

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT  
PÚBLICA

IMPACTO DEL USO DE TECNOLOGÍAS NO TÉRMICAS  
SOBRE DISTINTOS PARÁMETROS NUTRICIONALES Y DE  
CALIDAD EN ALIMENTOS LÍQUIDOS.

FRANCISCO JOSÉ BARBA ORELLANA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de maig de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Jordi Mañes Vinuesa
- Dr. Vincenzo Brandolini
- Dra. Dolores Rodrigo Aliaga
- Dra. Cristina Samaniego Sánchez
- Dra. Clara Cortés Fenollar

Va ser dirigida per:  
Dra. Ana Frígola Canoves  
Dra. M<sup>a</sup> Jose Esteve Mas

©Copyright: Servei de Publicacions  
Francisco José Barba Orellana

---

Dipòsit legal: V-480-2012  
I.S.B.N.: 978-84-370-8205-9

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Arts Gràfiques, 13 baix  
46010 València  
Spain  
Telèfon:(0034)963864115



VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

**FACULTAT DE FARMÀCIA**

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

**Impacto del uso de tecnologías no térmicas sobre  
distintos parámetros nutricionales y de  
calidad en alimentos líquidos**

**Non-thermal technologies impact on nutritional and  
quality parameters in liquid foods**

**TESIS DOCTORAL EUROPEA**

**Francisco José Barba Orellana**

Valencia, Marzo 2011

Dirigida por:

Dra. D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> José Esteve Mas

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

VNIVERSITAT (ò\*)  
E VALÈNCIA  
**Facultat de Farmàcia**

DEPARTAMENT DE MEDICINA PREVENTIVA I SALUT PÚBLICA,  
CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ, TOXICOLOGIA I MEDICINA LEGAL

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

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: el licenciado en Farmacia y en Ciencia y Tecnología de los Alimentos D. Francisco José Barba Orellana ha realizado, bajo su dirección y en los laboratorios del área, el trabajo que lleva por título: "Impacto del uso de tecnologías no térmicas sobre distintos parámetros nutricionales y de calidad en alimentos líquidos" para optar al Título de Doctor en Farmacia.

Y para que así conste, expiden y firman el presente certificado en Burjassot, a 29 de Marzo de 2011.

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

Fdo.: M<sup>a</sup> José Esteve Más

El doctorando Francisco José Barba Orellana ha disfrutado de una beca predoctoral de investigación FPI concedida por la Generalitat Valenciana.

La presente tesis doctoral europea se engloba en los siguientes proyectos de investigación:

- 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/Ali) “Evaluación del impacto de procesos mínimos de conservación, por PEAi 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).

Ha contado con la participación:

- Laboratorio de Procesos de Conservación, Departamento de Conservación y Calidad, Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, Centro Superior de Investigaciones Científicas, Valencia, España.
- Laboratorio di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Università di Ferrara, Ferrara, Italia.
- Laboratory of Food BioTechnology and Food Process Engineering, Technological University of Berlin, Berlin, Germany.
- Empresas:
  - Delimil S.A.
  - J. García Carrión S.A.
  - Grupo Leche Pascual S.L.

“La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio”.

Gregorio Marañón (1887-1960)

## Agradecimientos

“El que sabe corresponder a un favor recibido es un amigo que no tiene precio”.

*Sófocles*

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directoras, Dra. M<sup>a</sup> José Esteve y Dra. Ana Frígola su inestimable colaboración y rigor científico, ya que sin su labor no hubiera podido llevarse a cabo este trabajo. Por intentar entenderme, gracias por las sugerencias y recomendaciones.

Mi agradecimiento también a las doctoras y doctores presentes en el laboratorio actualmente o en algún momento de mi estancia y que han enriquecido mi formación a nivel científico y/o personal: Reyes Barberá, M<sup>a</sup> Jesús Lagarda, Amparo Alegría, Cristina Blasco, así como al resto del profesorado del área de Nutrición y Bromatología. También me gustaría guardar en el recuerdo a la Dra. Isabel Frasquet, de cuya presencia disfruté con brevedad, aunque su conocimiento dejó una huella inolvidable.

A todos los compañeros del laboratorio de toxicología, tanto doctores como no doctores.

Gracias al Dr. Jordi Mañes, por sus consejos y lo que es más importante, a nivel personal, por su apoyo en la realización del doctorado internacional, por su compañía y por haber compartido sus conocimientos de historia.

Grazie mille al Prof. Vincenzo Brandolini e la sua squadra del Laboratorio di Scienze Farmaceutiche della Università di Ferrara per la sua ospitalità. Grazie Dra. Tedeschi, Maietti, Krebs, Stagno e come no



Dra. Samaniego, per farmi sentire come a casa dal primo giorno che sono arrivato.

Thanks to Prof. Dietrich Knorr for its technical support and to give me the opportunity to keep in touch with non-thermal technologies. Special thanks are given to Nicolás and Henry my dearest colleagues in Department of Food BioTechnology and Food Process Engineering of Technological University of Berlin.

Mención aparte merecen mis compañeros de laboratorio, gracias por vuestros consejos y por vuestros ratos de ocio que se convirtieron en los míos, gracias por no cansaros de mí, o por lo menos por no decirlo. Gracias Toni, Ramón, Jaime, Clara, Ana, Vicente, Saraí, Marina, Laia, Moisés, M<sup>a</sup> José, Celia, Lourdes, Lupe y si me dejo a alguien no es de manera intencionada.

Gracias en especial a mi familia, no existen palabras para expresar mi gratitud, por haberme soportado, ayudado y lo que es más importante, por todo vuestro cariño y apoyo, sin vuestra ayuda hubiera sido imposible llegar hasta el final.

En el recuerdo, mis abuelos, seguro que allá dónde estéis, disfrutaréis de lo que he conseguido.

A Paco y a M<sup>a</sup> José, por ser las mejores personas del mundo y los mejores padres del universo.

A Sonia y a Jose, por ser la mejor hermana y el mejor cuñado.

A mi sobrinito.

A mis abuelos.

# INDICE

<b>INDICE</b> .....	<b>IX</b>
<b>INDICE DE CUADROS/ LIST OF TABLES</b> .....	<b>XII</b>
<b>INDICE DE FIGURAS/ LIST OF FIGURES</b> .....	<b>XVI</b>
<b>ABREVIATURAS/ ABBREVIATIONS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>XX</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>XXII</b>
<b>RESUM</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. CURRENT TRENDS IN THE CONSUMPTION OF FRUIT AND VEGETABLE JUICES</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN FRUIT AND VEGETABLE BEVERAGES</b> .....	<b>5</b>
1.2.1. <i>Ascorbic acid</i> .....	6
1.2.2. <i>Carotenoids</i> .....	7
1.2.3. <i>Phenolic compounds</i> .....	12
1.2.4. <i>Antioxidant capacity in fruit and vegetable beverages</i> .....	14
<b>1.3. NON-THERMAL TECHNOLOGIES</b> .....	<b>16</b>
1.3.1. <i>High Hydrostatic Pressure</i> .....	18
1.3.2. <i>Pulsed electric fields</i> .....	25
1.3.3. <i>Ultrasound</i> .....	31
<b>3. PLAN DE TRABAJO</b> .....	<b>39</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1. MUESTRAS</b> .....	<b>43</b>
4.1.1. <i>Zumo de naranja mezclado con leche</i> .....	43
4.1.2. <i>Bebida a base de vegetales</i> .....	43
4.1.3. <i>Zumo de arándanos</i> .....	44
4.1.4. <i>Zumos de frutas mezclados con leche comerciales</i> .....	44
4.1.5. <i>Bebidas a base de vegetales comerciales</i> .....	45

<b>4.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PARA ESTIMAR LA CALIDAD DE LOS ALIMENTOS .....</b>	<b>48</b>
4.2.1. <i>Enzimas y microorganismos .....</i>	48
4.2.1.1. <i>Peroxidasa .....</i>	48
4.2.1.2. <i>Lactobacillus plantarum .....</i>	49
4.2.1.3. <i>Pseudomonas fluorescens .....</i>	49
4.2.2. <i>Parámetros fisicoquímicos .....</i>	49
4.2.2.1. <i>pH .....</i>	49
4.2.2.2. <i>Sólidos solubles .....</i>	49
4.2.2.3. <i>Densidad .....</i>	49
4.2.2.4. <i>Color .....</i>	50
4.2.2.5. <i>Índice de turbidez .....</i>	51
4.2.2.6. <i>Índice de pardeamiento .....</i>	51
4.2.3. <i>Compuestos bioactivos .....</i>	52
4.2.3.1. <i>Ácido ascórbico .....</i>	52
4.2.3.2. <i>Carotenoides totales .....</i>	56
4.2.3.3. <i>Fenoles solubles totales .....</i>	57
4.2.3.4. <i>Antocianinas .....</i>	58
4.2.3.5. <i>Vitaminas liposolubles .....</i>	59
4.2.4. <i>Capacidad antioxidante total .....</i>	69
4.2.4.1. <i>Método TEAC .....</i>	69
4.2.4.2. <i>Método DPPH .....</i>	70
4.2.4.3. <i>Método ORAC .....</i>	72
4.2.4.4. <i>Fotoquimioluminiscencia .....</i>	74
4.2.4.5. <i>Comparación de los métodos aplicados para la determinación de capacidad antioxidante total .....</i>	76
4.2.5. <i>Grasa y perfil de ácidos grasos .....</i>	85
4.2.6. <i>Índice de desintegración celular .....</i>	86
<b>4.3. ZUMOS DE FRUTAS MEZCLADOS CON LECHE. ....</b>	<b>88</b>
4.3.1. <i>Caracterización de muestras comerciales a base de zumo de frutas con leche .....</i>	88
4.3.1.1. <i>Parámetros fisicoquímicos .....</i>	88
4.3.1.2. <i>Ácido ascórbico .....</i>	92
4.3.1.3. <i>Compuestos fenólicos .....</i>	92
4.3.1.4. <i>Carotenoides totales .....</i>	93

4.3.1.5. Capacidad antioxidante .....	96
4.3.2. Impacto del uso de tecnologías no térmicas y térmicas en la conservación de los parámetros nutricionales y de calidad fisicoquímica de una bebida a base de zumo de naranja y leche .....	104
4.3.2.1. Efecto de las APH y del tratamiento térmico .....	104
4.3.2.2. Estudio comparativo del efecto de APH, PEAI y ultrasonidos en la inactivación microbiana y los parámetros nutricionales y de calidad. ...	121
<b>4.4. BEBIDA A BASE DE VEGETALES.....</b>	<b>131</b>
4.4.1. Caracterización físico-química y nutricional de bebidas a base de vegetales comerciales. ....	131
4.4.1.1. Parámetros fisicoquímicos .....	131
4.4.1.2. Ácido ascórbico .....	134
4.4.1.3. Compuestos fenólicos.....	134
4.4.1.4. Carotenoides totales .....	135
4.4.1.5. Capacidad antioxidante .....	138
4.4.1.6. Grasa y perfil ácidos grasos.....	141
4.4.2. Preparación y caracterización de una nueva bebida de vegetales ...	146
4.4.3. Efecto de las APH sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de la bebida a base de vegetales. ....	150
<b>4.5. EFECTO DE LAS APH EN EL ZUMO DE NARANJA CON LECHE Y EN LA BEBIDA A BASE DE VEGETALES. ....</b>	<b>163</b>
<b>4.6. ARÁNDANOS.....</b>	<b>168</b>
4.6.1. Zumo de arándanos.....	168
4.6.2. Extracción de compuestos bioactivos en arándanos por diferentes tecnologías. ....	174
<b>4.7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS Y SITUACIÓN ACTUAL DEL TEMA.....</b>	<b>187</b>
<b>5. CONCLUSIONS.....</b>	<b>215</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>226</b>
<b>PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....</b>	<b>i</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>xiv</b>

## INDICE DE CUADROS/ LIST OF TABLES

<i>Table n° 1. Distinctive characteristics of the various preservation treatments .....</i>	<i>17</i>
<i>Table n° 2. Recently marketed foodstuffs treated by HHP .....</i>	<i>21</i>
<i>Cuadro n° 3. Composición de las bebidas de zumo y leche comerciales ...</i>	<i>46</i>
<i>Cuadro n° 4. Composición de las bebidas a base de vegetales comerciales .....</i>	<i>47</i>
<i>Cuadro n° 5. Tiempos de retención de acuerdo a la columna y flujo de fase móvil utilizados (mL/min) .....</i>	<i>64</i>
<i>Cuadro n° 6. Límites de detección y cuantificación y linealidad del método cromatográfico para la determinación de vitaminas liposolubles .....</i>	<i>66</i>
<i>Cuadro n° 7. Precisión instrumental, precisión del método y exactitud para las diferentes muestras analizadas .....</i>	<i>67</i>
<i>Cuadro n° 8. Cuantificación de las vitaminas liposolubles para diferentes muestras comerciales .....</i>	<i>68</i>
<i>Cuadro n° 9. Linealidad .....</i>	<i>79</i>
<i>Cuadro n° 10. Intervalo de linealidad según la matriz, la dilución y el método aplicado .....</i>	<i>79</i>
<i>Cuadro n° 11. Sensibilidad .....</i>	<i>80</i>
<i>Cuadro n° 12. Precisión instrumental y del método de la bebida de vegetales .....</i>	<i>80</i>
<i>Cuadro n° 13. Precisión instrumental y del método de la bebida mezcla de zumo de naranja y leche .....</i>	<i>81</i>
<i>Cuadro n° 14. Comparación de la precisión entre los diferentes métodos aplicados para la determinación de la capacidad antioxidante .....</i>	<i>82</i>
<i>Cuadro n° 15. Comparación de la exactitud (<math>d/(s'_a/n^{1/2})</math>) entre los diferentes métodos aplicados para la determinación de la capacidad antioxidante .....</i>	<i>83</i>
<i>Cuadro n° 16. Exactitud para la bebida mezcla de vegetales .....</i>	<i>84</i>
<i>Cuadro n° 17. Exactitud para la bebida mezcla de zumo de naranja y leche .....</i>	<i>84</i>
<i>Cuadro n° 18. Parámetros fisicoquímicos de las bebidas de zumo y leche comerciales analizadas .....</i>	<i>89</i>
<i>Cuadro n° 19. Parámetros de color de las bebidas de zumo y leche comerciales .....</i>	<i>91</i>

<i>Cuadro n° 20. Concentración de compuestos antioxidantes en bebidas de zumo y leche comerciales .....</i>	<i>93</i>
<i>Cuadro n° 21. Capacidad antioxidante total de las bebidas de zumo y leche comerciales analizadas .....</i>	<i>97</i>
<i>Cuadro n° 22. Coeficiente de correlación entre las frutas de las bebidas comerciales y la capacidad antioxidante total .....</i>	<i>98</i>
<i>Cuadro n° 23. Contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante .....</i>	<i>99</i>
<i>Cuadro n° 24. Valores de índice de turbidez e índice de pardeamiento de la bebida de zumo de naranja mezclada con leche tratada por APH y tratamiento térmico .....</i>	<i>106</i>
<i>Cuadro n° 25. Valores de a*, b* y L* de la bebida de zumo de naranja mezclado con leche tratada por APH y tratamiento térmico .....</i>	<i>108</i>
<i>Cuadro n° 26. Valores de Chroma, h<sup>o</sup> e ΔE de la bebida de zumo de naranja mezclado con leche tratada por APH y tratamiento térmico .....</i>	<i>110</i>
<i>Cuadro n° 27. Concentración de varios compuestos antioxidantes de la bebida de zumo de naranja mezclada con leche tratada por APH y tratamiento térmico .....</i>	<i>112</i>
<i>Cuadro n° 28. Valores de capacidad antioxidante total de la bebida de zumo de naranja mezclado con leche tratada por APH y por tratamiento térmico .....</i>	<i>116</i>
<i>Cuadro n° 29. Concentraciones de vitamina E (μg/100mL) en zumo de naranja mezclado con leche sin tratar, tratado térmicamente y por APH .....</i>	<i>118</i>
<i>Cuadro n° 30. Perfil de ácidos grasos en zumo de naranja mezclado con leche sin tratar y tras aplicar tratamiento térmico .....</i>	<i>119</i>
<i>Cuadro n° 31. Perfil de ácidos grasos en zumo de naranja mezclado con leche sin tratar y tras aplicar APH .....</i>	<i>120</i>
<i>Cuadro n° 32. Valores de compuestos antioxidantes en la bebida de zumo de naranja leche tratada por APH a diferentes presiones y tiempos .....</i>	<i>128</i>
<i>Cuadro n° 33. Valores de compuestos antioxidantes en la bebida de zumo de naranja leche tratada por PEAI a diferentes campos eléctricos y tiempos .....</i>	<i>129</i>
<i>Cuadro n° 34. Valores de compuestos antioxidantes en la bebida de zumo de naranja leche tratada por ultrasonidos a diferentes amplitudes y tiempos .....</i>	<i>130</i>
<i>Cuadro n° 35. Parámetros fisicoquímicos de las bebidas de vegetales ....</i>	<i>132</i>

<i>Cuadro n° 36. Parámetros de color de las bebidas de vegetales comerciales analizadas .</i>	<i>133</i>
<i>Cuadro n° 37. Concentración de compuestos fenólicos totales y carotenoides totales de las bebidas de vegetales comerciales analizadas</i>	<i>135</i>
<i>Cuadro n° 38. Capacidad antioxidante total de las bebidas de vegetales comerciales analizadas .</i>	<i>138</i>
<i>Cuadro n° 39. Contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante</i>	<i>139</i>
<i>Cuadro n° 40. Ácidos grasos saturados (%) de las muestras analizadas</i>	<i>142</i>
<i>Cuadro n° 41. Ácidos grasos monoinsaturados (%) de las muestras analizadas</i>	<i>144</i>
<i>Cuadro n° 42. Ácidos grasos poliinsaturados (%) de las muestras analizadas</i>	<i>145</i>
<i>Cuadro n° 43. Contenido en compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de distintos vegetales .</i>	<i>149</i>
<i>Cuadro n° 44. Concentración de varios compuestos antioxidantes de la bebida de vegetales sin tratar, tratada por APH y por tratamiento térmico.</i>	<i>151</i>
<i>Cuadro n° 45. Valores de capacidad antioxidante total determinada por los métodos TEAC y ORAC de la bebida de vegetales sin tratar, tratada por APH y por tratamiento térmico</i>	<i>153</i>
<i>Cuadro n° 46. Valores de a*, b* y L* de una bebida de vegetales sin tratar, tratada por APH y por tratamiento térmico</i>	<i>154</i>
<i>Cuadro n° 47. Chroma, h<sup>o</sup> e ΔE de la bebida de vegetales sin tratar, tratada por APH y por tratamiento térmico</i>	<i>156</i>
<i>Cuadro n° 48. Coeficientes de las funciones discriminantes para los diferentes compuestos bioactivos y parámetros fisicoquímicos estudiados.</i>	<i>157</i>
<i>Cuadro n° 49. Concentraciones de vitamina E (μg/100mL) en bebida a base de vegetales sin tratar, tratado térmicamente y por APH</i>	<i>160</i>
<i>Cuadro n° 50. Contenido en grasa y perfil de ácidos grasos en la bebida de vegetales sin tratar y tratada térmicamente</i>	<i>161</i>
<i>Cuadro n° 51. Contenido en grasa y perfil de ácidos grasos en la bebida de vegetales sin tratar y tratada por APH</i>	<i>161</i>
<i>Cuadro n° 52. Concentraciones de diversos compuestos antioxidantes en zumo de arándanos tratado por APH</i>	<i>168</i>



