERACTIONS					
AB	81,4596	5	16,2919	20,97	0,0000
AC	9,05379	5	1,81076	2,33	0,0573
BC	7,64091	1	7,64091	9,84	0,0030
RESIDUAL	35,7368	46	0,776888		
TOTAL (CORRECTED)	325,759	64			

**Anexo I.g.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de pH de las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	0,062041	5	0,0124082	263,96	0,0000
B:temperatura	0,00014152	1	0,00014152	3,01	0,0906
C:tratamiento	0,00968538	1	0,00968538	206,03	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,00294104	5	0,000588208	12,51	0,0000
AC	0,00260771	5	0,000521541	11,09	0,0000
BC	0,000299415	1	0,000299415	6,37	0,0158
RESIDUAL	0,00183333	39	0,0000470085		
TOTAL (CORRECTED)	0,0817937	62			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Anexo I.h.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de °Brix de las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	38,1138	5	7,62276	7,01	0,0001
B:temperatura	57,4401	1	57,4401	52,83	0,0000
C:tratamiento	52,935	1	52,935	48,69	0,0000
INTERACTIONS					
AB	50,5194	5	10,1039	9,29	0,0000
AC	48,8289	5	9,76578	8,98	0,0000
BC	42,42	1	42,42	39,02	0,0000
RESIDUAL	44,5771	41	1,08725		
TOTAL (CORRECTED)	355,91	59			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Anexo I.i.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para el parámetro de color L\* en las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	18,0977	5	3,61954	12,95	0,0000
B:temperatura	7,96464	1	7,96464	28,50	0,0000
C:tratamiento	8,71142	1	8,71142	31,17	0,0000
INTERACTIONS					
AB	9,16432	5	1,83286	6,56	0,0000
AC	8,7692	5	1,75384	6,28	0,0001
BC	14,6843	1	14,6843	52,55	0,0000
RESIDUAL	21,7977	78	0,279457		
TOTAL (CORRECTED)	88,8189	96			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Anexo I.j.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para el parámetro de color a\* en las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	11,3806	5	2,27612	73,31	0,0000
B:temperatura	0,46072	1	0,46072	14,84	0,0002
C:tratamiento	9,99158	1	9,99158	321,82	0,0000
INTERACTIONS					
AB	2,01448	5	0,402895	12,98	0,0000
AC	1,33477	5	0,266954	8,60	0,0000
BC	0,0048489	1	0,0048489	0,16	0,6938
RESIDUAL	2,42168	78	0,0310472		
TOTAL (CORRECTED)	29,2904	96			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Anexo I.k.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para el parámetro de color b\* en las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	312,572	5	62,5145	129,79	0,0000
B:temperatura	0,924143	1	0,924143	1,92	0,1700
C:tratamiento	6,58231	1	6,58231	13,67	0,0004
INTERACTIONS					
AB	26,3968	5	5,27937	10,96	0,0000
AC	21,3305	5	4,2661	8,86	0,0000
BC	0,0163991	1	0,0163991	0,03	0,8541
RESIDUAL	37,5703	78	0,481671		
TOTAL (CORRECTED)	420,15	96			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

**Anexo I.l.** Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de HMF en las bebidas de zumo y leche almacenadas a 4 y 10°C.

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
MAIN EFFECTS					
A:tiempo	22,7954	5	4,55908	71,20	0,0000
B:temperatura	6,25685	1	6,25685	97,71	0,0000
C:tratamiento	12,2513	1	12,2513	191,32	0,0000
INTERACTIONS					
AB	2,43019	5	0,486037	7,59	0,0001
AC	2,27289	5	0,454577	7,10	0,0002
BC	0,0143521	1	0,0143521	0,22	0,6395
RESIDUAL	1,85704	29	0,0640357		
TOTAL (CORRECTED)	47,878	47			

All F-ratios are based on the residual mean square error.