<i>Cuadro n° 53. Valores de <math>a^*</math>, <math>b^*</math>, <math>L^*</math> e <math>\Delta E</math> en zumo de arándanos tratado por APH .....</i>	<i>171</i>
<i>Cuadro n° 54. Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes estadísticamente significativas (<math>p &lt; 0.05</math>) .....</i>	<i>173</i>

## INDICE DE FIGURAS/ LIST OF FIGURES

<i>Figure n° 1. Chemical structure of ascorbic acid and its derivatives .....</i>	<i>6</i>
<i>Figure n° 2. Structures of carotenoids: carotenes and xanthophylls .....</i>	<i>9</i>
<i>Figure n° 3. Classification and structure of polyphenols in foods .....</i>	<i>13</i>
<i>Figure n° 4. Evolution of the commonest preservation methods .....</i>	<i>17</i>
<i>Figure n° 5. HHP units located at (a) the Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA, CSIC), Spain, (b) Berlin Technical University, Germany, and (c) NC Hyperbaric, Spain .....</i>	<i>18</i>
<i>Figure n° 6. Examples of (a) a direct system and (b) an indirect system ..</i>	<i>19</i>
<i>Figure n° 7. Use of HHP for food preservation in different segments of the food industry .....</i>	<i>22</i>
<i>Figure n° 8. Diagram of a PEF system for food processing .....</i>	<i>26</i>
<i>Figure n° 9. 1) OSU 4D PEF continuous equipment located at the Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos (IATA, CSIC) and 2) PEF batches equipment located at the Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering, Berlin Technical University .....</i>	<i>27</i>
<i>Figure n° 10. Configurations of treatment chambers for PEF treatment: a) static/continuous parallel plate, b) continuous coaxial, and c) contiguous co-linear configuration .....</i>	<i>28</i>
<i>Figure n° 11. Ultrasound unit: 1) ultrasound transducer; 2) ultrasound generator; 3) ultrasound probe (19 mm); 4) data recorder; 5) temperature sensor; 6) cooling jacket; 7) computer; 8) water inlet; 9) water outlet; h) depth of the zone in the sample (25 mm) .....</i>	<i>33</i>
<i>Figura n° 12. Diagrama de color CIELab .....</i>	<i>50</i>
<i>Figura n° 13. Diagrama de extracción de las vitaminas liposolubles .....</i>	<i>63</i>
<i>Figura n° 14. Cromatogramas de una muestra de leche enriquecida con vitaminas A, D y E (a); una fórmula infantil enriquecida con vitaminas A, D y E (b); una muestra comercial de zumo de frutas mezclado con leche enriquecido con vitaminas A, D y E (c) y una muestra comercial de una bebida a base de vegetales (d). (1) delta tocoferol, (2) ergocalciferol, (3) colecalciferol, (4) gamma tocoferol, (5) alfa tocoferol .....</i>	<i>65</i>
<i>Figura n° 15. Posición de las bebidas de zumo con leche en el plano a*b* .....</i>	<i>95</i>
<i>Figura n° 16. Correlación entre los valores de capacidad antioxidante en los diferentes métodos de medida .....</i>	<i>100</i>

<i>Figura n° 17. Efecto de la presión y tiempo de tratamiento sobre los parámetros de color a*, b*, L* y Chroma</i> .....	109
<i>Figura n° 18. Efecto de la presión y tiempo de tratamiento sobre ácido ascórbico</i> .....	113
<i>Figura n° 19. Efecto de la presión y tiempo de tratamiento sobre los compuestos fenólicos</i> .....	114
<i>Figura n° 20. Efecto de la presión y tiempo de tratamiento sobre los carotenoides totales</i> .....	115
<i>Figura n° 21. Requerimientos de energía eléctrica para la inactivación de a) Pseudomonas fluorescens y b) Lactobacillus plantarum en una bebida a base de zumo de naranja mezclado con leche a dos campos eléctricos de 27 y 40 kV/cm</i> .....	126
<i>Figura n° 22. Requerimiento de energía eléctrica para la inactivación de Pseudomonas fluorescens en zumo de naranja mezclado con leche tratado por ultrasonidos con 2 amplitudes diferentes de 135 y 163.4 <math>\mu</math>m</i> .....	127
<i>Figura n° 23. Posición de las bebidas de vegetales en el plano a*b*</i> .....	137
<i>Figura n° 24. Correlación entre los valores de capacidad antioxidante en los diferentes métodos de medida</i> .....	140
<i>Figura n° 25. Actividad peroxidásica residual en diferentes vegetales durante el escaldado</i> .....	147
<i>Figura n° 26. Concentración remanente de ácido ascórbico en diferentes vegetales durante el escaldado</i> .....	148
<i>Figura n° 27. Correlación entre los valores de TEAC y ORAC en la bebida a base de vegetales procesada por APH</i> .....	152
<i>Figura n° 28. Principales componentes de una bebida de vegetales no tratada, procesada por APH y térmicamente (TC: carotenoides totales; TP: fenoles solubles totales; TI: índice de turbidez; C: Chroma; BI: índice de pardeamiento; AA: ácido ascórbico)</i> .....	158
<i>Figura n° 29. Funciones discriminantes para los diferentes tratamientos aplicados en la bebida de vegetales</i> .....	159
<i>Figura n° 30. Capacidad antioxidante (TEAC): interacciones</i> .....	165
<i>Figura n° 31. Capacidad antioxidante (ORAC): interacciones</i> .....	165
<i>Figura n° 32. Degradación de ácido ascórbico en las bebidas</i> .....	166
<i>Figura n° 33. Parámetro de color a*: interacciones</i> .....	167
<i>Figura n° 34. <math>\Delta E</math>: interacciones</i> .....	167
<i>Figura n° 35. Variación de ácido ascórbico en zumo de arándanos en función de la presión y el tiempo de tratamiento aplicados</i> .....	170

<i>Figura n° 36. Influencia de la presión y el tiempo de tratamiento sobre el parámetro L* en zumo de arándanos .....</i>	<i>172</i>
<i>Figura n° 37. Funciones discriminantes para los diferentes tratamientos aplicados en un zumo de arándanos .....</i>	<i>173</i>
<i>Figura n° 38. Valores de CDI tras aplicar los distintos tratamiento estudiados (calor, APH, PEAI y US) .....</i>	<i>178</i>
<i>Figura n° 39. Extracción de compuestos antioxidantes tras aplicar tratamiento térmico: con 1) mezcla A, 2) mezcla B .....</i>	<i>180</i>
<i>Figura n° 40. Extracción compuestos antioxidantes tras aplicar APH: con 1) mezcla A, 2) mezcla B .....</i>	<i>182</i>
<i>Figura n° 41. Extracción compuestos antioxidantes tras aplicar PEAI: con 1) mezcla A, 2) mezcla B .....</i>	<i>184</i>
<i>Figura n° 42. Extracción compuestos antioxidantes tras aplicar ultrasonidos: con 1) mezcla A, 2) mezcla B .....</i>	<i>186</i>

## ABREVIATURAS/ ABBREVIATIONS

AA, ácido ascórbico/ ascorbic acid
ACL, capacidad antioxidante lipofílica/ lipophilic antioxidant capacity
ACW, capacidad antioxidante hidrosoluble/ hydrophilic antioxidant capacity
AGMI, ácidos grasos monoinsaturados/ monounsaturated fatty acids
AGPI, ácidos grasos poliinsaturados/ polyunsaturated fatty acids
AGS, ácidos grasos saturados/ saturated fatty acids
APH, altas presiones hidrostáticas/ high hydrostatic pressure
AT, antocianinas totales/ total anthocyanins
AUC, área bajo la curva/ area under curve
BHT, butilhidroxitolueno/ butylhydroxytoluene
BV, bebida de vegetales/ vegetable beverage
CLAR, cromatografía líquida alta resolución/ high performance liquid chromatography
CT, carotenoides totales/ total carotenoids
DHA, ácido docosahexaenoico/ docosahexaenoic acid
EPA, ácido eicosapentaenoico/ eicosapentaenoic acid
FL, fluoresceína/ fluorescein
FST, fenoles solubles totales/ total phenolic soluble compounds
GAE, equivalentes de ácido gálico/ gallic acid equivalents
HHP, altas presiones hidrostáticas/ high hydrostatic pressure
IAC, capacidad antioxidante integral/ integral antioxidant capacity
IF, intensidad de fluorescencia/ fluorescence intensity
IU, unidades internacionales/ international units
IP, índice de pardeamiento/ browning index
IT, índice de turbidez/ turbidity index
LOQ, límite de cuantificación/ quantification limit
LOD, límite de detección/ detection limit
MUFA, ácidos grasos monoinsaturados/ monounsaturated fatty acids
ND, no detectable/ non detectable
ORAC, capacidad antioxidante radical oxígeno/ oxygen radical antioxidant capacity
PCL, fotoquimioluminiscencia/ photochemiluminescence
PEAI, pulsos eléctricos de alta intensidad/ high intensity pulsed electric fields
PEF, pulsos eléctricos/ pulsed electric fields
PUFA, ácidos grasos poliinsaturados/ polyunsaturated fatty acids
RAE, equivalentes actividad retinol/ retinol activity equivalents
RDA, recomendaciones dietéticas/ recommended dietary allowances
RDI, recomendaciones de ingesta diarias/ recommended daily intake
RSD, desviación estándar relativa/ relative standard deviation
SFA, ácidos grasos saturados/ saturated fatty acids
T <sup>ª</sup> , temperatura/ temperature
TE, equivalentes de trolox/ trolox equivalent
TEAC, capacidad antioxidante trolox equivalente/ trolox equivalent antioxidant capacity
TRAP, capacidad antioxidante reductora total/ total reducing antioxidant power
US, ultrasonidos/ ultrasounds
USA, Estados Unidos de América/ United States of America
ZNL, zumo de naranja mezclado con leche/ orange juice mixed with milk

## RESUMEN

En la última década han aparecido en el mercado español nuevos productos basados en mezclas de zumos de frutas y leche así como bebidas mezclas de vegetales, que presentan una buena aceptación por parte del consumidor y con un gran valor nutricional, debido en gran parte a su alto contenido en compuestos bioactivos así como capacidad antioxidante.

Tradicionalmente los alimentos líquidos como zumos de fruta y/o vegetales, así como la leche, han sido conservados mediante técnicas por calor como la esterilización. Sin embargo estos procesos pueden provocar una pérdida de compuestos responsables de la calidad organoléptica y nutricional de los alimentos.

Actualmente existe una demanda creciente por parte del consumidor de alimentos mínimamente procesados y que a la vez sean seguros desde el punto de vista microbiológico, hecho que está impulsando el desarrollo de nuevos métodos de conservación. Procesos no térmicos como las altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos de alta intensidad y ultrasonidos, pueden utilizarse con este objetivo sin que se vea afectada la calidad de los alimentos. Aunque la eficacia de estos tratamientos se conoce para obtener alimentos seguros, es ahora cuando se están produciendo los mayores avances tecnológicos para hacer posible su comercialización.

En la presente tesis doctoral, el objetivo principal es establecer las condiciones de procesado no térmico para obtener bebidas con un alto contenido en compuestos bioactivos así como capacidad antioxidante.

Además se comparan los efectos de estos tratamientos sobre las características nutricionales y organolépticas con los que se producen tras la aplicación de un tratamiento térmico tradicional.

Posteriormente, se estudia el grado de permeabilidad de las membranas celulares de arándanos utilizando la medida de la

impedancia, para optimizar los parámetros del procesamiento y poder utilizar los tratamientos térmicos y no térmicos en la extracción de compuestos bioactivos con capacidad antioxidante.

## SUMMARY

In the last decade have appeared in the Spanish market new products based on mixtures of fruit juices and milk as well as beverages mixtures of fruit and/or vegetables, which have a good acceptance by consumers and with a high nutritional value largely due to its high content in bioactive compounds as well as antioxidant capacity.

Traditionally, liquid food such as fruit and/or vegetables juices, as well as milk, have been preserved by thermal treatment such as pasteurization and sterilization. However these processes can cause loss of compounds responsible for the organoleptic and nutritional quality of food.

Currently there is a growing demand by the consumer for minimally processed food and which in turn are safe from the microbiological point of view, a fact that is driving the development of new conservation methods. Nonthermal processes such as high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound, which can be used with this goal without affecting the quality of food. Although the effectiveness of these treatments is known for safe food, is now when is possible to produce the greater technological advances for it to marketing.

In the present doctoral thesis, the main objective is to establish the conditions of nonthermal processing to obtain beverages with a high content in bioactive compounds as well as antioxidant capacity. In addition it is important to compare the effects of these treatments on the organoleptic and nutritional characteristics, with those occurring after the implementation of a traditional heat treatment.

Subsequently, also it was studied the degree of permeability of the cell membranes of blueberries using the extent of the impedance, to optimize the parameters of processing and use thermal and nonthermal processing in the extraction of bioactive compounds with antioxidant capacity.



## RESUM

En l'última dècada han aparegut al mercat espanyol nous productes basats en mescles de suc de fruites i llet així com mescles de fruites i/o vegetals, que presenten una bona acceptació per part del consumidor i amb un gran valor nutricional degut en gran part al seu alt contingut en compostos bioactius així com capacitat antioxidant.

Tradicionalment els aliments líquids com els suc de fruita i/o vegetals, així com la llet, han sigut conservats per mitjà de tècniques per calor com l'esterilització. No obstant això, estos processos poden provocar una pèrdua de compostos responsables de la qualitat organolèptica i nutricional dels aliments.

Actualment hi ha una demanda creixent per part del consumidor d'aliments mínimament processats i que al mateix temps siguen segurs des del punt de vista microbiològic, fet que està impulsant el desenvolupament de nous mètodes de conservació. Processos no tèrmics com les altes pressions hidrostàtiques, polsos elèctrics d'alta intensitat i ultrasons, poden utilitzar-se amb este objectiu sense que es veja afectada la qualitat dels aliments. Encara que l'eficàcia d'estos tractaments es coneix per a obtindre aliments segurs, és ara quan s'estan produïnt els majors avanços tecnològics per a fer possible la seua comercialització.

En la present tesi doctoral, l'objectiu principal és establir les condicions de processat no tèrmic per a obtindre begudes amb un alt contingut en compostos bioactius així com capacitat antioxidant. A més es comparen els efectes d'estos tractaments sobre les característiques nutricionals i organolèptiques, amb els quals es produïxen després de l'aplicació d'un tractament tèrmic tradicional.

Posteriorment, s'estudia el grau de permeabilitat de les membranes cel·lulars de nabius utilitzant la mesura de la impedància, per a optimitzar els paràmetres del processament i poder utilitzar els

tractaments tèrmics i no tèrmics en l'extracció de compostos bioactius amb capacitat antioxidant.

# 1. INTRODUCTION

---

## INTRODUCCIÓN

## **1-INTRODUCTION**

### **1.1. CURRENT TRENDS IN THE CONSUMPTION OF FRUIT AND VEGETABLE JUICES**

Fruit and vegetables form part of one of the most important current food patterns, the Mediterranean Diet, which is considered all over the world as being one of the most beneficial diets for the health, as well as being pleasurable and complying with the recommendations of nutrition specialists who recommend a daily intake of about 400 g (WHO, 2003) of fruit and vegetables, equivalent to the consumption of 5 portions, either fresh or in the form of juices or derived products.

There is a preference for locally grown fresh foods, in season and minimally processed (which is likely to optimise their content of nutrients and bioactive compounds) (Plaza et al., 2006).

In recent years there has been a change in food consumption trends, basically due to a change in lifestyle. According to data published by the *Food Consumption Panel* (MARM, 2008), per capita consumption of fresh vegetables in 2007 was 57.1 kg, while per capita consumption of fresh fruit was 94.3 kg. This represents a mean of 156 grams of vegetables and 258 grams of fresh fruit per person per day. In the year 2000 the figures for mean consumption were 300 and 278 grams per person per day, respectively. Spain is one of the European countries in which consumption of these products is highest, yet consumption of fruit and vegetables is declining, with consequent nutritional repercussions, since fruit and vegetables are an important source of vitamins (C, A, B<sub>6</sub>, thiamine, niacin and E), minerals (magnesium, iodine, etc.) and dietary fibre (Kader, 2001). However, in Spain the recommended intake of fruit and vegetables is attained if consumption of fresh or processed juices is taken into account.

According to the figures for consumption in Spain, 2% of the total foods consumed are products derived from fruit and vegetables, and this figure includes juices. The evolution of food consumption in Spain between 2006 and 2007 reflects the fact that fruit juices have experienced an increase of 5% (MAPA, 2007). According to the Canadian Wisdom Annual Series (2008), consumption of juices in this country is 28.6 litres per inhabitant per year, similar to the consumption in Austria (29.7 litres) and much higher than in other countries such as France (25.3 litres), the United Kingdom (24.7 litres), Belgium (22.4 litres) and Italy (14.6 litres), but lower than in Germany (33.5 litres), Finland (32.1 litres) and the United States (30 litres).

Although there is an abundance of low-cost fruits and vegetables available in shops and supermarkets, persuading the general public to consume more fruits and vegetables has so far proved to be a difficult task. Although it is widely believed that a healthier diet is good for you, most people, especially those with a busy lifestyle, would rather take a quick fix in the form of a supplement or pill. Evidence is emerging, however, which suggests that fruit and vegetable juices may be a more effective alternative (Mullen et al., 2007), and a recent review has concluded that drinking fruit and vegetable juices may well be as effective as consuming whole fruits and vegetables with regard to reducing the risk of chronic disease (Ruxton et al., 2006). Furthermore, the *Kame* Project, conducted with Japanese-Americans between 1992 and 2001, found that subjects with a higher intake of fruit and vegetable juices had a substantially reduced incidence of Alzheimer's disease (Dai et al., 2006).

Proportionally, the new functional juices, without sugar and/or obtained from exotic fruits, are the group that is growing most. Food products marketed in Spain also include milk beverages, alone or combined with fruits and vegetables, which enjoy great consumer acceptance and may be a good alternative to satisfy recommendations to

## Introduction

---

increase consumption of fruits and/or vegetables and to acquire the health benefits derived from their high content of bioactive compounds (Sánchez-Moreno et al., 2006; Sorensen et al., 1999; Davey et al., 2000). They are also a good vehicle for intake of vitamins, proteins and minerals (Pszczola, 2005).

Both in Europe and in the USA, consumption of beverages that are a combination of milk products and fruit juices has increased 30% in the last decade, with only 10% belonging to the group of short shelf-life beverages which need refrigerated conditions for their distribution and sale (Cook, 2002; MAPA, 2003; Sharma, 2005).

The last decade has also seen the appearance on the market of many vegetable-based beverages, especially gazpacho. Gazpacho is part of the Spanish diet and was introduced as a manufactured product by the food industry in 1999. It consists of a vegetable soup consisting mainly of tomato, bell pepper and cucumber, also including olive oil and other ingredients such as onion, garlic, wine vinegar, salt and water (Arnao et al., 2001).

## **1.2. BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT CAPACITY IN FRUIT AND VEGETABLE BEVERAGES**

In recent decades there have been numerous epidemiological studies relating consumption of fruits and vegetables with a lower predisposition to suffer certain diseases such as cancer and cardiovascular diseases. This protective effect is attributed partly to the presence in fruits and vegetables of a series of constituents to which the generic name of bioactive compounds is given. Bioactive compounds are defined as non-nutritional substances that are found in very low concentrations in foods and that intervene in the secondary metabolism of vegetables and may have a significant effect on human health (Kris-Etherton et al., 2002), although some nutrients have also been included as bioactive compounds (Jeffery et al., 2003). Bioactive compounds can be grouped according to their chemical structure into antioxidant vitamins, phenolic compounds, terpene derivatives, sulphur compounds, phyto-oestrogens, peptides and amino acids, minerals, polyunsaturated fatty acids, dietary fibre, lactic bacteria and phytic acid.

In general, most of them have a marked antioxidant capacity, which is revealed by their ability to trap oxygen radicals, nitrogen radicals and organic radicals.

An antioxidant compound is defined as one that is present in a low concentration with regard to an oxidable substrate, delaying or inhibiting oxidation of the substrate (Sualdea, 2004). On a physiological level, oxidable substrates are lipids, proteins and DNA, and some of the most important antioxidants present in foods are vitamins C and E, carotenoids and phenolic compounds. Although their biological activity has been amply demonstrated *in vitro*, their physiological importance in humans in relation to the prevention of chronic diseases must be emphasized. However, one cannot speak of physiological effects of

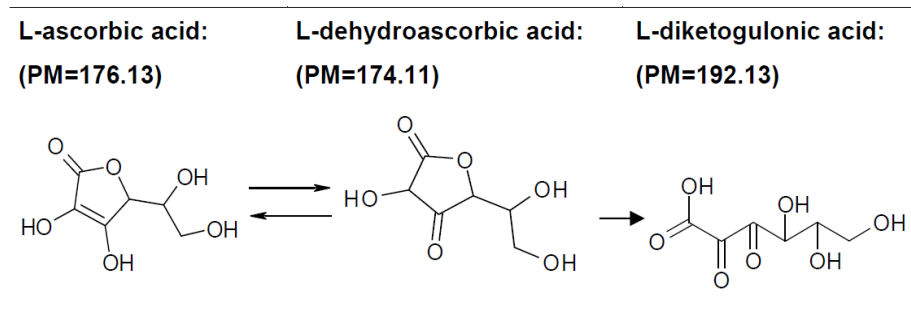
## Introduction

---

antioxidants in general but rather of each type of antioxidant, and even of each particular compound or chemical structure (Sualdea, 2004). Fruits and vegetables are characterized by having a high concentration of compounds of this kind, and therefore a high antioxidant capacity.

### 1.2.1. Ascorbic acid

Ascorbic acid has an enediol structure conjugated with the carbonyl group in the lactone ring. The two enolic hydrogen atoms are the ones that give this compound its acid quality and provide the electrons for its function as an antioxidant. In the presence of oxygen, ascorbic acid is transformed into dehydroascorbic acid, which has the same vitamin activity. This activity is lost after hydrolysis of lactone to form 2,3-diketogulonic acid (Figure n° 1).



**Figure n° 1.** Chemical structure of ascorbic acid and its derivatives.

Ascorbic acid is found mainly in fresh vegetables and fruits. Its concentration is particularly high in haws, gooseberries, kiwis and strawberries, followed by citrus fruits, which are traditionally the standard foods for vitamin C content because of the high contribution that they make to dietary intake of vitamin C. Green and red bell peppers, Brussels sprouts and tomatoes are prominent in the vegetable and horticultural products group. It is important to note that intake of



fruit juice provides 21% of daily vitamin C (Davey et al., 2000; Lee and Kader, 2000).

Ascorbic acid is necessary for normal functioning of the organism because it is involved in many physiological functions. It participates in maintaining bones, teeth and blood vessels because it is good for the formation and maintenance of collagen, and it also acts as a cofactor of various enzymes involved in biosynthesis of carnitine and a number of neurotransmitters (Davey et al., 2000; Food and Nutrition Board, 2000; Mason, 2007; Hamrick et al., 2008).

It is considered one of the most effective natural antioxidants and is present in a high concentration in many tissues in comparison with plasma concentrations. As such, it is effective against superoxide and hydroxyl radicals, hydrogen peroxide and singlet oxygen, and many *in vivo* studies show that because of its antioxidant properties ascorbic acid is involved in sequestering various reactive oxygen species in leucocytes and lung and gastric mucosa and reduces lipid peroxidation (Food and Nutrition Board, 2000; Mason, 2007).

The daily intake recommended for adults is 90 mg (Food and Nutrition Board, 2000), although current advice is to increase this quantity in order to increase effectiveness against ageing processes. Studies that have been conducted suggest that a daily intake of 90–100 mg of vitamin C reduces the risk of suffering chronic diseases in non-smoking men and women (Carr and Frei, 1999). Ascorbic acid has also proved to be effective in the therapeutic reduction of serum cholesterol levels (McRae, 2008) and various forms of cancer (Hoffer et al., 2008; Verrax et al., 2008; Gaziano et al., 2009).

### *1.2.2. Carotenoids*

The term “carotenoids” covers about 700 compounds which are responsible for the yellow, orange, red or purple pigmentation of many fruits and vegetables (Burns et al., 2003). Carotenoids can be divided

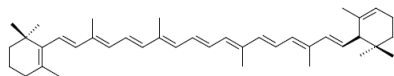
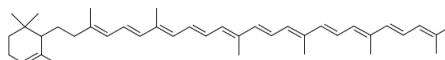
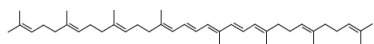
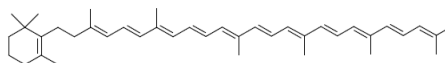
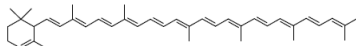
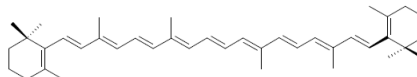
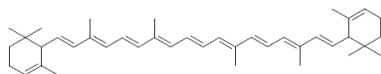
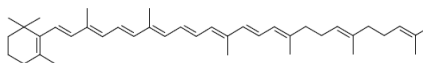
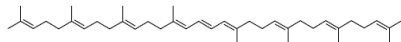
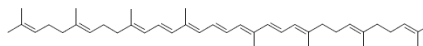
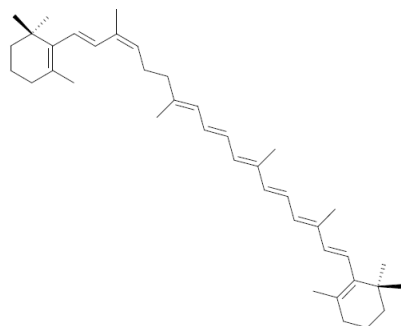
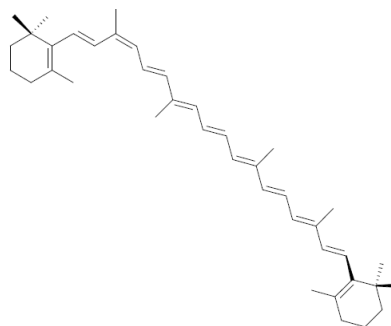
## Introduction

---

into two groups: carotenes and hydroxycarotenoids, which contain only carbon and hydrogen, and xanthophylls or oxycarotenoids, which are their oxygenated derivatives. Figure n° 2 shows the structures of various carotenoids that can be found in fruits and vegetables. Depending on the arrangement of the substituents, the double carbon-carbon bonds can exist in two configuration (*E/Z* or *cis/trans* isomers). In nature, carotenoids are mainly found in the *all-trans* configuration.

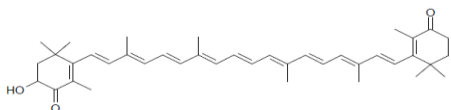
In general, the main carotenoids in vegetables are lutein,  $\beta$ -carotene, violaxanthin and neoxanthin. Zeaxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin and antheraxanthin are found in small quantities.

In fruits, xanthophylls are usually found in a greater proportion, although in some cases the main pigments are carotenes. Capsanthin and capsorubin are found almost exclusively in fruits of the *Capsicum* genus and are the main pigments that give colour to red bell pepper. It must be noted that the pattern of carotenoids in a particular fruit varies in relation to a number of factors, such as variety and climatic conditions.

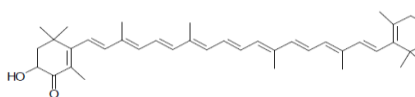
**CAROTENES** **$\alpha$ -carotene: (PM=536.89)** **$\delta$ -carotene: (PM=536.89)****Phytofluene: (PM=542.94)****Torulene: (PM=534.88)** **$\gamma$ -carotene: (PM=536.89)** **$\beta$ -carotene: (PM=536.89)** **$\epsilon$ -carotene: (PM=536.89)** **$\beta$ -zeacarotene: (PM=538.91)****Phytoene: (PM=544.96)** **$\zeta$ -carotene: (PM=540.92)****9-cis- $\beta$ -carotene: (PM=536.89)****9-cis- $\alpha$ -carotene: (PM=536.89)****Figure n° 2.** Structures of carotenoids: carotenes and xanthophylls.

**XANTOPHYLL**

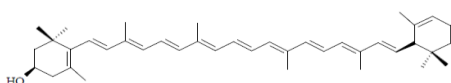
**3-hydroxi-echinenone: (PM=566.88)**



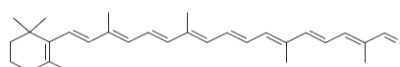
**Adonirubine: (PM= 580.86)**



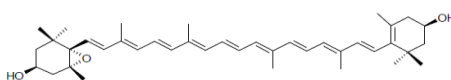
**$\alpha$ -criptoxanthin: (PM=552.89)**



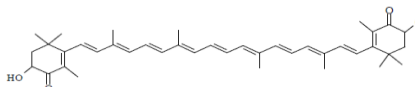
**$\beta$ -apo-8'-carotenal: (PM=416.65)**



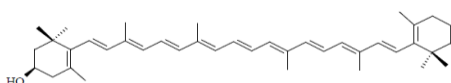
**Antheraxanthin: (PM= 584.89)**



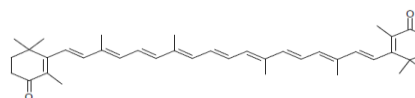
**Astaxanthin: (PM= 596.86)**



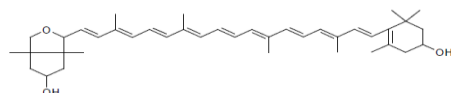
**$\beta$ -cryptoxanthin: (PM= 552.89)**



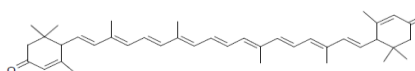
**Cantaxanhtin: (PM= 564.86)**



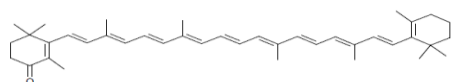
**Capsanthin: (PM=584.89)**



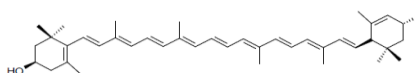
**$\epsilon,\epsilon$ -caroten-3,3-dione: (PM=564.86)**



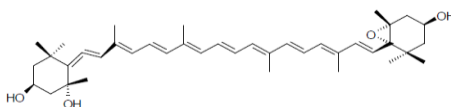
**Echinenone: (PM=550.88)**



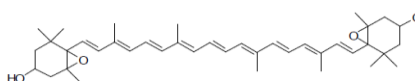
**Lutein: (PM=568.89)**



**Neoxanthin: (PM=600.89)**



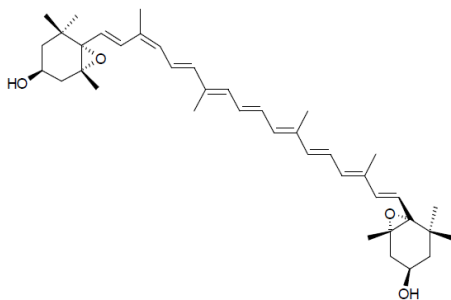
**Violaxanthin: (PM=600.89)**



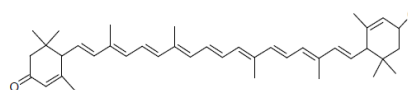
**Figure n° 2 (continuation).** Structures of carotenoids: carotenes and xanthophylls.

## XANTOPHYLL

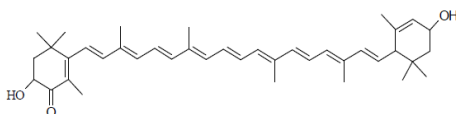
**9-cis-violaxanthin: (PM=600.89)**



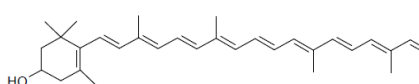
**3'-hidroxi-e,e-caroten-3-one (PM=566.88)**



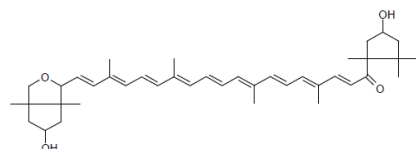
**$\alpha$ -doradexanthin: (PM=582.87)**



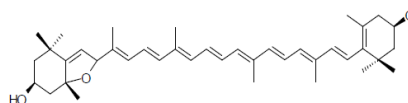
**$\beta$ -citaurin: (PM=432.65)**



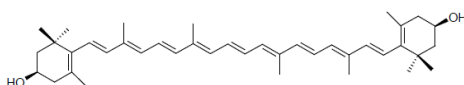
**Capsorubin: (PM=600.89)**



**Mutatoxanthin: (PM= 584.89)**



**Zeaxanthin: (PM=568.89)**



**Figure n° 2 (continuation).** Structures of carotenoids: carotenes and xanthophylls.

## Introduction

---

The recommended intake of vitamin A is expressed as retinol equivalents (REs): 1 retinol equivalent = 1  $\mu\text{g}$  of retinol = 12  $\mu\text{g}$  of  $\beta$ -carotene = 24  $\mu\text{g}$  of  $\alpha$ -carotene = 24  $\mu\text{g}$  of  $\beta$ -cryptoxanthin.

It has been estimated that the mean consumption of vitamin A varies between 744 and 811 retinol equivalents per day in men and between 530 and 716 retinol equivalents per day in women. Estimating that approximately 26% and 34% of the vitamin A consumed by men and women, respectively, is supplied by provitamin carotenoids

Interest in carotenoids is currently increasing, not only because of their provitamin A function but also because of their antioxidant action, since they have been shown to be capable of sequestering oxygen radicals and reducing oxidative stress in the organism (Rao and Honglei, 2002). Numerous studies have demonstrated a high correlation between consumption of carotenoids and a lower risk of certain diseases, such as cancer, atherogenesis, bone calcification, ocular degeneration and neuronal damage (Palace et al., 1999; Cantuti-Castelvetri et al., 2000; Yamaguchi and Uchiyama, 2003).

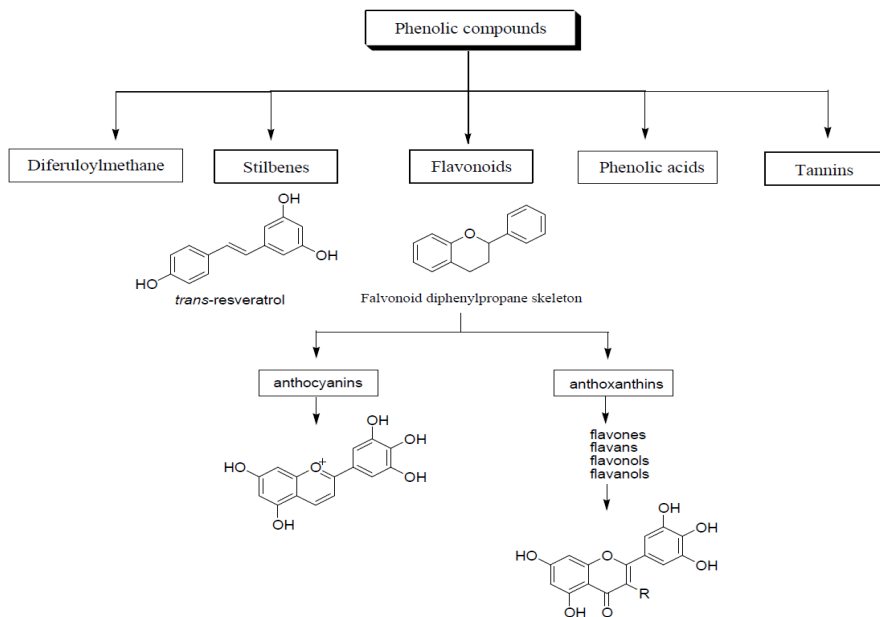
This is why it is recommended that consumption of fruits and vegetables rich in carotenoids should be increased, since numerous studies support their beneficial effects for the health (Food and Nutrition Board, 2000), although there is not sufficient evidence to establish recommendations of daily intake because the effects observed might be due to other components present in foods.

### *1.2.3. Phenolic compounds*

Phenolic compounds or polyphenols form a large group of chemical substances considered as secondary metabolites of plants, with various chemical structures and activities. Chemically, phenolic compounds are substances that possess an aromatic ring and a benzene ring with one or more hydroxide groups including functional derivatives (esters, methyl

esters, glycosides, etc.) (Tsimidou, 1998). In plants they appear in conjugated form with one or more glucose residues joined to the hydroxyl groups, although in some cases direct junctions may be formed between a glucose molecule and an aromatic carbon. Consequently, the commonest form in which they are found in nature is as glycosides, which are soluble in water and organic solvents. They may also be found joined to carboxylic acids, organic acids, amines, lipids and other phenolic compounds (Bravo, 1998).

Polyphenols are subdivided into different groups depending on the number of phenolic rings that they possess and the structural elements joined to them (Butterfield et al., 2002). Figure n° 3 shows the main groups that can be found in foods and their chemical structure.



**Figure n° 3.** Classification and structure of polyphenols in foods. Source: Han et al. (2007).

The distribution of phenolic compounds in plant tissues and cells varies considerably according to the type of chemical compound in question. They are situated inside cells or on the cell wall (Andary and Mondolot-Cosson, 1997). In plant cells they are essential metabolites for plant growth and reproduction, and protective agents against the action of pathogens, being secreted as defence mechanisms (Butler, 1992).

Their contribution to the pigmentation of vegetable foodstuffs is clearly recognized in anthocyanidins, which are responsible for the red, blue, violet, orange and purple colours of most plants and their products (Sahidi and Naczk, 1995; Belitz and Grosch, 1988). Moreover, the oxidation reaction of phenolic compounds to the formation of quinones, catalysed by oxidase polyphenol enzymes, produces enzymatic browning in foods (MacEvily et al., 1992), a factor of vital importance with regard to ensuring the quality of fruits and vegetables during processing (Sahidi and Naczk, 1995). Phenolic compounds, specifically condensed tannins or proanthocyanidins, are associated with the astringency of many edible fruits before they ripen (Sahidi and Naczk, 1995) and are related to the sensory quality of both fresh and processed foods of plant origin (Clifford, 1992).

The concentration of polyphenols in fruit juices generally ranges between 2 and 500 mg/L, depending on the type of fruit, although juices of certain varieties of orange have much higher concentrations (up to 700 mg/mL) (Bravo, 1998).

### *1.2.4. Antioxidant capacity in fruit and vegetable beverages*

There is now great interest in the measurement of antioxidant capacity because it provides considerable information about resistance to oxidation, the quantitative contribution of antioxidant substances, and the antioxidant capacity that a foodstuff may have in the organism when it is ingested (Huang et al., 2005; Serrano et al., 2007).