## Anexo II. Publicaciones en revistas

Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109 (2007) 25–31 DOI 10.1002/ejlt.200600202

25

Ana Zulueta  
 María J. Esteve  
 Isabel Frasquet  
 Ana Frigola

Área de Nutrición y Bromatología,  
 Facultad de Farmacia,  
 Universitat de València,  
 Burjassot, Valencia, Spain

### Fatty acid profile changes during orange juice-milk beverage processing by high-pulsed electric field

High-intensity pulsed electric fields (HIPEF) is an emerging non-thermal food preservation technology which has the potential to pasteurize pumpable liquid foods. Its application is being studied to evaluate it as potential alternative or complementary process to thermal pasteurization. Orange juice-milk beverage with added bioactive components is a ready-to-drink beverage developed as an alternative to traditional soft drinks. In the present work, two HIPEF treatments (35 and 40 kV/cm) and six different treatment times (from 40 to 180  $\mu$ s) were evaluated to assess their effect on the fatty acid profile of an orange juice-milk beverage fortified with *n*-3 fatty acids and oleic acid. The effect of HIPEF treatment on various physicochemical properties of the beverages: pH, °Brix, hydroxymethylfurfural or peroxide index was also determined. After HIPEF treatment, non-significant changes in the contents of saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids or polyunsaturated fatty acids were observed. Neither peroxides nor intolerable levels of furfurals were detected. Only a small reduction in fat content ( $p < 0.05$ ) was found. In conclusion, HIPEF can be proposed as an alternative preservation technology due to these minimal changes which are negligible from the nutritional point of view.

**Keywords:** Fatty acids, orange juice-milk beverage, high-pulsed electric fields, *n*-3.

#### 1 Introduction

Cardiovascular disease (CVD) is one of the main causes of death in developed countries. The consumption of monounsaturated fatty acids (MUFA), especially oleic acid, has been shown to decrease plasma triacylglycerol and cholesterol concentrations in healthy normolipidaemic subjects [1, 2], and polyunsaturated fatty acids (PUFA) have been shown to reduce the risk of coronary heart disease [3] and cancer [4], to improve inflammatory conditions such as arthritis, to reduce plasma triacylglycerol levels and to lower blood pressure [5]. Consequently, PUFA and their derivatives and analogues are important nutraceutical and pharmaceutical targets [6] and are becoming of increasing nutritional interest. Because many populations do not attain the recommended weekly consumption of two to three portions of fish, which is one of the main sources of these fatty acids, alternative ways to ensure an optimal *n*-3 PUFA intake are needed. As a consequence, food products are being enriched with various sources of *n*-3 PUFA, especially of marine origin [7–9].

**Correspondence:** Ana Frigola, Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Avenida Vicent Andrés Estelés s/n, 46100 Burjassot (Valencia), Spain. Phone: +34 96 3544955, Fax: +34 96 3544954, e-mail: ana.frigola@uv.es

Market trends indicate that milk-based beverages are ideal vehicles for newly discovered bioactive food ingredients targeting lifestyle diseases. Among the recent trends, low-fat milk is commonly used for delivery of *n*-3 fatty acids. Drinks containing combinations of dairy and fruit juices with added bioactive components are becoming common in the US and EU markets [10, 11]. As recent studies have shown [12–14], the presence of *n*-3 PUFA-enriched foods on the market and the promotion of their consumption may significantly increase the level of *n*-3 PUFA intake.

Thermal processing is one of the methods by which appropriate foods are preserved and made available to the consumer. However, during thermal treatment, varying percentages of desirable food constituents are destroyed [15, 16]. Consequently, the food industry has been exploring innovative processing methods with minimal heat treatment to increase markets by improving the nutritional and flavor qualities. High-intensity pulsed electric fields (HIPEF) is an emerging non-thermal food preservation technology, which has the potential to pasteurize various foods non-thermally via their exposure to short high-intensity pulses while maintaining them between the electrodes of a treatment chamber [17–19]. The electric field affects the cell membranes [20] and may cause irreversible membrane breakage [21], alteration in transport of ions [22] and changes in enzyme structure [23]. HIPEF have demonstrated some advantages com-