Many studies have been conducted to evaluate the total antioxidant capacity of foods but there is no standardized official method, and therefore it is recommended that the measurement of antioxidant capacity should be performed with several different oxidation conditions and methods of measurement (Frankel and Meyer, 2000).

The antioxidant capacity of foods depends on many factors, prominent among which are the colloidal properties of the substrates, the oxidation conditions and state, and the location of the antioxidants in the various phases (aqueous and lipid) of the foods (Frankel and Meyer, 2000). Moreover, the antioxidant capacity measurement depends on the technique and the generating or oxidizing radical that is used in the measurement.

The methods for measuring antioxidant capacity can basically be classified in two groups, depending on the reaction mechanism: methods based on transfer of hydrogen atoms, which include the ORAC method, a fluorometric determination that measures the inhibition of the decrease in fluorescence of fluorescein in the presence of antioxidant, and methods based on transfer of electrons, the best known of which are the DPPH assay and ABTS (Huang et al., 2005), spectrophotometric determinations that detect the decrease in absorbance of the ABTS<sup>•+</sup> radical cation in the presence of antioxidants.

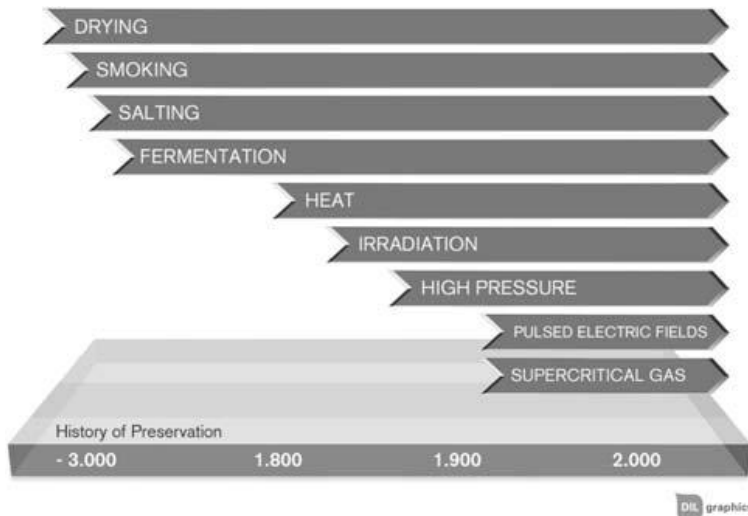
### **1.3. NON-THERMAL TECHNOLOGIES**

Nowadays consumers demand foods that are easy to consume and that have a high nutritional quality, aroma and natural flavour, and therefore they appreciate the similarity of minimally processed products to fresh products (Oey et al., 2008). As a result, in recent years the food industry has shown increased interest in non-thermal preservation technologies, because they provide products of proven quality and with a reduced environmental cost, increasing the products' added value (Pereira et al., 2010).

Non-thermal food preservation technologies are defined as those in which temperature is not the main factor in the inactivation of microbes and enzymes. In most of these technologies there is a slight increase in temperature (Deliza et al., 2005; Barbosa-Cánovas et al., 2008), without reaching the temperature level that is used for heat treatment (Raso and Barbosa-Cánovas, 2003).

The purpose of using these technologies is to inactivate the activity of the microorganisms present in the food and also certain enzymes of interest without destroying the nutritional and sensory components that are normally affected during heat treatment. Non-thermal processes are therefore being developed as an alternative to traditional thermal methods (Selma et al., 2003; Spilimbergo et al., 2003).

Non-thermal technologies are also being extensively studied not only for food preservation but also for the extraction of various bioactive compounds that are present in foods (Knorr, 2003; Corrales et al., 2008). Figure n° 4 shows the evolution of the application of the preservation methods most commonly used in the industry.



**Figure n° 4.** Evolution of the commonest preservation methods. Source: Heinz and Buckow (2009).

Table n° 1 shows the typical processing parameters for traditional and non-conventional treatments.

**Table n° 1.** Distinctive characteristics of the various preservation treatments. Source: Heinz and Buckow (2009).

	Processing parameters	Processing intensity	Lethality	Structure impact	Cost (€/kg)
Drying	$T, t$	+	--	++	5
Smoking	$C, T, t$	+	+	++	2
Salting	$C, t$	-	+	++	1
Fermentation	$b, T, t$	---	+	+	2
Heat	$T, t$	+++	+++	+++	0.05
Irradiation	$\int w$	++	+++	++	0.3
High pressure	$p, T, t$	+	++	+	0.3
Pulsed electric fields	$E, \int w$	++	++	+	0.1
Supercritical gas	$c, p, T, t$	+	+	+	1

$b$  microbial growth parameters,  $c$  chemical efficiency parameters,  $E$  electric field strength,  $\int w$  specific total energy input,  $p$  pressure,  $T$  temperature,  $t$  pressure exposure time.

## Introduction

---

The evaluation of the sensory and nutritional quality of foods processed by non-thermal technologies is a very important factor because it conditions consumer acceptance of the product (Knorr et al., 2004).

Among these non-thermal technologies we can mention high hydrostatic pressure, pulsed electric fields and ultrasound.

### *1.3.1. High Hydrostatic Pressure*

High pressure processing is based on two fundamental principles: the Le Chatelier principle, which proposes that pressure favours reactions and changes that involve a decrease in volume, and the isostatic principle, which proposes that the distribution of pressure is proportional in all parts of a foodstuff, irrespective of its shape and size (Heremans, 2002).

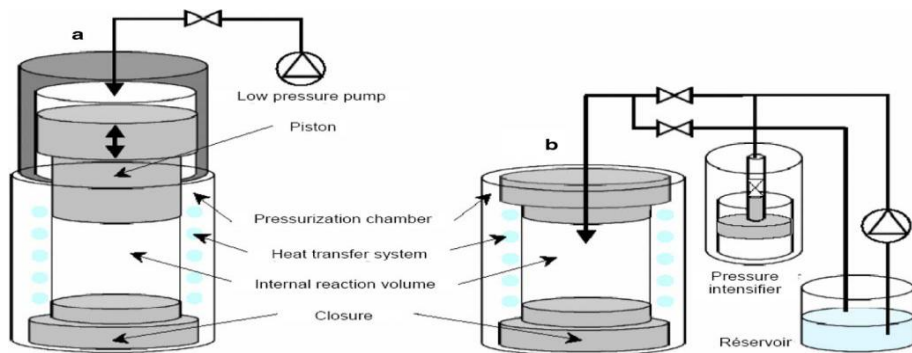
A conventional HHP unit consists of the following components: vessel and connection, pressure generation system and temperature control system. Figure n° 5 shows two high pressure units used on a laboratory scale and a unit used on an industrial scale.



**Figure n° 5.** HHP units located at (a) the Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA, CSIC), Spain, (b) Berlin Technical University, Germany, and (c) NC Hyperbaric, Spain.

In general, the operating mechanism of an HHP system consists in pumping a pressurized fluid from a tank to the treatment vessel. Once the vessel has been filled with the liquid and there is no air inside it,

pressure is generated by a hydraulic pump. This method is called “indirect pumping” and requires static seals (Figure n° 6b). In “direct pumping”, the design consists of a piston which compresses the vessel directly, thus increasing the pressure. In this kind of system, dynamic seals are required (Figure n° 6a).



**Figure n° 6.** Examples of (a) a direct system and (b) an indirect system (Urrutia-Benet, 2005).

Industrial high pressure installations operate discontinuously and can attain pressures of up to 800 MPa, although pressures exceeding 400 MPa are not normally used for foods because they can bring about a reversible or irreversible disruption of inter- and intramolecular bonds (Knorr et al., 2006; Heinz and Buckow, 2009). Structural changes in membranes and inactivation of the enzymes that take part in biochemical reactions cause the death of microorganisms when high pressures are applied. This technology also permits inactivation of viruses, which may depend on denaturalisation of the capsids of essential proteins for the attack on the host cell (Heinz and Buckow, 2009).

With this kind of treatment it is possible to inactivate microbes and enzymes at low temperatures, while compounds of low molecular

## Introduction

---

weight, such as vitamins and compounds related with pigmentation and aroma, remain unaltered (Rastogi et al., 2007).

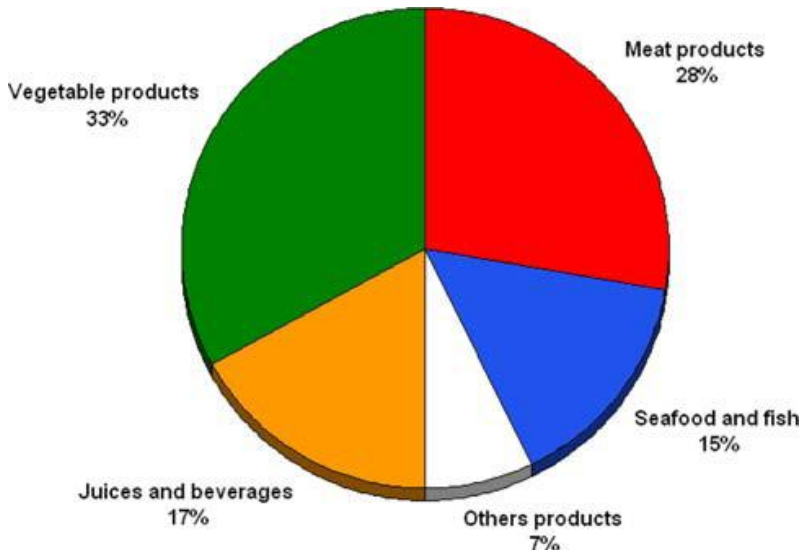
In recent decades, as a result of the development of high pressure treatment, there has been a considerable increase in the number of foods processed by this kind of technology that can be purchased on the market. For example, products have been marketed in Japan since 1990, and in the USA and Europe since 1996 (Zhang et al., 1995; Rizvi and Tong, 1997; Körmendy et al., 1998). Table n° 2 shows fruits, vegetables and derivatives treated by HHP that are currently on the market.

**Table n° 2.** Recently marketed foodstuffs treated by HHP.

Country	Products	Treatment	Shelf life
Australia	Fruits and fruit juices. Salads		
Canada	Apple purées and sauces		
Czech Rep.	Broccoli and apple or carrot juice (Beskyd Fryčovice)	500MPa/20°C/10min	21d
France	Juices (Pampryl)	400MPa/20°C/1min	18d, 4°C
	Orange juice (Ultrafruit)	500MPa/20°C/5–10min	
Italy	Fruit juices. Fruit desserts (Ortogel)	600MPa/17°C/3–5min	1–2m
Japan	Jams, sauces, jellies (Meidi-Ya Co.)	400MPa/20°C/10–30 min	2–3m, 4°C
	Grape juice (Pokka Co.)	120–400MPa/23°C/2–20min	
	Mandarin juice (Wakayama Food Industries)	300–400MPa/23°C/2–20min	
	Sake (Chiyonosono)	400MPa/15°C/30min	6–12m, 4°C
Lebanon	Fruit juices	500MPa	1m
Mexico	Smoothies citrus juices (Jumex)	500MPa	
Portugal	Juices (Frucalba)	450MPa/12°C/20–90s	28d
Spain	Prepared vegetable dishes	500MPa	
Sweden	Fruit juices (Västerås)	500–600MPa	
UK	Orange juice (Orchard House Foods)	500MPa/20°C	
USA	Avocado purée (Avomex)	700MPa, 600–800l/h, 345 MPa, 10min	
	Apple juice (Odwalla)		2–3 times more than fresh
	Avocado products. Vegetable salads. Orange juice.		
	Lemonade. Sliced onions		45d
	Soy products and tofu		

m: months. d: days.

There are currently 128 industrial installations with volumes ranging between 55 and 420 litres/day and a total annual output of over 200,000 tons (Heinz and Buckow, 2009). HHP can be used for preserving a very wide range of foods, including: juices and beverages, fruits, vegetables, meat products (cooked and dried ham, etc.), fish and precooked dishes. Figure n° 7 shows the use of HHP processing differentiated by food industry sectors.



**Figure n° 7.** Use of HHP for food preservation in different segments of the food industry. Source: Heinz and Buckow (2009).

High pressure processing is characterized by 3 parameters: temperature  $T$ , pressure  $p$ , and exposure time  $t$  (see Table n° 1). The third high pressure processing parameter allows great variability in the design of the process. Also, because of the great versatility of HHP, it is possible to combine this process with some other kind of treatment or other kinds of microbial inactivation agent in order to obtain more effective preservation, as in the cases of HHP combined with low pH (Raso and Barbosa-Cánovas, 2003) or with pulsed electric fields (Ross et al., 2003) or  $\text{CO}_2$  (Spilimbergo et al., 2002).

When HHP is combined with mild heat treatment (10–40°C), it is very suitable for the pasteurization of fruit juice (Deliza et al., 2005; Barbosa-Cánovas et al., 2008).

HHP is also suitable for other kinds of applications. For example, the combination of high pressure and low temperatures has permitted the development of a new field for the application of high pressure in the



food industry in the form of pressure-supported freezing, thawing and sub-zero storage (Urrutia-Benet et al., 2004; Norton and Sun, 2008). Another possibility that it offers is its use as a pretreatment to encourage extraction of various bioactive compounds (Corrales et al., 2008).

HHP avoids deformation of foods because the pressure is transmitted uniformly and instantly, that is, there are no gradients (it follows the so-called isostatic rule) (Takur and Nelson, 1998; Toepfl et al., 2006). Unlike what happens with heat processes, HHP treatment is independent of the size and geometry of the product, which reduces the time required to process large quantities of food. Also, because it does not break covalent bonds, it is possible to avoid the production of “off” flavours, thus maintaining the product’s natural quality (Rastogi et al., 2007). It can be applied at room temperature, thus reducing the quantity of thermal energy required to treat products during traditional processing. Once the desired pressure has been reached, it can be maintained without the need to increase the energy input, so that the processing has a low energy cost, and the energy used is clean, without waste products, all of which is in keeping with current environmental policies (Toepfl et al., 2006; Norton and Sun, 2008; Pereira et al., 2010).

However, high pressure treatment also has some limitations, such as the cost of the equipment (Toepfl et al., 2006; Norton and Sun, 2008). This drawback is becoming less important because cheaper equipment is being developed.

It has not yet been possible to design continuous processes with the HHP equipment available on the market, but there are some discontinuous processes which operate on-line. Moreover, the enzymes and bacterial spores present in foods are very resistant to pressure and very high pressures are required for their inactivation (Rastogi et al., 2007). Also, it is not possible to apply HHP to all foods; for example, it is not very effective in foods with occluded air or with low water activity.

## Introduction

---

HHP-processed foods need low storage and distribution temperatures in order to preserve their sensory quality. But the main drawback is probably the consumer's lack of confidence when deciding whether to buy a "pressurized" product because it is something new and unknown, although this attitude is gradually changing, with the result that in Japan and the USA and some European countries consumption of these products is increasing (Pereira et al., 2009; Heinz and Buckow, 2009).

In recent years various research groups have studied how high pressure processing may affect physicochemical parameters and bioactive compounds. They have also investigated the antioxidant capacity of liquid foods such as fruit and vegetable juices, milk and other beverages because it has been shown that their behaviour varies depending on the food matrix (Rastogi et al., 2007; Oey et al., 2008) and therefore it is necessary to evaluate each product individually before it can be marketed. The evaluation of the sensory and nutritional quality of beverages of this kind is very important for the consumer because it conditions product acceptance.

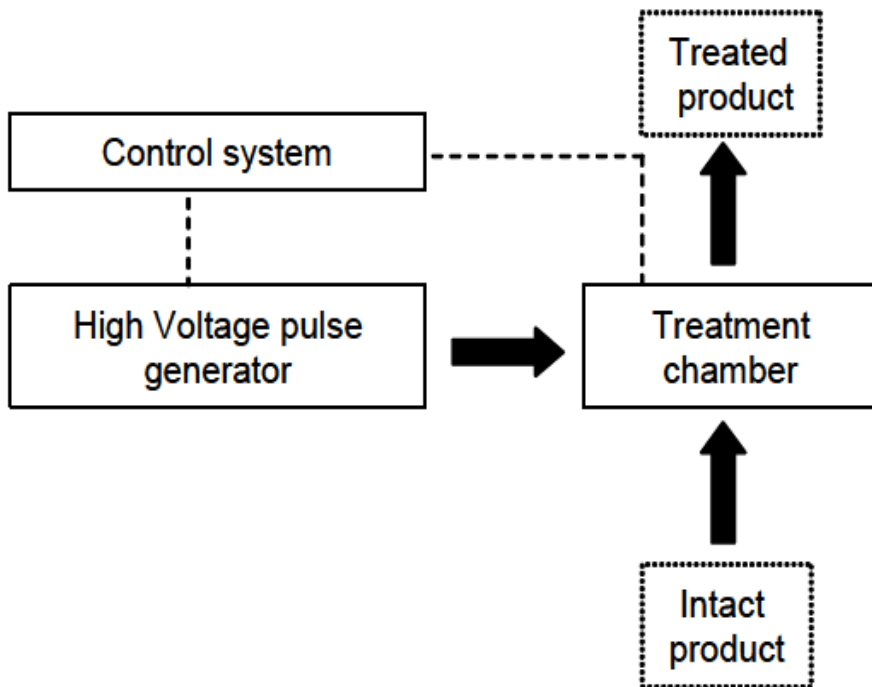
### *1.3.2. Pulsed electric fields*

Pulsed electric field treatment (PEF) consists in applying pulses with a high voltage (normally 20–80 kV/cm) and a capacitance ranging from 80 nF to 9.6 mF for short periods of time (<1 s) to foods placed between 2 electrodes (Señorans et al., 2003).

The effect on microorganisms is based on the alteration of the cell wall when the electric field strength applied produces a difference in potential between the two sides of the membrane (transmembrane potential). When this difference in potential reaches a particular critical value, which varies according to the type of microorganism, there is an irreversible formation of pores in the cell membrane (electroporation) and consequently a loss of integrity, increase in permeability and finally destruction of the cell affected (Barbosa-Cánovas et al., 1998). Pulsed electric field treatment can be used to inactivate contaminating and pathogenic microorganisms and enzymes without appreciable loss of aroma, colour and bioactive compounds at temperatures lower than the conventional ones, which have an adverse effect on food quality (Yeom et al., 2000; Hodgins et al., 2002; Raso and Barbosa-Cánovas, 2003; Cserhalmi et al., 2006; Elez-Martínez et al., 2006).

These treatments are used mainly for food preservation, although they can also have other applications. For example, it has been reported that they can increase extraction of various compounds from foods (Ade-Omawaye et al., 2001). This is due to the phenomenon of electroporation, which causes loss of membrane integrity, inactivation of proteins and release of cell components (Jeyamkondan et al., 1999). Knorr (2003) and Corrales et al. (2008) used pulsed electric fields as a pretreatment to increase extraction of anthocyanins from grape juice. They can also be used to increase the extraction of fruit juices and improve their quality (Guderjan et al., 2007, Schilling et al., 2007).

Pulsed electric field generating equipment consists of a high-voltage power source, a system that controls the frequency and type of discharge, a treatment chamber containing the electrodes between which the food circulates, a cooling system and control devices (Figure n° 8).

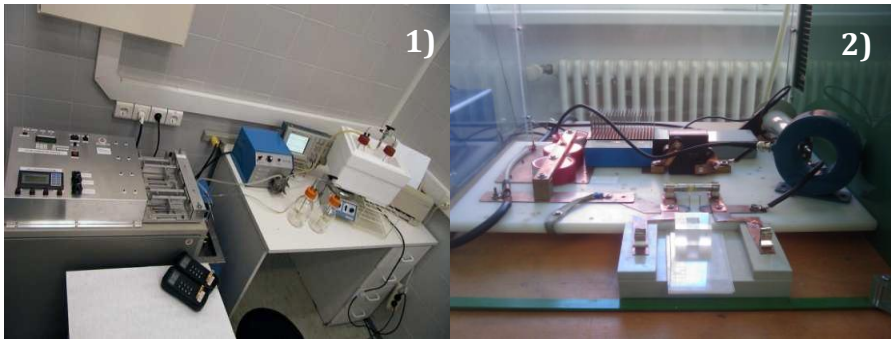


**Figure n° 8.** Diagram of a PEF system for food processing.

One of the main components of a PEF system is the treatment chamber which transfers the pulses with electric voltage to the food and which may be static (batch) or continuous. Static chambers are most commonly used in laboratory-level studies for PEF treatments of either solid or liquid products.

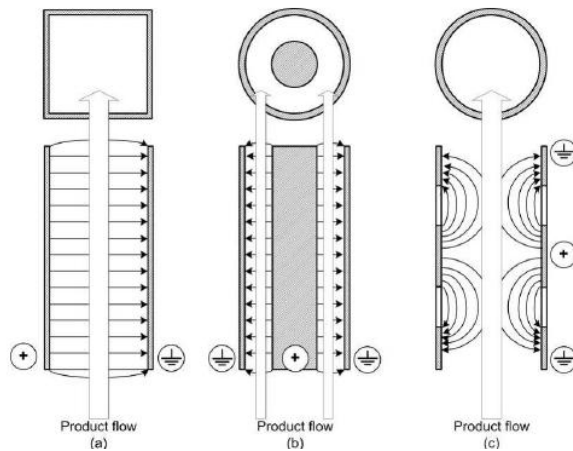
Continuous chambers, on the other hand, can be used on an industrial scale (Barbosa-Cánovas et al., 1998; Fincan et al., 2004).

Figure n° 9 shows two examples of equipment used at laboratory level for continuous and batch processing.



**Figure n° 9.** 1) OSU 4D PEF continuous equipment located at the Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos (IATA, CSIC) and 2) PEF batches equipment located at the Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering, Berlin Technical University.

Suitable design of the treatment chamber is important to ensure effective cell permeabilization during the process. Many aspects must be considered, including its geometry and size and the materials used for its manufacture (Barbosa-Cánovas et al., 1998). For the static configuration, the electrodes are normally arranged in the form of parallel plates with a small gap between them which makes the electric field more uniform (Dunn and Pearlman, 1987; Mizuno and Hori, 1988; Angersbach and Knorr, 1997; Rastogi et al., 1999; Angersbach et al., 2002; Fincan et al., 2004). For continuous systems, other configurations are used in addition to parallel plates, such as: concentric cylinders, concentric cones, convergent electric fields and co-field treatment chambers (Matsumoto et al., 1991; Bushnell et al., 1993; Qin et al., 1996; Yin et al. 1997; Barbosa-Cánovas et al., 1998). Figure n° 10 shows the treatment chamber configurations most commonly used for static and continuous PEF systems.



**Figure n° 10.** Configurations of treatment chambers for PEF treatment: a) static/continuous parallel plate, b) continuous coaxial, and c) contiguous co-linear configuration (Barbosa-Cánovas et al., 1998).

The effectiveness of pulsed electric field processing depends on critical factors that include certain parameters that are related with the treatment and others that depend on the product to be treated. The processing factors include field strength, treatment time, pulse width, pulse frequency, pulse shape, polarity, energy and temperature applied.

Field strength is defined as the difference in potential between two electrodes divided by the distance between them. However, a field strength that is too high may cause dielectric rupture of the liquid that is processed. The treatment time is obtained by multiplying the pulse width (pulse duration) by the number of pulses applied. These two factors have been identified as the most important factors for defining inactivation of microbes and enzymes by the application of an electric pulse treatment (Elez-Martínez et al., 2005). When square waves are used, their width is equal to their duration, whereas in the case of exponential decay waves the width corresponds to the time during which the voltage is greater than 37% of the maximum discharge value (Barbosa-Cánovas et al., 1998; Raso et al., 2000). The pulse frequency

(number of pulses applied per unit of time) determines the hold time of the food in the treatment chamber once the values of pulse width and treatment time have been fixed. The form in which the pulses are applied is called the polarity (mono- or bipolar). In monopolar treatments the field strength is always discharged in the same direction, and in bipolar treatments the direction of polarity of the pulse alternates when the field strength is discharged (Barbosa-Cánovas et al., 1998).

The energy supplied to the food is a parameter that includes the electric field and the treatment time.

It has been shown that the application of pulsed electric fields increases the temperature of the product. However, the heat generated during the application of PEF is not considered significant because the temperature reached does not usually exceed 40°C, and also it is possible to incorporate a cooling system.

Then there are the inherent factors of the food. The food matrix has a decisive influence on the effectiveness of PEF treatment because the presence of components such as fats or proteins makes inactivation of microbes by PEF more difficult in comparison with simple suspensions of microorganisms (Martin et al., 1994; Ramaswamy and Chen, 2002; Bendicho et al., 2003).

The pH and the presence of natural antimicrobials are not factors directly related with the effectiveness of the treatment, but they do contribute to processing, increasing the effectiveness of PEF for preserving the product (Barbosa-Cánovas and Sepúlveda, 2005). The electric conductivity of a medium is an important variable because foods with high conductivity produce small electric fields and are not suitable for PEF treatment (Barbosa-Cánovas et al., 1999). The presence of particles in suspension may cause an increase or a reduction in treatment intensity (Wouters et al., 2001).

## Introduction

---

Various research groups have studied how electric pulses may affect physicochemical and nutritional parameters in liquid foods such as fruit and vegetable juices, milk and other beverages, because it has been shown that their behaviour varies depending on the food matrix (Sampedro et al., 2005; Cortés et al., 2008; Soliva-Fortuny et al., 2009; Zulueta et al., 2010) and therefore it is necessary to evaluate each product individually before it can be marketed. The evaluation of the sensory and nutritional quality of beverages of this kind is very important for the consumer because it conditions product acceptance (Riener et al., 2009; Soliva-Fortuny et al., 2009).

The first results obtained for the effect of PEF on the physicochemical and sensory properties of fruit juices concentrated mainly on the content and evolution of various physicochemical properties such as sugar content, pH, acidity and browning (Yeom et al., 2000, Evrendilek et al., 2000). With regard to bioactive compounds and antioxidant capacity, vitamin C is the vitamin that has been studied most in fruit juices because it is one of the most abundant vitamins and at the same time one of the most sensitive to heat. Various studies have shown that juices treated by PEF retain a greater quantity of vitamin C than thermally processed foods. However, there are very few studies on the influence of PEF on phenolic compounds or on compounds derived from isoprene.



### 1.3.3. Ultrasound

Ultrasound has been shown to be a promising alternative technology to heat treatment for food processing (Mason et al., 2005) because it can satisfy the requirement of a 5-log reduction of *Escherichia coli* in fruit juices established by the US Food and Drug Administration (Salleh-Mack and Roberts, 2007) and it has also been shown to be effective against contaminating microorganisms in orange juice (Valero et al., 2007) and guava juice (Chen et al., 2007).

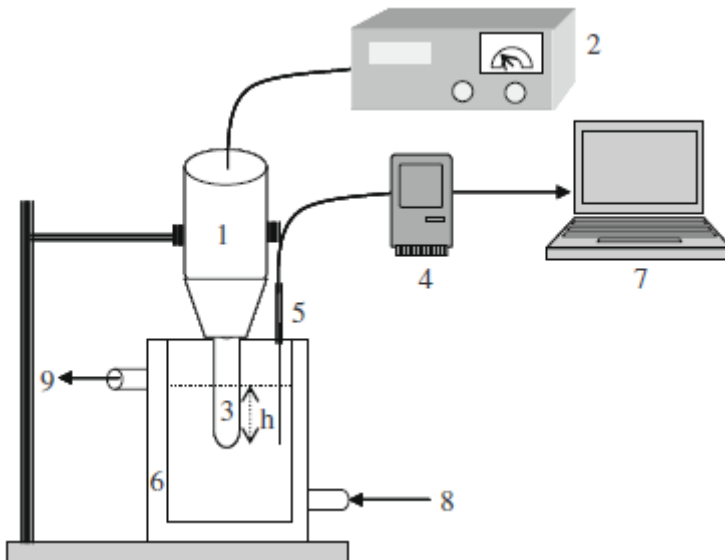
Ultrasound can be defined as inaudible sound waves at a frequency above 20 kHz. For food preservation, ultrasound waves of low frequency (18–100 kHz;  $\lambda=145$  mm) and high intensity (10–1000 W/cm<sup>2</sup>) are most effective. The preservative effect of ultrasound is associated with complex phenomena of gas cavitation which explain the generation and evolution of microbubbles in a liquid medium. Cavitation takes place in the regions of a liquid that are subjected to rapidly alternating high-amplitude pressures. During the negative half of the pressure cycle the liquid is subjected to a tensile force, and during the positive half it undergoes compression. The result is the uninterrupted formation of microbubbles, the size of which increases thousands of times (they expand) during the alternation of the pressure cycles. Microbubbles that reach a critical size implode violently and return to their original size, which causes the release of all the accumulated energy, producing instantaneous focal temperature increases which are dissipated without substantially raising the temperature of the liquid treated. However, the energy released and the mechanical shock associated with this phenomenon affect the structure of the cells situated in the microenvironment. Nevertheless, the effect of ultrasound on food spoilage agents is limited and depends on many factors, and therefore its application has been channelled towards its simultaneous or alternating combination with other preservation techniques.

## Introduction

---

The application of ultrasound and mild heat treatments (<100°C, usually between 50 and 60°C) has given rise to the procedure known as thermo-ultrasonication. The combination with increases in pressure (<600 MPa) is known as manosonication, while the use of the three strategies together is called manothermosonication (McClements, 1995; Knorr et al., 2004).

The ultrasound equipment used for discontinuous (more common) or continuous functioning has a treatment chamber containing an ultrasound source capable of generating vibration amplitudes of the order of various tens of micras, together with an impedance adaptation box and an electronic generation unit. This unit consists of two parts: a power amplifier and a system for controlling and monitoring the resonance frequency which keeps the power applied to the transducer steady during the process. The various parameters of the transducer excitation signal (resonance frequency, voltage, current, phase, power) are captured and stored in a computer for treatment (Herrero et al., 2006). Figure n° 11 shows an ultrasound processing unit.



**Figure n° 11.** Ultrasound unit: 1) ultrasound transducer; 2) ultrasound generator; 3) ultrasound probe (19 mm); 4) data recorder; 5) temperature sensor; 6) cooling jacket; 7) computer; 8) water inlet; 9) water outlet; h) depth of the zone in the sample (25 mm). Source: Adekunte et al. (2010).

Current ultrasound technology comes from the exploitation of two properties possessed by certain materials: piezoelectricity and magnetostriction. A piezoelectric ultrasound generator is based on the generation of electric oscillations of a particular frequency which a material with piezoelectric properties transforms into mechanical oscillations (transducer). Another method for producing ultrasound vibrations is by the use of magnetostrictive transducers. The functioning of these devices is based on the mechanical distortions experienced by certain materials when they are subjected to an intense magnetic field (Herrero et al., 2006).

With regard to the use of ultrasound in the food industry, manosonication and manothermosonication are particularly effective

## Introduction

---

for sterilizing jams and liquid egg and, in general, to prolong the shelf life of liquid foods. Isolated ultrasonication is effective for the decontamination of raw vegetables and whole eggs submerged in liquid medium. For purposes other than preservation, it has been used successfully to tenderise meat. Better known and more widely practised is the use of ultrasound in emulsification and homogenisation systems and in the cleaning of certain equipment (McClements, 1995; Knorr et al., 2004).

In recent years various research groups have studied how ultrasound may affect physicochemical and nutritional parameters in liquid foods such as fruit and vegetable juices, milk and other beverages, because it has been shown that their behaviour varies depending on the food matrix (Butz and Tauscher, 2002) and therefore it is necessary to evaluate each product before it can be marketed.



## 2. OBJETIVOS

---

OBJECTIVES

## 2-OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente investigación es obtener bebidas con un alto contenido en compuestos bioactivos y capacidad antioxidante tras la aplicación de diferentes tratamientos no térmicos (APH, PEAI y ultrasonidos).

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

- Caracterización nutricional y fisicoquímica de bebidas de zumo de fruta/s y leche y bebidas a base de vegetales comerciales.
- Optimización de la preparación de una bebida a base de vegetales.
- Puesta a punto y validación de los diversos métodos de análisis empleados.
- Evaluación del efecto del tratamiento por APH, PEAI y US sobre determinados parámetros nutritivos (ácido ascórbico, carotenoides, fenoles solubles totales, capacidad antioxidante y perfil de ácidos grasos) y de calidad (pH, °Brix, índice de pardeamiento, índice de turbidez y color) en la bebida de zumo de naranja y leche, la bebida a base de vegetales y el zumo de arándanos.
- Estudio del efecto de los tratamientos no térmicos (APH, PEAI y US) sobre la extracción de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante total en arándanos.





## 3. PLAN DE TRABAJO

---

WORK PLAN

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

Para la consecución de los objetivos del estudio se propone el siguiente **plan de trabajo**:

1. Puesta a punto y validación de un método cromatográfico para la identificación y cuantificación de vitaminas liposolubles.
2. Puesta a punto de diferentes métodos para la determinación de la capacidad antioxidante en bebidas a base de zumo de naranja mezclado con leche y bebidas a base de vegetales.
3. Caracterización nutricional y fisicoquímica de bebidas a base de zumo de fruta mezclado con leche y bebidas a base de vegetales comerciales.
4. Evaluación del efecto del tratamiento de diferentes tecnologías de conservación térmicas y no térmicas (APH, PEAI y US) sobre la composición fisicoquímica, nutricional y capacidad antioxidante total de una bebida a base de zumo de naranja mezclada con leche preparada en el laboratorio.
5. Elaboración de una bebida a base de vegetales.
6. Efecto del tratamiento térmico y por APH sobre la composición fisicoquímica, nutricional y capacidad antioxidante total de la bebida a base de vegetales preparada en el laboratorio.
7. Elaboración de un zumo de arándanos.
8. Efecto del tratamiento por APH sobre la composición fisicoquímica, nutricional y capacidad antioxidante total en el zumo de arándanos.
9. Efecto de los tratamientos térmicos y no térmicos (APH, PEAI y US) sobre la permeabilidad celular en arándanos y en la extracción de compuestos bioactivos.



## 4. PARTE EXPERIMENTAL

---

### EXPERIMENTAL WORK

## 4-PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. MUESTRAS

#### 4.1.1. Zumo de naranja mezclado con leche

Las naranjas (*Citrus sinensis* L.), variedad navel, así como la leche desnatada (0.1% grasa) (Grupo Leche Pascual, SA, Burgos, España) se adquieren en un supermercado local de Valencia (España). Para la elaboración de la bebida mezcla de zumo de naranja y leche se tritura la pectina (0.3 g) junto al azúcar (7.5 g) y se añade agua caliente a 50°C (30%, v/v), manteniendo en agitación durante 10 minutos hasta su completa disolución. Se añade la leche desnatada (20%, v/v) y se deja en agitación protegida de la luz y el oxígeno hasta obtener una mezcla homogénea. Una vez enfriada la mezcla, se añade el zumo de naranja exprimido y tamizado (50%, v/v) y el ácido cítrico (0.1%, p/v). La bebida así preparada se almacena en refrigeración ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) en un envase protegido de la luz y el oxígeno hasta su tratamiento y/o análisis (Zulueta et al., 2009).

#### 4.1.2. Bebida a base de vegetales

Se eligen aquellos ingredientes que se encuentran de forma mayoritaria en bebidas frías de vegetales, también conocidas como 'gazpachos' y en otras bebidas a base de vegetales presentes en el mercado. Los vegetales seleccionados son: tomate, pimiento, apio, pepino, zanahoria y cebolla.

Para la elaboración de la bebida, los vegetales se adquieren en un supermercado local de Valencia (España) y se someten a las operaciones preliminares de lavado, pelado y corte en trozos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, posteriormente se escaldan ( $95\pm 2^\circ\text{C}$  durante 1-5 min).

## Parte experimental

---

Se enfrían rápidamente con hielo durante 3 minutos y se mantienen en refrigeración hasta que se licúan. Se mezclan los vegetales licuados y posteriormente se le añade agua, sal y aceite de oliva teniendo en cuenta los porcentajes que se indican a continuación:

33 % (p/v) tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.).

17% (p/v) pimiento verde (*Capsicum annum* L.).

8.5% (p/v) apio verde (*Apium graveolens* L.).

4% (p/v) pepino (*Cucumis sativus* L.).

4% (p/v) cebolla (*Allium cepa* L.).

4% (p/v) zanahoria (*Daucus carota* L.)

1.7% (p/v) limón (*Citrus limon* L.).

1.7% (p/v) sal (solución de NaCl al 10%)

0.8% (v/v) aceite de oliva virgen extra (SOS Cuétara, S.A., Madrid, Spain.).

Agua, hasta completar el 100% (v/v).

### 4.1.3. Zumo de arándanos

Los arándanos (*Vaccinium myrtillus*), cosechados en Polonia, se adquieren en un supermercado local de Berlín (Alemania). El zumo de arándanos se obtiene a partir de frutos enteros, mediante trituración, prensado, centrifugación (4500 rpm durante 15 min) y posterior filtrado del sobrenadante con un filtro de tamaño de poro de 2 mm.

### 4.1.4. Zumos de frutas mezclados con leche comerciales

La muestra se compone de dos lotes distintos de dieciocho bebidas de zumo de fruta y leche (Cuadro n° 3) procedentes de 6 fabricantes distintos (A, B, C, D, E y F). Todas ellas se comercializan en envases de Tetra-Brick®. Once de las bebidas se encuentran a temperatura ambiente (20±2°C) por haber sido sometidas a tratamiento UHT teniendo una vida media de 12 meses y, seis de ellas se comercializan a temperatura de refrigeración (4±2°C) al estar pasteurizadas

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 período.

#### *4.1.5. Bebidas a base de vegetales comerciales*

La muestra se compone de dos lotes distintos de catorce bebidas a base de vegetales (Cuadro n° 4) procedentes de 8 fabricantes distintos (A, B, C, D, E, F, G y H). Todas ellas se comercializan en envases de Tetra-Brick® a temperatura ambiente ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por haber sido sometidas a tratamiento de esterilización y se encuentran dentro de su periodo de vida útil. Como criterio de análisis se establece la realización de los análisis a mitad de dicho período.