© 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH &amp; Co. KGaA, Weinheim

www.ejlst.com

# Carotenoids and Color of Fruit Juice and Milk Beverage Mixtures

A. ZULUETA, M.J. ESTEVE, AND A. FRÍGOLA

**ABSTRACT:** Seventeen commercially available, "ready to drink" fortified beverages consisting of mixtures of fruit juices and milk were analyzed to evaluate their carotenoid profile (including their *Z/E* stereoisomers) and color during their commercial shelf life. Lightness ( $L^*$ ) was found to be correlated with the content of milk in the mixtures ( $r = 0.649$ ) whereas red-yellow colors were correlated with the contents of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, and  $\beta$ -carotene supplied by the fruit. The beverages stored under refrigeration ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ) showed higher luminosity ( $L^*$ ) and higher saturation of color ( $C^*$ ) and yellowness ( $b^*$ ). Differences ( $P < 0.05$ ) in the levels of carotenoids were found among the beverages. Common fruits such as apple, lemon, pear, strawberry, kiwifruit, pineapple, and banana were low in carotenoids. However, orange, apricot, mango, and peach contributed significantly ( $P < 0.05$ ) to increasing  $\beta$ -cryptoxanthin and  $\beta$ -carotene concentrations. Passion fruit supplied  $\zeta$ -carotene, and the presence of carrot increased the levels of  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene. Conversion of *all-E*  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin to their *Z* isomers took place in 8 of the 17 samples containing  $\alpha$ -carotene and in 9 of the 13 samples containing  $\beta$ -cryptoxanthin, respectively, which resulted in some loss of provitamin A activity and nutritional value.

**Keywords:** color, carotenoids, fruit juice–milk beverages, provitamin A, *Z/E* isomers

## Introduction

Current developments in new ready-to-drink beverages are based on drinks containing combinations of milk and fruit juices, which have been receiving considerable attention as their market potential is growing (Sharma 2005). Mixed fruit juice and milk beverages fortified with vitamins, minerals, and fibers are among the most widely consumed functional foods (Pszczola 2005). Consumption of these products has increased by 30% in Europe in the last 10 y (MAPA 2003). Despite the growing consumption of nutritional supplements (Kuzminski 1999) and fortified foods such as ATBG drinks (supplemented with vitamins A, C, and E as protective micronutrients) (Carle 1999; Marx and others 2000; Schieber and others 2002), little attention has so far been paid to the carotenoid stereoisomers present in these types of food and to the amounts that finally reach the consumer.

The importance of carotenoids is mainly based on their provitamin A activity and their antioxidant capacity (Britton 1995), although not all the carotenoids present in fruits and vegetables are precursors of vitamin A. Certain carotenoids, including  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene, and  $\beta$ -cryptoxanthin, have provitamin A activity, being transformed into retinol by mammals (Simpson and Chichester 1981). Carotenoids predominantly occur in the thermodynamically favored *all-E* isomers (Rodríguez-Amaya 2001). As they are highly unsaturated, the application of some industrial treatments leads to the formation of *Z* isomers, which do not possess the same provitamin activity as *E* isomers. Heat, light, oxygen, and the presence of electrophilic compounds are the factors that mostly cause degradation of carotenoids in foods (Dugave and Demange 2003).

The stability of carotenoids during their commercial shelf life is very important if the final product is to be attractive and acceptable. The isomerization and oxidation of carotenoids result in a loss

of color, which is one of the most important attributes related to quality affecting choice of purchase (Calvo and others 2001; Baker and Günter 2004). Color is, alongside freshness, one of the main criteria for food selection by the consumer. For this reason, colorings are added to many foods to make them appear healthier and more appealing. The objective of the present study was to evaluate the quality of commercial beverage mixtures of fruit juices and milk in terms of their total carotenoid content, provitamin A, and color.