## Parte experimental

**Cuadro n° 3.** Composición de las bebidas de zumo y leche comerciales.

	<b>Composición</b>	<b>Zumo de frutas</b>
1A	Zumo 25%, Leche 10%, agua, azúcar, fibra, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque, papaya
2A	Zumo 25%, Leche 10%, agua, azúcar, fibra, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	naranja, manzana, piña, limón
3B	Zumo 10%, Leche 10%, agua, azúcar, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	Naranja, mango, piña
4B	Zumo 30%, Leche 10%, agua, azúcar, pectina, cítrico, vitaminas A, C y E y aromas.	naranja, manzana, uva, limón, melocotón
5C	Zumo 42.5%, Leche 10%, azúcar, dextrosa, pectina, aromas, vitaminas (A, C, E), colorantes (clorofila y cúrcuma).	manzana, kiwi, naranja, lima
6C	Zumo 7%, Leche 10%, agua, azúcar, dextrosa, pectina, aromas, vitaminas (A, C, E), E-160a.	Piña, mango
7C	Zumo 35%, Leche 12%, agua, azúcar, dextrosa, pectina, cítrico, aroma, colorante (cúrcuma), Vitaminas (A, C, E).	Manzana, naranja, plátano
8C	Zumo 33.7%, Leche 10%, agua, azúcar, dextrosa, fibra, pectina, aroma, vitaminas (A, C, E), E-160a.	naranja, limón, zanahoria, melocotón, maracuyá, acerola, piña
9C	Zumo 31%, Leche 10%, agua, azúcar, dextrosa, pectina, aroma, cítrico, vitaminas (A, C, E).	Piña, coco
10D	Zumo 25%, Leche 10%, agua, azúcar, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	naranja, manzana, piña, limón
11D	Zumo 25%, Leche 10%, agua, azúcar, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque, papaya
12D	Zumo 25%, Leche 10%, agua, azúcar, fibra, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	melocotón, albaricoque, manzana, limón
13D	Zumo 7%, Leche 10%, agua, fibra, pectina, cítrico, vitaminas (A, C y E) y aromas	Piña, mango
14E	Zumo 30%, Leche 10%, agua, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	manzana, naranja, uva, melocotón
15E	Zumo 30%, Leche 10%, agua, pectina, cítrico, regulador de acidez: citrato trisódico, vitaminas: (A, C, E), aromas, E-951, E-950.	manzana, naranja, piña, mango
16F	Zumo, Leche desnatada, azúcar, fibra, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	naranja, manzana, piña, limón
17F	Zumo, Leche desnatada, azúcar, fibra, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque, papaya
18F	Zumo, Leche desnatada, azúcar, fibra, pectina, cítrico, vitaminas (A, C, E), aromas.	melocotón, albaricoque, manzana, limón



**Cuadro n° 4.** Composición de las bebidas a base de vegetales comerciales.

Muestra	Composición
1A	Tomate, agua pimiento, pepino, cebolla, aceite de oliva virgen extra, vinagre de vino de Jerez, pan, sal y ajo.
2A	Tomate, pimiento, pepino, cebolla, aceite de oliva virgen, vinagre de vino, sal, ajo y limón.
3B	Tomate, agua, pimiento, cebolla, aceite de oliva virgen extra, pan rallado, vinagre de vino, sal y ajo.
4B	Tomate, agua, pimiento, cebolla, aceite de oliva virgen extra, vinagre de vino, sal y ajo.
5C	Tomate, pimiento, pepino, agua, aceite de oliva virgen extra (2.3%), pan, vinagre de vino de Jerez, sal y ajo.
6C	Tomate fresco, pimiento, pepino, cebolla, aceite de oliva virgen extra (2.5%), vinagre de vino de Jerez, sal, ajo y limón.
7C	Tomate fresco, pimiento, pepino, cebolla, aceite de oliva virgen extra (2.8%), vinagre de vino de Jerez, sal, ajo y limón.
8D	Tomate, pimiento, pepino, cebolla, aceite de oliva virgen (2.5 %), vinagre de vino, sal, ajo, limón.
9E	Tomate, pimiento, pepino, cebolla, aceite de oliva virgen, vinagre de vino, sal, ajo y limón.
10E	Tomate, pimiento, pepino, cebolla y ajo, mayonesa (aceite girasol, agua, yema de huevo, vinagre, azúcar, sal, zumo de limón, especias, aromas); aceite de oliva virgen extra; nata y sal.
11E	Tomate (67.5%), pimiento (19%), pepino (8%), cebolla, aceite de oliva virgen extra (2.8%), vinagre Jerez, sal y ajo.
12F	Tomate, pimiento, pepino, cebolla, aceite de oliva (3.0 %), vinagre de vino, sal, azúcar y ajo.
13G	Tomate, pimiento, pepino, cebolla, aceite de oliva virgen (2 %), vinagre de vino, sal, ajo y limón.
14H	Tomate (78%), pimiento (5%), pepino (6%), cebolla, aceite de oliva virgen extra (3%), vinagre de vino de Jerez, sal, ajo y zumo de limón.

## **4.2. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS PARA ESTIMAR LA CALIDAD DE LOS ALIMENTOS**

### *4.2.1. Enzimas y microorganismos*

#### *4.2.1.1. Peroxidasa*

La actividad peroxidásica se determina espectrofotométricamente siguiendo el método propuesto por Ponce et al. (2004) con algunas modificaciones.

#### *Reactivos*

- Guayacol, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Peróxido de hidrógeno, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Disolución amortiguadora fosfato sódico 0.05M, pH 6.5.
- Mezcla sustrato: 10 mL guayacol (1%, p/v), 10 mL peróxido de hidrógeno (0.3%, v/v), y 100 mL disolución amortiguadora de fosfato sódico 0.05M.

#### *Instrumentación*

- Espectrofotómetro UV/Vis, Perkin-Elmer Lambda 2.
- Centrífuga Jouan GT 422.

#### *Modo operatorio*

Se licua cada vegetal, se mezcla y se toman 20g del licuado, después se filtra y se centrifuga a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C, el sobrenadante se utiliza como fuente de enzimas. La peroxidasa se determina espectrofotométricamente a 470 nm, utilizando el guayacol como sustrato y el peróxido de hidrógeno como dador de hidrógeno.

Para ello se adicionan en la cubeta espectrofotométrica 2.9 mL de mezcla sustrato y 0.1 mL de sobrenadante. Una unidad de actividad se

define como un cambio en la absorbancia de 0.001 por minuto. Los ensayos se realizan por duplicado en 4 lotes independientes.

#### 4.2.1.2. *Lactobacillus plantarum*

*Lactobacillus plantarum* TMW1.460 se obtiene del DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). *L. plantarum* subcultivado se lleva a 20 mL de un medio MRS (Merck, Darmstadt, Alemania) y se deja crecer a 37°C durante 24h.

#### 4.2.1.3. *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas fluorescens* DSM 50090 se obtiene del DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Alemania). *P. fluorescens* subcultivado se lleva a 20 mL de un medio estándar I (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) y se deja incubar a 37°C durante 24h. Después de 24h de incubación, se llevan 50 µL de la suspensión a 20 mL medio fresco y se deja crecer otra vez durante 24h.

### 4.2.2. Parámetros físicoquímicos

#### 4.2.2.1. pH

El pH se determina por medida potenciométrica según A.O.A.C (1997) con un pH-metro Crison micro pH 2001 (Crison, España).

#### 4.2.2.2. Sólidos solubles

Los sólidos solubles (°Brix) de las muestras se determinan mediante un refractómetro digital ATAGO (ATC-1) (Atago Company Ltd., Japón).

#### 4.2.2.3. Densidad

La densidad se determina según A.O.A.C (1997) con un picnómetro de 50 mL (Afora, España).

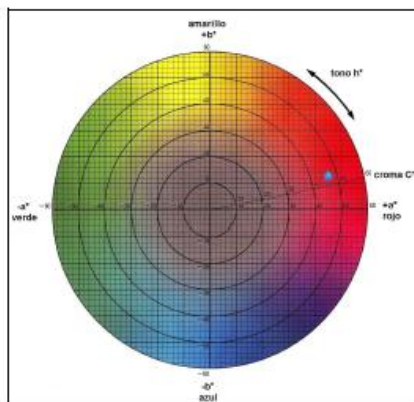
### 4.2.2.4. Color

El color se determina mediante un colorímetro Hunter Labscan II (Hunter associates laboratory, INC, Reston, Virginia, USA). Este equipo, a partir de los valores de reflectancia, proporciona las coordenadas del sistema cromático uniforme CIELab:  $L^*$  (luminosidad)= de negro (0) a blanco (100),  $a^*$ = color desde rojo (positivo) a verde (negativo) y  $b^*$ = color desde amarillo (positivo) a azul (negativo). En la Figura n° 12 se muestra el diagrama de color y las respectivas medidas definidas. A partir de los parámetros calculados automáticamente por el colorímetro ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ), se pueden calcular la saturación o matiz del color ( $C^*$ , chroma), el ángulo de color ( $h^0$ , hue angle) y las diferencias totales de color ( $\Delta E$ ). Para ello se aplican las siguientes ecuaciones:

$$h^0 \text{ (hue angle)} = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

$$C^* \text{ (chroma)} = [(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

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



**Figura n° 12.** Diagrama de color CIELab.

Según Cserhalmi et al. (2006) los cambios en el color se clasifican atendiendo al valor de  $\Delta E$  en: No apreciables ( $\Delta E$  0-0.5), ligeramente apreciables ( $0.5 < \Delta E < 1.5$ ), apreciables ( $1.5 < \Delta E < 3$ ), visibles ( $3 < \Delta E < 6$ ), notables ( $6 < \Delta E < 12$ ).

#### 4.2.2.5. Índice de turbidez

El índice de turbidez se determina espectrofotométricamente siguiendo el método propuesto por Krop y Pilnik (1974).

##### *Instrumentación*

- Espectrofotómetro UV/Vis, Perkin-Elmer Lamda 2.
- Centrífuga Jouan GT 422.

##### *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.

#### 4.2.2.6. Índice de pardeamiento

El índice de pardeamiento se determina espectrofotométricamente siguiendo el método propuesto por Meydav et al. (1977).

##### *Reactivos*

- Etanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda).

##### *Instrumentación*

- Espectrofotómetro UV/Vis, Perkin-Elmer Lamda 2.

##### *Modo operatorio*

Se toman 4 mL de la bebida correspondiente y se filtran. Se toma 1 mL del filtrado y se mezcla con 1 mL de etanol. La determinación del índice de pardeamiento se realiza mediante medida espectrofotométrica de la mezcla a 420 nm.

### 4.2.3. Compuestos bioactivos

#### 4.2.3.1. Ácido ascórbico

A lo largo del trabajo se utilizan 3 métodos diferentes para la determinación de ácido ascórbico en las muestras objeto de estudio.

##### 4.2.3.1.1. Polarografía diferencial de impulsos

El método elegido en el laboratorio del área de Nutrición y Bromatología (Universitat de València) para la determinación de ácido ascórbico por polarografía se basa en los procedimientos utilizados por Aparicio et al. (1992) en vegetales y Zulueta et al. (2009) en zumo de naranja mezclado con leche.

#### *Reactivos*

- Ácido ascórbico, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Disolución patrón de ácido ascórbico: se prepara una disolución de ácido ascórbico (1 mg/mL) en ácido oxálico al 1% (p/v). Se guarda en refrigeración y bajo condiciones de oscuridad.
- Ácido oxálico, Panreac (Barcelona, España).
- Ácido tricloroacético, J.T. Baker (Deventer, Holanda).
- Sulfato sódico, J.T. Baker (Deventer, Holanda).
- Ácido acético, Panreac (Barcelona, España).
- Acetato sódico, Panreac (Barcelona, España).
- Disolución amortiguadora ácido acético/acetato sódico 2M, pH=4.8.
- Solución extractante: ácido oxálico al 1% (p/v); ácido tricloroacético al 2% (p/v) y sulfato sódico al 1% (p/v).

### *Instrumentación*

- Polarógrafo Metrohm 746/647 V.A. Stand Trace Analyzer, acoplado a Dosimat Metrohm 685, Metrohm (Herisau, Switzerland).
- Eléctrodo de trabajo de mercurio de goteo continuo, Metrohm (Herisau, Switzerland).
- Eléctrodo de referencia de calomelanos saturados (Ag/AgCl, KCl 3M), Metrohm (Herisau, Switzerland).
- Eléctrodo auxiliar de hilo de platino Metrohm (Herisau, Switzerland).

### *Modo operatorio*

Se toman 5 mL de la bebida, se diluyen y enrasan a 25 mL con la solución extractante. La disolución se agita y posteriormente se filtra a través papel Whatman n° 1 (Whatman International Ltd., Reino Unido). 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. La concentración de ácido ascórbico se calcula mediante el método de las adiciones, se realizan adiciones de 25 µL de ácido ascórbico (1 µg/mL) a la muestra y después de cada adición se registra obteniendo una curva polarográfica.

#### 4.2.3.1.2. Electroforesis capilar

El método utilizado se basa en el propuesto por Brandolini et al. (1998) y se aplica durante la estancia realizada en el laboratorio del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche en la Università di Ferrara (Italia).

### *Reactivos*

- Ácido ascórbico, Roche (Basel, Switzerland).

## Parte experimental

---

- Disolución patrón de ácido ascórbico: se prepara una disolución de ácido ascórbico (1 mg/mL) en agua desionizada. A partir de esta disolución diariamente se preparan diferentes disoluciones patrón de 5, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 500 y 700 µg/mL.
- Etanol, Fluka, (Steinheim, Alemania).
- Glicerol, Fluka, (Steinheim, Alemania).
- Hidróxido sódico, Carlo Erba (Rodano, Italy).
- Tetraborato sódico, Carlo Erba (Rodano, Italy).
- Polietilenglicol, Carlo Erba (Rodano, Italy).
- Disolución amortiguadora: tetraborato sódico 0.25 M y polietilenglicol 0.05 M, pH=5.

### *Instrumentación*

- Sistema de electroforesis capilar de alta resolución P/ACE 2100 (Beckman Instruments, USA) equipado con un detector ultravioleta.
- Sistema capilar de silica: 57 cm, 30.075 mm I.D, 50 cm de longitud efectiva.

### *Modo operatorio*

Se toma 1 mL de muestra, se centrifuga a 3500 rpm durante 5 min, y se toman 10 µL de sobrenadante.

Se termorregula el sistema capilar de silica a 25°C y se acondiciona secuencialmente mediante presurización con hidróxido sódico (1 M) durante 5 minutos, agua durante 15 minutos y disolución amortiguadora durante 15 minutos. Se introducen los 10 µL del sobrenadante de la muestra en el sistema de separación capilar por inyección hidrodinámica a 0.5 psi durante 5 s. La separación se realiza con un voltaje de 28 kV aplicado a través del capilar y se determina a



una longitud de onda de 254 nm. Después de cada separación, se lava el sistema capilar secuencialmente con hidróxido sódico (1 M) durante 0.5 minutos y disolución amortiguadora durante 2.5 minutos. La concentración de ácido ascórbico se calcula interpolando en la curva de calibrado previamente establecida.

### 4.2.3.1.3. Cromatografía líquida de alta resolución

El método utilizado se basa en el propuesto por Rückemann (1980). Se aplica durante la estancia realizada en el laboratorio del Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering en la Technological University of Berlin (Alemania).

#### *Reactivos*

- Ácido ascórbico, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Disolución patrón de ácido ascórbico: se preparan varias disoluciones de 5-100 mg/100mL de ácido ascórbico en ácido metafosfórico al 6% (p/v).
- Ácido metafosfórico, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Tetrabutilamonio hidrogenosulfato, Fluka, (Steinheim, Alemania).
- Metanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Fase móvil: Se disuelven 2.5 g de tetrabutilamonio hidrogenosulfato en 945 mL de agua destilada y 55 mL de metanol.

#### *Instrumentación*

- Sistema cromatográfico Knauer GmbH (Berlin, Germany), el cual consta de controlador, bomba, columna, detector UV-vis e integrador.

## Parte experimental

---

- Columna de fase reversa C18 Kieselgel ODS de 250 mm de largo, 4 mm de diámetro y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula.

### *Modo operatorio*

Se toman 400  $\mu\text{L}$  de la muestra, se diluyen y enrasan a 2 mL con ácido metafosfórico al 6% (p/v), se filtran (tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ ) y se inyectan 20  $\mu\text{L}$  en el cromatógrafo. Para la elución del ácido ascórbico se utiliza la fase móvil a un flujo de 1 mL/min y la detección se realiza a longitud de onda de 250.7 nm.

### *4.2.3.2. Carotenoides totales.*

El contenido en carotenoides totales se determina espectrofotométricamente siguiendo el método propuesto por Lee y Castle (2001).

### *Reactivos*

- Hexano, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Acetona, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Etanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Mezcla: hexano/acetona/etanol (50:25:25, v/v).

### *Instrumentación*

- Espectrofotómetro UV/Vis, Perkin-Elmer Lambda 2.
- Centrífuga Jouan GT 422.

### *Modo operatorio*

Se mezclan 2 mL de la bebida correspondiente con 5 mL de la mezcla y se centrifuga durante 5 min a 4000 rpm a 5°C. Se toma 1 mL del sobrenadante. Se enrasa hasta 25 mL con hexano. La determinación de los carotenoides totales se lleva a cabo con una alícuota del extracto anterior mediante medida espectrofotométrica de la absorbancia a 450

nm. Los carotenoides totales se calculan de acuerdo a lo establecido por Ritter y Purcell (1981) usando como coeficiente de extinción el del  $\beta$ -caroteno ( $E^{1\%} = 2505$ ).

#### *4.2.3.3. Fenoles solubles totales*

La determinación de fenoles solubles totales de las diferentes bebidas se lleva a cabo siguiendo el método descrito por Singleton y Rossi (1965).

#### *Reactivos*

- Carbonato sódico ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), J.T. Baker, (Deventer, Holanda).
- Folin-Ciocalteu (molibdotungstato de amonio), Sigma-Aaldrich (Steinheim, Alemania).
- Reactivo de Folin-Ciocalteu (50%, v/v): La solución se mantiene estable durante un mes en botella opaca en la nevera.
- Ácido gálico, calidad para análisis, UCB (Bruselas, Bélgica).
- Etanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Disolución patrón de ácido gálico: se prepara una disolución “madre” de ácido gálico (10 mg/mL) en etanol y se almacena en la nevera. La disolución de trabajo (1 mg/mL) se prepara diariamente, para ello, la disolución “madre” se ultrasonica durante 1 min y se toma 1 mL de ésta y se enrasa a 10 mL con agua desionizada.

#### *Instrumentación*

- Espectrofotómetro UV/Vis, Perkin-Elmer Lamda 2.
- Centrífuga Jouan GT 422.

#### *Modo operatorio*

Se toman 100  $\mu\text{L}$  de muestra, y se adicionan 3 mL de una disolución de carbonato sódico al 2%. A continuación se añaden 100 mL del

## Parte experimental

---

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. Las muestras con un contenido superior se diluyen convenientemente con agua desionizada.

### 4.2.3.4. Antocianinas

La determinación de antocianinas totales, monoméricas y poliméricas así como el índice monomérico de las diferentes bebidas se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Mazza et al. (1999).

#### *Reactivos*

- Ácido clorhídrico 37%, J.T. Baker (Deventer, Holanda).
- SO<sub>2</sub> 5% (p/v), J.T. Baker (Deventer, Holanda).

#### *Instrumentación*

- Espectrofotómetro UV/Vis. Lambda 20 (Perkin-Elmer, Überlingen, Germany).