## Materials and Methods

### Chemicals and reagents

$\beta$ -Carotene, lutein, and butylated hydroxytoluene (BHT) (special grade) were purchased from Sigma (Steinheim, Germany). Zeaxanthin was purchased from Fluka (Steinheim, Germany). Ammonium acetate (LC grade), petroleum ether, hexane (LC grade), potassium hydroxide (85%), and *tert*-butyl methyl ether (TBME) (LC grade) were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Magnesium hydroxide carbonate (40% to 45%) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain); ethanol, acetonitrile (special grade), diethyl ether, methanol, and sodium chloride (special grade) were purchased from Baker (Deventer, The Netherlands); and chloroform was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

### Samples

Two batches of 17 different juice–milk beverages made by 5 different manufacturers were purchased from a local supermarket (Valencia, Spain) and were coded as A, B, C, D, and E (same letter indicates same manufacturer). All of them were packaged in Tetra Brik cartons. Eleven of them had been processed by UHT and were kept in the supermarket at room temperature ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ), having a shelf life of up to 12 mo. Six of them (1A, 2A, 3A, 4A, 9B, 10B) had been processed by pasteurization and were kept under refrigeration ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ), having a shelf life of up to 2 mo as declared on the label by the producer. Table 1 gives the details (as indicated on

MS 20070168 Submitted 3/7/2007, Accepted 8/7/2007. Authors are with Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Univ. de Valencia, Ave. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot (Valencia), Spain. Direct inquiries to author Frígola (E-mail: ana.frigola@uv.es).

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Food Chemistry 103 (2007) 1365–1374

[www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain

Ana Zulueta, María J. Esteve, Isabel Frasquet, Ana Frígola\*

*Àrea de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n, 46100 Burjassot, Spain*

Received 23 December 2005; received in revised form 12 September 2006; accepted 23 October 2006

### Abstract

The growing interest in new functional foods with special characteristics and health properties has led to the development of new beverages based on fruit juice–skim milk mixtures. The proliferation of ready-to-drink beverages has caused the market to focus its interest on these products. Commercially conventionally pasteurized or sterilized beverages based on a mixture of fruit juice and skim milk were evaluated nutritionally for their concentrations of vitamin C, vitamin A and phenolic compounds and their total antioxidant capacity, taking the influence of physicochemical parameters into account. The main contribution to the total antioxidant capacity (TEAC, trolox equivalent antioxidant capacity) was provided by vitamin C, followed by phenolic compounds, in accordance with a mathematical equation obtained from the data:  $TEAC = -0.184 + 0.009 * [\text{vitamin A}] + 0.011 * [\text{phenolic compounds}] + 0.058 * [\text{vitamin C}]$ . The *R*-squared value was 86.88%. Citrus fruits, such as lemons or oranges, were the fruits associated with the greatest antioxidant capacity in the samples analysed.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Antioxidant capacity; Vitamin C; Phenolic compounds; Carotenoids; Vitamin A; Fruit juice and skim milk mixture beverages

### 1. Introduction

Reactive oxygen species (ROS) could be important causative agents of a great number of human diseases. Antioxidant components provide protection against harmful free radicals, which are produced by aerobic metabolism and have been strongly associated with reduced risk of chronic diseases, such as cardiovascular disease, cancer, diabetes, Alzheimer's disease, cataracts and age-related functional decline, in addition to other health benefits (Byers & Perry, 1992; Knekt et al., 2002; Liu et al., 2000; Martínez-González et al., 2002; Slaterry et al., 2000; Zhang, Taylor, Kramer, & Li, 1995).

Fruits and vegetables contain various bioactive compounds with antioxidant activities, such as vitamins A, C

and E, which have a high antioxidant capacity (Hassimoto, Genovese, & Lajolo, 2005; Sánchez-Moreno, Plaza, de Ancos, & Cano, 2006), and phenolic compounds, which recent studies have shown to be good contributors to the total antioxidant capacity of the foods that contain them (Cano, Plaza, Sánchez-Moreno, & de Ancos, 2003; Chovanalikit & Wrolstad, 2004; Dillard & German, 2000; Vinson, Su, Zubik, & Bose, 2001), although their nutritional relevance is uncertain because they may be poorly absorbed and rapidly metabolized and thus have limited antioxidant ability in vivo (Gardner, White, McPhail, & Duthie, 2000). It is important, therefore, to determine the total phenol content in order to evaluate the possible synergistic or antagonistic effect on their contribution to the total antioxidant capacity. Vitamin C is highly bioavailable and is therefore the most important water-soluble antioxidant in cells and an efficient scavenger of reactive oxygen species (Halliwell, 1996).