#### *Modo operatorio*

Para la determinación de las antocianinas totales se toman 100  $\mu$ L del zumo de arándanos diluido (1:10, v/v) con agua destilada y se adicionan 1700  $\mu$ L de agua destilada y 200  $\mu$ L de ácido clorhídrico al 5% (v/v), se mezcla por inversión y se deja en reposo durante 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se mide la absorbancia a 520 nm ( $A_{520}$ ). Por otra parte, para determinar las antocianinas poliméricas, se mezclan 100  $\mu$ L de zumo diluido, 800  $\mu$ L de SO<sub>2</sub> 5% (p/v), 1700  $\mu$ L de agua destilada y 200  $\mu$ L de ácido clorhídrico al 5% y

se mide la absorbancia a 520 nm ( $A^{502}$ ). Las antocianinas monoméricas se obtienen por diferencia entre las antocianinas totales ( $A^{ta}$ ) y las poliméricas ( $A^{502}$ ). A partir de estas medidas se calcula el índice monomérico en unidades de absorbancia de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Índice monomérico} = (A^{ta} - A^{502}) / A^{502}$$

El cálculo de las antocianinas totales se basa en la malvidina-3-glucósido cuyo coeficiente de absortividad molar es de 28000.

### 4.2.3.5. Vitaminas liposolubles

En este trabajo se pone a punto y se valida un método de determinación por cromatografía líquida de vitamina D (colecalfiferol y ergocalciferol) y vitamina E ( $\alpha$ ,  $\delta$ , y  $\gamma$ - tocoferol) en zumo mezcla de frutas-leche, zumo de frutas, leche, fórmulas infantiles y bebidas de vegetales para poder de esta manera evaluar su calidad nutritiva.

### Reactivos

- Colecalciferol, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Ergocalciferol, Fluka (Buchs, Suiza).
- $\alpha$ -tocoferol, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- $\delta$ -tocoferol, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- $\gamma$ -tocoferol, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Disoluciones patrón: 225 mg de  $\delta$ -tocoferol se diluyen en 5 mL de etanol con BHT al 0.025% (p/v), 10 mg de ergocalciferol en 100 mL de etanol con BHT al 0.025% (p/v), 10 mg de colecalfiferol en 100 mL de etanol con BHT al 0.025% (p/v), 5 mg de  $\gamma$ -tocoferol se diluyen en 2 mL de etanol con BHT al 0.025% (p/v), 100 mg de  $\alpha$ -tocoferol se diluyen en 2 mL de etanol con BHT al 0.025%. Las soluciones se conservan en

## Parte experimental

---

frascos topacio bajo atmósfera de  $N_2$  y en oscuridad a la menor temperatura posible ( $< -20^\circ C$ ), en estas condiciones son estables durante 3 meses.

- Terbutil-hidroxitolueno (BHT), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Ácido ascórbico, Merck (Darmstadt, Alemania).
- Hexano, Scharlau (Barcelona, España).
- Hidróxido potásico, Scharlau (Barcelona, España).
- Sulfato sódico, Scharlau (Barcelona, España).
- Hidroxicarbonato magnésico, Panreac (Barcelona, España).
- Acetonitrilo, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Etanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Dietil éter, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Metanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Fenolftaleína, J.T.Baker (Deventer, Holanda).

### *Instrumentación*

- Cromatógrafo: Prostar 210, con 2 bombas isocráticas, Varian Inc (California, USA).
- Detector UV-vis, Varian Inc (California, USA).
- Sistema degasificador, Degassit, MetaChem (USA).
- Software Varian STAR Chromatography Workstation Ver. 6.0., Varian Inc (California, USA).
- Termostatazador de columna, Prostar 510, Varian Inc (California, USA).
- Columna Kromasil 100 C18 (150 mm x 4.6 mm  $\varnothing$ , empaquetado con partículas de 5  $\mu m$ , Scharlab (Barcelona, Spain).
- Columna Kromasil 100 C18 (250 mm x 4.6 mm  $\varnothing$ , empaquetado con partículas de 5  $\mu m$ , Scharlab (Barcelona, Spain).

- Columna Microsorb-MV 100 C8 (250 mm x 4.6 mm Ø, empaquetado con partículas de 5 µm, Scharlab (Barcelona, Spain).
- Precolumna (guard column): Kromasil 100 C18 (150 x 4.6 mm Ø, cartucho con partículas de 5 µm, Scharlab (Barcelona, Spain).

### *Modo operatorio*

Se toman 10 g de muestra y se aplica el método propuesto por Escrivá et al. (2002). En estas condiciones, se observa que no es posible diferenciar los distintos vitámeros. Se estudian diferentes cantidades de muestra (20, 25, 30, 40 y 50 g) y se añaden distintas cantidades de KOH en etanol (50%, v/v) para realizar la saponificación (5, 10, 15 y 20mL) aplicando también cuatro temperaturas: ambiente (20-24°C), 40, 60 y 80°C durante 30 min, 1h, 2h y 24h. Debido a la sensibilidad de las diferentes vitaminas estudiadas a la oxidación y/o a la luz UV, la saponificación se realiza en atmósfera de nitrógeno y en oscuridad y se estudia la adición de ácido ascórbico ó BHT como antioxidantes. Los mejores resultados se obtienen cuando se toma 20-25 g de la muestra, se adicionan 25 mg de BHT como antioxidante y se saponifica con 15 mL de KOH en etanol (50%, p/v) durante 1 hora a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno y en oscuridad.

La fracción insaponificable se transfiere a un embudo de decantación y la extracción se realiza de acuerdo a lo propuesto por Escrivá et al. (2002). Sin embargo, no se obtienen buenos resultados. Por ello, se estudia realizar la extracción con éter dietílico y también con hexano (2x50 mL y 1x100 mL). Se comprueba como la mejor extracción se obtiene al utilizar 2x50 mL de hexano.

La fase orgánica se lava con 50 mL de una mezcla etanol-agua (15:35, v/v) durante 1 min para eliminar compuestos que puedan interferir sin que se produzcan pérdidas de vitaminas liposolubles y el proceso se

## Parte experimental

---

repite. Por último se lava con agua hasta neutralización, para asegurar que los residuos de KOH se han eliminado.

Se recoge la fase orgánica en un matraz topacio de fondo redondo y se evapora en el rotavapor (40°C). El residuo se recoge con 4 mL de éter dietílico, se transfiere a un vial topacio y se lleva a sequedad bajo corriente de N<sub>2</sub>. En estas condiciones se conserva en refrigeración (4±2°C) hasta el momento de la medida cromatográfica.

Finalmente se redisuelve con 1, 0.5 y 0.3 mL de etanol o metanol. Los mejores resultados se obtuvieron después de disolver con 0.5 mL de metanol, que permite la detección y cuantificación de cada una de las vitaminas. Las muestras preparadas de esta manera se filtran a través de filtros con un tamaño de poro de 0.22 µm y se inyectan en el cromatógrafo. En la Figura n° 13 se muestra un diagrama del proceso final de extracción.



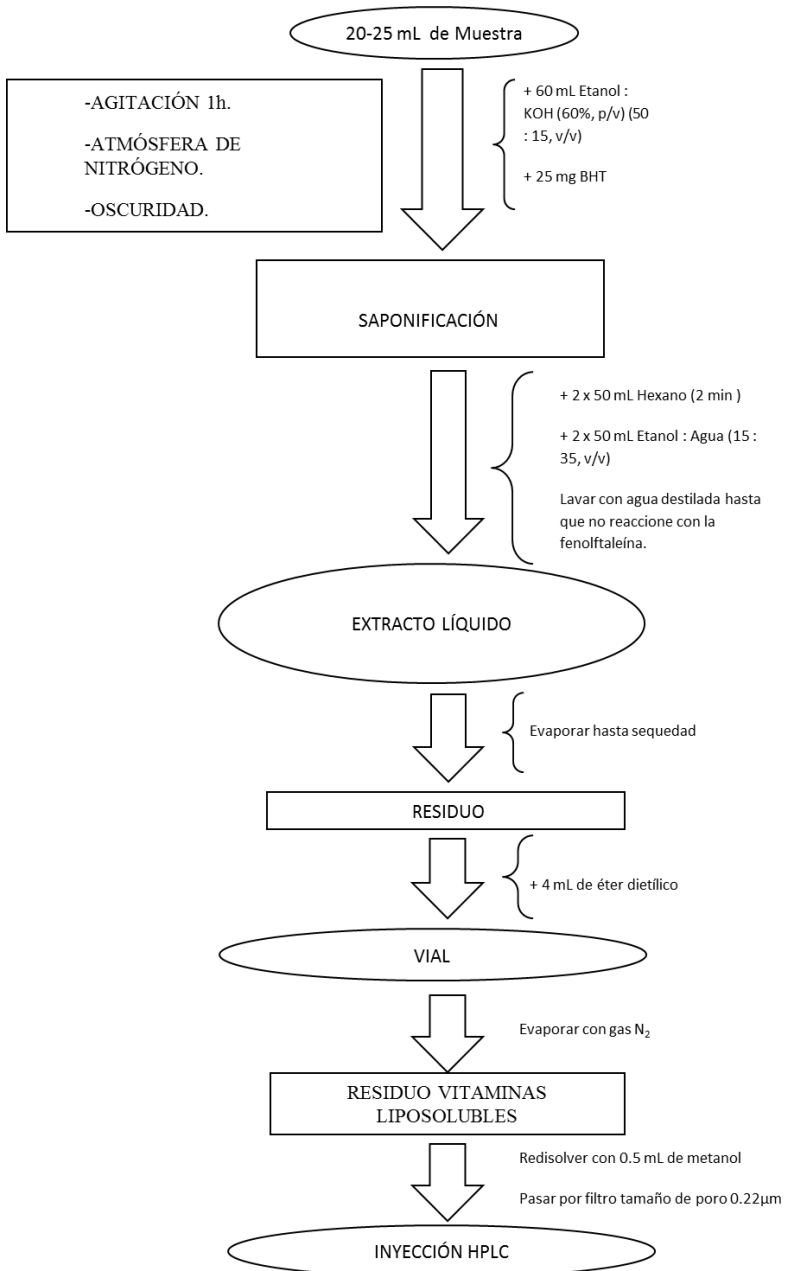


Figura nº 13. Diagrama de extracción de las vitaminas liposolubles.

## Parte experimental

El ergocalciferol, colecalciferol, así como  $\alpha$ -,  $\delta$ - y  $\gamma$ -tocoferol presentan una absorción máxima a diferentes longitudes de onda. La longitud de onda a la cual se observa la mejor respuesta para la detección simultánea de las vitaminas estudiadas es 265 nm.

Además se estudia la utilización de diferentes columnas cromatográficas: Kromasil 100 C18 (5  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm), Kromasil 100 C18 (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm) y Microsorb-MV 100 C8 (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm). En este caso, se descarta la utilización de la columna Microsorb-MV 100 C8 (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm) ya que no se obtiene una buena separación de los picos cromatográficos, al solaparse los correspondientes al ergocalciferol y colecalciferol ( $\alpha < 1$ ). En el Cuadro n° 5 se muestran los tiempos de retención obtenidos para cada una de las columnas estudiadas.

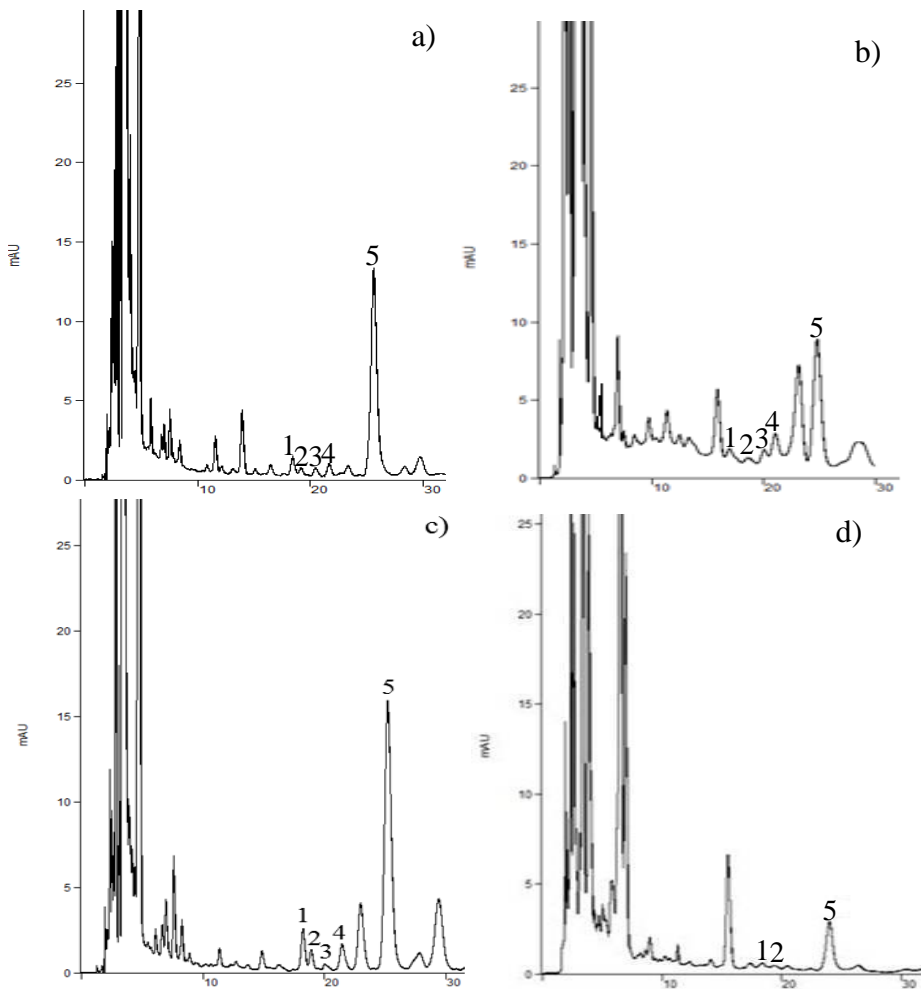
**Cuadro n° 5.** Tiempos de retención de acuerdo a la columna y flujo de fase móvil utilizados (mL/min).

Columna	C8		C18			
Tamaño	25 cm		15 cm		25 cm	
FM						
mL/min	1	1.5	1	1.5	1	1.5
$\delta$ - T	11.00 $\pm$ 0.16	9.36 $\pm$ 0.01	16.32 $\pm$ 0.28	9.84 $\pm$ 0.04	18.45 $\pm$ 0.49	17.66 $\pm$ 0.28
D <sub>2</sub>	-	-	17.30 $\pm$ 0.28	-	19.38 $\pm$ 0.53	18.74 $\pm$ 0.42
D <sub>3</sub>	-	-	19.33 $\pm$ 0.33	11.11 $\pm$ 0.05	20.75 $\pm$ 0.58	19.97 $\pm$ 0.19
$\gamma$ - T	12.13 $\pm$ 0.17	10.35 $\pm$ 0.01	19.60 $\pm$ 0.36	11.77 $\pm$ 0.06	22.27 $\pm$ 0.62	21.21 $\pm$ 0.23
$\alpha$ - T	13.15 $\pm$ 0.19	11.22 $\pm$ 0.03	22.98 $\pm$ 0.42	13.82 $\pm$ 0.05	26.33 $\pm$ 0.78	24.82 $\pm$ 0.28

FM: Fase Móvil.  $\delta$  - T: Delta Tocoferol. D<sub>2</sub>: Ergocalciferol. D<sub>3</sub>: Colecalciferol.  $\gamma$  - T: Gamma Tocoferol.  $\alpha$  - T: Alfa Tocoferol.

La columna seleccionada es la Kromasil 100 C18 (5  $\mu$ m, 150 x 4.6 mm). Después de modificar el flujo de fase móvil en las diferentes columnas, se comprueba que 1 mL/min permite la perfecta resolución de los picos cromatográficos, así como una disminución en el tiempo de análisis. También se ensayan diferentes temperaturas de análisis (16-28°C) para la columna, observando que la mejor resolución de los picos cromatográficos se obtiene cuando la temperatura es de 22°C. En la

Figura n° 14 se muestran los cromatogramas obtenidos después de aplicar el método establecido en muestras de leche, fórmula infantil, zumo de frutas mezclado con leche y una bebida de vegetales.



**Figura n° 14.** Cromatogramas de una muestra de leche enriquecida con vitaminas A, D y E (a); una fórmula infantil enriquecida con vitaminas A, D y E (b); una muestra comercial de zumo de frutas mezclado con leche enriquecido con vitaminas A, D y E (c) y una muestra comercial de una bebida a base de vegetales (d). (1) delta tocoferol, (2) ergocalciferol, (3) colecalciferol, (4) gamma tocoferol, (5) alfa tocoferol.

## Parte experimental

Con el objeto de verificar la calidad y bondad del método, se determinan los distintos parámetros analíticos: linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud.

Para calcular la linealidad se inyectan mezclas de las disoluciones patrón de las vitaminas estudiadas con 6 niveles diferentes de concentración, observando en todos los casos que la respuesta es lineal (Cuadro n° 6). Para el cálculo del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se preparan seis disoluciones de patrones y se aplica el cociente entre la desviación estándar de las disoluciones y la pendiente de la curva de calibrado  $LOD = 3 \cdot S_{n-1}/m$  and  $LOQ = 10 \cdot S_{n-1}/m$  (Ball 1996; López-Cervantes et al., 2006; Romeu-Nadal et al., 2006). Los valores obtenidos se muestran en el Cuadro n° 6.

**Cuadro n° 6.** Límites de detección y cuantificación y linealidad del método cromatográfico para la determinación de vitaminas liposolubles.

Parámetro	$\delta - T$	$D_2$	$D_3$	$\gamma - T$	$\alpha - T$	
LOD (ng)	0.05	0.82	1.57	1.13	1.41	
LOQ (ng)	0.15	1.46	5.23	0.33	1.18	
	b	56.8	$3 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	93.1	$7 \cdot 10^4$
Linealidad	a	$6 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	$9 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^6$
$y = bx+a$	$r^2$	0.993	0.999	0.994	0.999	0.994
	Intervalo ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ )	10-450	0.100-0.750	0.100-0.750	10-750	100-2000

$n = 6$ .  $y$ : área de pico.  $x$ : concentración.  $r^2$ : coeficiente de correlación.  $\delta - T$ : Delta Tocoferol.  $D_2$ : Ergocalciferol.  $D_3$ : Colecalciferol.  $\gamma - T$ : Gamma Tocoferol.  $\alpha - T$ : Alfa Tocoferol.

La precisión instrumental se obtiene a partir de seis inyecciones consecutivas de un extracto obtenido a partir de una alícuota de muestra y se expresa como desviación estándar relativa (RSD%). La precisión del método se obtiene después de preparar seis extractos obtenidos a partir de 6 alícuotas diferentes y se expresa como desviación estándar relativa (RSD%). Los resultados obtenidos tanto de la precisión instrumental como del método para cada una de las

muestras analizadas se muestran en el Cuadro n° 7. Debido a que no se encuentra muestra certificada similar a las muestras a analizar, la exactitud del método se evalúa mediante ensayos de recuperación. Para ello se adiciona una cantidad conocida de las disoluciones patrón de las diferentes vitaminas. Los porcentajes de recuperación obtenidos se muestran en el Cuadro n° 7.