\* Corresponding author. Tel.: +34 9635 44955; fax: +34 9635 44954.  
E-mail address: [ana.frigola@uv.es](mailto:ana.frigola@uv.es) (A. Frígola).



Contents lists available at ScienceDirect

International Dairy Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/idairyj](http://www.elsevier.com/locate/idairyj)

## Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk

A. Zulueta<sup>a</sup>, A. Maurizi<sup>b</sup>, A. Frígola<sup>a</sup>, M.J. Esteve<sup>a</sup>, R. Coli<sup>b</sup>, G. Burini<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot, Spain

<sup>b</sup>Dipartimento di Medicina Interna, Sezione di Biochimica Applicata e Scienze della Nutrizione, Università degli Studi di Perugia, Via San Costanzo, 06126 Perugia, Italy

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 October 2008

Received in revised form

23 January 2009

Accepted 3 February 2009

### ABSTRACT

The total antioxidant capacity (hydrophilic plus lipophilic) of sixteen different commercial samples of pasteurized and ultra high temperature (UHT) treated milk was determined using the oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as a fluorescent probe. A significant correlation between the percentage of fat and the value of the total antioxidant capacity was found in milk samples obtained from the same batch of raw milk. Analyses of the whole milk, whey and deproteinized milk showed that the major contributor to the total antioxidant capacity of whole milk was the casein fractions, while albumin was the major contributor to the total antioxidant capacity of whey protein. Hydrophilic antioxidant compounds, such as vitamin C and uric acid, were the main contributors to the total antioxidant capacity of the deproteinized milk. Significant differences in total antioxidant capacities were found between whey and deproteinized samples obtained from pasteurized and UHT-treated milk, the values being higher for the former.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Some milk components possess antioxidant capacities that can be measured by different methods. The antioxidant properties of milk casein subunits ( $\alpha$ -casein,  $\beta$ -casein and  $\kappa$ -casein) have been evaluated in liposomal models (Cervato et al., 1999). All the subunits of casein are able to inhibit Fe-induced peroxidation of arachidonic acid inserted into multilamellar liposomes of dipalmitoylphosphatidylcholine; peroxidation was monitored by means of thiobarbituric reactive substances (TBARS). Not only do caseins have antioxidant capacity, but various authors (Díaz and Decker, 2004; Hernández-Ledesma et al., 2005; Kitts and Weiler, 2003; Rival et al., 2001b; Suetsuna et al., 2000) have shown that peptides obtained from caseins, using proteolytic enzymes (pepsin, trypsin), and from  $\beta$ -lactoglobulin (corolase PP) also have antioxidant properties.

The antioxidant mechanisms of whey proteins in a Tween 20-stabilized salmon oil-in-water emulsion were investigated by Tong et al. (2000). The antioxidant activity of the high molecular weight (HMW) fraction of whey from pasteurized milk increased with concentration, as determined by its ability to inhibit TBARS and lipid peroxide formation.

Non-enzymatic antioxidants, such as vitamin E, carotenoids and ubiquinol, act as radical scavengers in the lipid phase, whereas

vitamin C acts in the aqueous phase. Other antioxidants, such as some flavonoids, can react in both lipid and aqueous phases; they operate as radical scavengers and metal ion binders (Lindmark-Mansson and Akesson, 2000). These antioxidant components are active in preventing lipid peroxidation and maintaining milk quality, and may also be used as ingredients in foods and pharmaceuticals to provide products for enhancing consumer health.

Although data on the content of individual antioxidants in milk are available, there is a need to develop methods to investigate total milk antioxidant capacity without distinguishing the contributions from individual compounds. In previous studies, the total antioxidant capacity (TAC) of bovine milk, whey, and low molecular weight (LMW) fractions of whey were investigated using spectrophotometric methods, including a method based on the reduction of the cation radical of 2,2'-azobis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid] (ABTS<sup>•+</sup>; the ABTS method), a ferric reducing antioxidant power (FRAP) method and an amperometric method (Chen et al., 2003), but these authors claimed to use methods other than oxygen radical absorbance capacity (ORAC) to compare the data obtained.

ORAC is a hydrogen atom transfer (HAT) method which measures antioxidant scavenging activity against peroxyl radicals induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) at 37 °C. The ORAC assay is said to be more relevant because it utilizes a biologically relevant radical source (Prior et al., 2003). It is, to date, the only method that takes free radical action to completion and uses an area under curve (AUC) technique for quantifications,

\* Corresponding author. Tel.: +39 755857907; fax: +39 755857904.  
E-mail address: [gburini@unipg.it](mailto:gburini@unipg.it) (G. Burini).



Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchem](http://www.elsevier.com/locate/foodchem)

## Analytical Methods

## ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products

Ana Zulueta, Maria J. Esteve, Ana Frígola\*

Àrea de Nutrició i Bromatologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Avenida Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 15 April 2008

Received in revised form 18 July 2008

Accepted 11 September 2008

## Keywords:

ORAC

TEAC

Antioxidant capacity

Orange juice

Milk

Orange juice-milk beverages

## ABSTRACT

Oxygen radical antioxidant capacity (ORAC) and trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assays were compared to estimate the total antioxidant capacity (TAC) of orange juice, milk, and an orange juice-milk beverage. When the TEAC method was used with this beverage, an increase in the concentration of orange juice corresponded to an increase in TAC, but increasing the percentage of milk did not increase the TAC value. When the ORAC method was applied, it was seen that increased concentrations of juice or milk corresponded to greater antioxidant capacity. An evaluation was also made of the influence of certain compounds (ascorbic acid, gallic acid,  $\beta$ -carotene, lutein, zeaxanthin and albumin) with antioxidant capacity that were present in the samples studied.

Although the TEAC method is simpler and cheaper than the ORAC method, it gives an underestimate of the antioxidant capacity of foods or beverages of a more complex nature.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The measurement of the antioxidant capacity of food products is a matter of growing interest because it may provide a variety of information, such as resistance to oxidation, quantitative contribution of antioxidant substances, or the antioxidant activity that they may present inside the organism when ingested (Huang, Ou, & Prior, 2005; Serrano, Goñi, & Saura-Calixto, 2007).

Mixtures of fruit juices and milk are a type of beverage present in the market that has the advantage of offering a single product that contains vitamin C, carotenoids, and phenolic compounds (from the fruit), together with proteins and calcium (from the milk). Wu et al. (2004) reported that fruit provides the largest contributions of antioxidants in the diet, mainly because of its abundance of vitamins, phenolic compounds and carotenoids, while Pulido, Hernández-García, and Saura-Calixto (2003) calculated that fruit juices contribute (approximately 5–6%) to the total antioxidant capacity in the Spanish diet. On the other hand, various studies have shown that milk and some fractions of milk (whey, caseins, lactoferrin, albumin) have antioxidant activity (Chen, Lind-

mark-Mansson, Gorton, & Akesson, 2003; Peña-Ramos & Xiong, 2001; Rival, Boeriu, & Wichers, 2001), and recently a milk peptide has been identified (Trp-Tyr-Ser-Leu-Ala-Met-Ala-Ser-Asp-Ile) with an antioxidant capacity higher than that of butylated hydroxyanisole (BHA) (Hemández-Ledesma, Dávalos, Bartolomé, & Amigo, 2005).

Numerous *in vitro* studies have been conducted to evaluate the total antioxidant capacity (TAC) of food products. So far, however, there is no official standardised method, and therefore it is recommended that each evaluation should be made with various oxidation conditions and different methods of measurement (Frankel & Meyer, 2000). The methods for measuring antioxidant capacity are basically classified into two groups, depending on the reaction mechanism: methods based on hydrogen atom transfer (HAT) and methods based on electron transfer (ET) (Huang et al., 2005). The majority of HAT-based assays apply a competitive scheme, in which antioxidant and substrate compete for thermally generated peroxy radicals through the decomposition of azo-compounds. ET-based assays measure the capacity of an antioxidant in the reduction of an oxidant, which changes colour when reduced. The degree of colour change is correlated with the sample's antioxidant