**Cuadro n° 7.** Precisión instrumental, precisión del método y exactitud para las diferentes muestras analizadas.

Parámetro	Muestras	$\delta$ - T	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	$\gamma$ - T	$\alpha$ - T
Precisión Instrumental (RSD%)	ZN	1.9	3.9	-	2.1	3.6
	L	3.5	4.2	2.6	4.0	2.4
	FI	2.0	2.4	1.7	2.2	3.4
	ZFL	3.7	4.1	2.2	2.5	2.6
	BV	3.2	3.8	-	2.4	3.6
Precisión Método (RSD%)	ZN	6.4	8.0	-	5.8	5.5
	L	7.5	7.6	4.2	6.4	7.2
	FI	8.6	6.7	3.3	6.2	6.9
	ZFL	8.0	5.6	4.3	6.3	7.2
	BV	6.2	7.2	-	6.9	7.2
Exactitud (%)	ZN	92.4	84.2	-	102.2	99.0
	L	84.8	83.7	108.7	92.8	92.9
	FI	85.7	92.2	93.3	95.6	100.1
	ZFL	102.1	90.3	101.8	86.5	91.2
	BV	95.8	111.1	-	89.1	98.4

n = 6.  $\delta$  - T: Delta Tocoferol. D<sub>2</sub>: Ergocalciferol. D<sub>3</sub>: Colecalciferol.  $\gamma$  - T: Gamma Tocoferol.  $\alpha$  - T: Alfa Tocoferol. ZN: Zumo de Naranja. L: Leche. FI: Fórmula Infantil. ZFL: Zumo de Frutas mezclado con Leche. BV: Bebida a base de Vegetales.

Los resultados obtenidos permiten afirmar que el método es adecuado para la cuantificación de  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -Tocoferol así como ergocalciferol y colecalciferol en leche, fórmula infantil, zumo de naranja, zumo de frutas mezclado con leche y bebidas a base de vegetales. Los resultados obtenidos al cuantificar las diferentes muestras se pueden ver en el Cuadro n° 8.

## Parte experimental

**Cuadro n° 8.** Cuantificación de las vitaminas liposolubles para diferentes muestras comerciales.

Muestras	$\delta$ - T	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	$\gamma$ - T	$\alpha$ - T
ZN ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ )	17.3 (1.1)	0.117 (0.009)	-	10.0 (0.6)	1752.0 (95.6)
L ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ )	50.8 (3.8)	0.145 (0.011)	0.384 (0.017)	39.7 (2.5)	1707.5 (122.5)
FI ( $\mu\text{g}/100 \text{ g}$ )	900.9 (1.8)	5.946 (0.140)	8.042 (0.138)	1604.1 (3.1)	6180.7 (21.0)
ZFL ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ )	58.6 (4.7)	0.178 (0.010)	0.526 (0.022)	292.2 (18.4)	1535.0 (111.1)
BV ( $\mu\text{g}/100 \text{ mL}$ )	3.4 (0.2)	0.117 (0.008)	-	15.9 (1.1)	227.1 (16.3)

n = 6. ( ): desviación estándar.  $\delta$  - T: Delta Tocoferol. D<sub>2</sub>: Ergocalciferol. D<sub>3</sub>: Colecalciferol.  $\gamma$  - T: Gamma Tocoferol.  $\alpha$  - T: Alfa Tocoferol. ZN: Zumo de Naranja. L: Leche. FI: Fórmula Infantil. ZFL: Zumo de Frutas mezclado con Leche. BV: Bebida a base de Vegetales.

#### 4.2.4. Capacidad antioxidante total

##### 4.2.4.1. Método TEAC

Se utiliza el método descrito por Re et al. (1999) modificado por Zulueta et al. (2009), basado en la capacidad de una muestra para inhibir el radical ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) en comparación con un patrón antioxidante de referencia (Trolox<sup>®</sup>).

##### Reactivos

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2 carboxílico), Sigma- Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Disolución “madre” de Trolox (5 mM): 31.25 g de Trolox se diluyen en 25 mL de etanol.
- Disolución patrón de Trolox: Para cada determinación se prepara una recta patrón mediante diluciones en serie (0.5, 2, 4.5, 8 y 12.5  $\mu$ M) a partir de la disolución “madre” de Trolox (5 mM).
- Etanol, 99.5%, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Radical ABTS<sup>•+</sup>: Para la preparación del radical ABTS<sup>•+</sup>, se parte de una disolución “madre” que se prepara mediante la adición de 440  $\mu$ l 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 disolución “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.

## Parte experimental

---

### *Instrumentación*

- Espectrofotómetro UV/Vis, Perkin-Elmer Lambda 2.
- Baño termostático conectado al espectrofotómetro, Julabo UC 5B (Julabo, Seelbach/Black Forest).

### *Modo operatorio*

La reacción de inhibición del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  se da en la propia cubeta de medida. Para ello se añaden 2 ml de la solución de trabajo del radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  y se mide la absorbancia inicial ( $A_0$ ) que deberá situarse alrededor de  $0.70 \pm 0.02$  a  $\lambda = 734$  nm. A continuación se adicionan 0.1 ml de la disolución patrón y se mide la absorbancia a los 20 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.

La muestra debe diluirse de manera que el valor obtenido se sitúe dentro de la recta de calibración. Para ello se estudian previamente diversas diluciones de la bebida en agua destilada (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).

#### *4.2.4.2. Método DPPH*

La capacidad antioxidante se determina por el método del secuestro del radical estable 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) según el método descrito por Brand-Williams et al. (1995).



### *Reactivos*

- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Disolución “madre” de Trolox (2 mM): 0.005 g de Trolox se diluyen en 1 mL de metanol para obtener una disolución 20 mM. Se toman 100  $\mu$ L de la disolución 20 mM, se diluyen y enrasan a 1 mL con metanol, obteniendo una disolución de Trolox 2 mM.
- Disolución patrón de Trolox: Para cada determinación se prepara diariamente una recta patrón mediante diluciones en serie (1, 0.5, 0.1, 0.05 mM) a partir de una disolución de Trolox 2 mM.
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Radical DPPH (0.06 mM): 2.3 mg de DPPH se diluyen en 100 mL de metanol. Una vez preparada la disolución es estable durante 2 días a temperatura ambiente.
- Metanol, J.T.Baker (Deventer, Holanda).

### *Instrumentación*

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

### *Modo operatorio*

Se añaden 1.45 mL de radical DPPH (0.06 mM) en la cubeta de medida y se mide la absorbancia a 515 nm ( $A_1$ ). A continuación se añaden 50  $\mu$ L de la bebida apropiadamente diluida y se anota el valor de absorbancia a los 15 min ( $A_2$ ). 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

## Parte experimental

---

o como % de inhibición respecto al blanco aplicando la siguiente expresión.

$$\% \text{ inhibición} = [(A_m - A_b) / A_b] * 100].$$

Donde  $A_m$  es la absorbancia de la muestra y  $A_b$  es la absorbancia del blanco.

Se interpola el valor obtenido en la recta de calibración para determinar los equivalentes de Trolox (mmol TE/L).

### 4.2.4.3. Método ORAC

Se aplica el método descrito por Ou et al. (2001) modificado por Zulueta et al. (2009).

#### *Reactivos*

- Fluoresceína, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- Fluoresceína (78 nM): Se prepara una disolución “madre” de fluoresceína 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 enrasándola a 25 mL con tampón fosfato.
- AAPH, 2,2'-azo-bis(2-metilpropionamidin) dihidrocloro, 97%, Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).
- AAPH (221.25 mM): Se prepara diariamente pesando 600 mg de AAPH y se lleva a 10 mL con tampón fosfato.
- Disolución “madre” de Trolox (1 mM). Es estable durante aproximadamente 2 meses en congelación a -20°C.
- Disolución patrón de Trolox (20 µM): Se prepara diariamente desde la disolución “madre”.

### *Instrumentación*

- Wallac 1420 VICTOR2 Perkin-Elmer (California, USA).
- Placas de 96 pocillos de fondo plano, Sero-Wel, Bibby Sterilin Ltd, (Stone, UK).

### *Modo operatorio*

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, para las muestras de zumo y para las de zumo-leche se realiza una dilución 1:250 y para la bebida a base de vegetales 1:100.

En cada pocillo de la placa se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de fluoresceína (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 transmisión 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:

$$\text{ORAC } (\mu\text{M TE}) = [(C_T \cdot (\text{AUC}_M - \text{AUC}_B) \cdot k) / (\text{AUC}_M - \text{AUC}_B)]$$

Donde ORAC es el valor de capacidad antioxidante total,  $C_T$  es la concentración del patrón de Trolox,  $\text{AUC}_M$  es el área bajo la curva de la muestra y  $\text{AUC}_B$  es el área bajo la curva del blanco.

### 4.2.4.4. Fotoquimioluminiscencia

El método para determinar la capacidad antioxidante total mediante el uso de la fotoquimioluminiscencia (PCL) está descrito por Popov y Lewin (1999) y comercializado por Analytik Jena AG (Jena, Germany) y se aplica durante la estancia realizada en el laboratorio del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche en la Università di Ferrara (Italia).

El sistema completo para realizar el ensayo PCL se vende bajo el nombre de PHOTOCHEM®. En el ensayo PCL, se combina la generación fotoquímica de los radicales libres con una detección sensible quimioluminiscente. La reacción se induce por excitación óptica ( $h\nu$ ) del fotosensibilizador (S), que da lugar al radical superóxido  $O_2^{\cdot-}$  (Vertuani et al., 2004; Prior et al., 2005).



En el sistema de medida por PCL existen dos tipos básicos de radicales: el radical superóxido y el radical luminol. Estos radicales son eliminados parcialmente por reacción con los antioxidantes presentes en la muestra. El luminol actúa como fotosensibilizador y también como reactivo para la detección del radical oxígeno (Vertuani et al., 2002). El método PCL permite determinar por separado la capacidad antioxidante de los compuestos hidro y liposolubles siguiendo dos protocolos diferentes: ACW y ACL. El protocolo ACW permite la medida de la capacidad antioxidante de los componentes hidrosolubles mientras que el ACL permite la medida de la capacidad antioxidante de los componentes liposolubles (Vertuani et al., 2004). Por otra parte, también se puede obtener la capacidad antioxidante integral (IAC), que representa la suma de la capacidad antioxidante hidro y lipofílica.

La calibración y medidas para el protocolo ACW se basan en la diferencia en el tiempo de reposo (L) entre la muestra ( $L_1$ ) y el blanco ( $L_0$ ), expresado en segundos (Harrison et al., 2007).

$$L = L_0 - L_1$$

La capacidad antioxidante lipofílica (ACL) se determina por el grado de inhibición (I) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$I = 1 - S/S_0$$

Donde  $S_0$  es el área bajo la curva del blanco y  $S$  es el área bajo la curva de la muestra.

El ácido ascórbico y el Trolox son los reactivos utilizados para cuantificar la capacidad antioxidante hidrofílica (ACW) y lipofílica (ACL), respectivamente (Prior et al., 2005).

### *Reactivos*

- Reactivo 1: disolvente, Analytik Jena AG (Jena, Germany).
- Reactivo 2: solución amortiguadora, (pH=10.5), Analytik Jena AG (Jena, Germany).
- Reactivo 3: fotosensibilizador, Analytik Jena AG (Jena, Germany).

### *Instrumentación*

- Photochem instrument, Analytik Jena AG (Jena, Germany).

### *Modo operatorio*

ACW: consiste en mezclar 1.5 mL del *Reactivo 1*, 1 mL del *Reactivo 2* y 25  $\mu$ L del *Reactivo 3* para la medida del blanco. Posteriormente se añaden a esta mezcla 25  $\mu$ L de las muestras diluidas (1:3, v/v) con el *Reactivo 1*. Cada medida se realiza por triplicado.

ACL: consiste en mezclar 2.3 mL del *Reactivo 1*, 200  $\mu$ L del *Reactivo 2* y 25  $\mu$ L del *Reactivo 3* para la medida del blanco. Posteriormente se añaden a esta mezcla 25  $\mu$ L de las muestras diluidas (1:3, v/v) con el *Reactivo 1*. Cada medida se realiza por triplicado.

### 4.2.4.5. *Comparación de los métodos aplicados para la determinación de capacidad antioxidante total*

Para evaluar la capacidad antioxidante total (CAT) de los diferentes alimentos, se han llevado a cabo numerosos estudios, pero a pesar de ello no existe un método oficial estandarizado, por ello se recomienda la utilización de distintos métodos de medida (Frankel y Meyer, 2000; Zielinska et al, 2007; Zulueta et al., 2009). Los métodos utilizados para la medida de la CAT se clasifican fundamentalmente en dos grupos dependiendo del mecanismo de reacción: métodos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) siendo el más utilizado el método ORAC y por otra parte encontramos los métodos basados en la transferencia de electrones (ET) entre los que destacan ABTS, también denominado TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) y el método DPPH (Huang et al, 2005). En la actualidad los métodos más utilizados son aquellos que se basan en la generación de especies radicalarias, determinando la desaparición de éstas por la presencia de antioxidantes (Arnao et al., 2001).

El ensayo TEAC o 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) se basa en el secuestro del radical catión  $ABTS^{\bullet+}$  por los antioxidantes presentes en la muestra. El radical  $ABTS^{\bullet+}$  tiene un color verde azulado con valores máximos de absorbancia a 645, 734 y 815 nm (Re et al., 1999). Cuando hay compuestos antioxidantes en el medio de reacción, capturan el radical libre, lo que lleva a una pérdida de color y a una reducción en la absorbancia, que corresponde cuantitativamente a la concentración de antioxidantes presentes.

El ensayo DPPH se basa en la reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se

realiza empleando soluciones patrón de ácido ascórbico o trolox (Brand-Williams et al., 1995; Samaniego-Sánchez et al, 2007).

El método ORAC, desarrollado inicialmente por Cao et al. (1993) consiste en la medida de la disminución en la fluorescencia de una proteína como resultado de la pérdida en su formación cuando ésta sufre daño oxidativo causado por una serie de radicales peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ). El método mide la capacidad de los antioxidantes presentes en la muestra para proteger a la proteína del daño oxidativo. La proteína usada en el método original fue la  $\beta$ -ficoeritrina, pero tenía una serie de desventajas, como la inconsistencia entre las distintas repeticiones, fotosensibilidad e interacción con los compuestos fenólicos pertenecientes a proteínas enlazantes no específicas. Para solucionar este problema, Ou et al. (2001) propusieron el uso de la fluoresceína (3', 6'-dihidroxi-9H-xanteno-2,7-diona) como la proteína objetivo.

En los métodos colorimétricos se utiliza como patrón el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), de naturaleza lipofílica, lo cual hace difícil ver la contribución de las sustancias de naturaleza hidrofílica. En las distintas matrices alimentarias nos encontramos con sustancias de naturaleza hidrofílica y lipofílica que contribuyen en mayor o menor medida a la capacidad antioxidante total del alimento.

La Fotoquimioluminiscencia (PCL) se basa en la inhibición de la autooxidación fotoinducida del luminol por antioxidantes, mediada por el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) y es capaz de medir las propiedades "scavenging" de los radicales tanto de antioxidantes de compuestos simples como de sistemas complejos (Besco et al., 2007). La PCL puede determinarse por dos protocolos diferentes, ACW (capacidad antioxidante de los compuestos hidrófilos) y ACL (capacidad antioxidante de los compuestos lipófilos).

En la fracción acuosa se encuentran los antioxidantes como flavonoides, ácido ascórbico, aminoácidos y otros de similar naturaleza, mientras que en la fracción lipídica nos encontramos vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), vitamina A ( $\beta$ -caroteno y otros carotenoides), entre otros.

En el laboratorio del área de Nutrición y Bromatología (Universitat de València) se determina, de forma rutinaria, la capacidad antioxidante por dos métodos diferentes (TEAC y ORAC) ya que en un trabajo previo se observa que dependiendo de las características de la matriz el resultado obtenido puede diferir (Zulueta et al., 2009). Por ello, durante la estancia en el laboratorio del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche en la Università di Ferrara (Italia) se determina la capacidad antioxidante total en las muestras de zumo de naranja con leche y en bebidas de vegetales, preparadas en el laboratorio, por los métodos TEAC, ORAC, DPPH y fotoquimioluminiscencia (ACW y ACL) y se comparan los resultados obtenidos.

Actualmente el interés en el estudio de la CAT en los alimentos y en particular en leche y vegetales está aumentando debido a su creciente comercialización y a que poseen una gran cantidad de compuestos antioxidantes (Dillon et al., 2003; Pulido, Hernández-García y Saura-Calixto, 2003; Pinilla et al., 2005; Zulueta et al., 2009).

Para evaluar los diferentes métodos se determinan los parámetros analíticos: linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión y exactitud.

### *Linealidad*

Se determina el intervalo de concentración que proporciona una respuesta lineal. En el Cuadro nº 9 se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los métodos aplicados. En todos los casos la respuesta es lineal, con un nivel de significancia  $p < 0.01$ . Sin embargo puede



observarse que los intervalos de concentración en cada uno de los métodos son diferentes, pero hay que considerar que en cada uno de ellos la dilución de la muestra es distinta así como también varía ésta según la matriz alimentaria. En el Cuadro n° 10 se muestran los intervalos de concentración en los que la respuesta es lineal pero teniendo en cuenta las diluciones realizadas en cada matriz alimentaria.

**Cuadro n° 9.** Linealidad

	Intervalo linealidad (n= 6)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación
<b>TEAC</b>	0-250 µM	$y^* = 0.19 x + 5.09$	0.999
<b>ORAC</b>	0-100 µM	$y = 50.9 x + 998.9$	0.992
<b>DPPH</b>	0-2000 µM	$y^* = 98.7 x + 0.9$	0.990
<b>ACL</b>	0-2.5 mM	$y = -73.8 x + 231.6$	0.958
<b>ACW</b>	0-3 mM	$y = 57.7 x + 2.3$	0.998

$y^*$ : % de inhibición;  $y$ : % área bajo la curva

$x$ : concentración de las disoluciones patrón

**Cuadro n° 10.** Intervalo de linealidad según la matriz, la dilución y el método aplicado

	Patrones	BV	ZL
<b>TEAC</b>	0-250 µM	0-2.5 mM (1:10)	0-6.25 mM (1:25)
<b>ORAC</b>	0-100 µM	0-10 mM (1:100)	0-25 mM (1:250)
<b>DPPH</b>	0-2000 µM	0-20 mM (1:10)	0-4 mM (1:2)
<b>ACL</b>	0-2.5 mM	0-7.5 mM (1:3)	0-50 mM (1:20)
<b>ACW</b>	0-3 mM	0-75 mM (1:25)	0-75 mM (1:25)

( ) dilución de la muestra; BV: Bebida de vegetales; ZL: Zumo de naranja mezclado con leche.

#### Límite de detección y cuantificación

Para calcular el límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se preparan diez blancos de reactivos y se estiman mediante las siguientes expresiones:  $LOD = 3 \cdot SD_{n-1}/m$  y  $LOQ = 10 \cdot SD_{n-1}/m$  (Federal Register, 1997).

## Parte experimental

---

Donde “SD” es la desviación estándar y “m” es la pendiente de la curva de calibrado.

En el Cuadro n° 11 se muestran los resultados obtenidos.

**Cuadro n° 11.** Sensibilidad

	Límite de detección	Límite de cuantificación
<b>TEAC</b>	8.1 $\mu\text{M}$	24.4 $\mu\text{M}$
<b>ORAC</b>	5.3 $\mu\text{M}$	16.0 $\mu\text{M}$
<b>DPPH</b>	4.3 $\mu\text{M}$	13.1 $\mu\text{M}$
<b>ACL</b>	13.5 $\mu\text{M}$	41.0 $\mu\text{M}$
<b>ACW</b>	5.0 $\mu\text{M}$	15.2 $\mu\text{M}$

### *Precisión*

La precisión instrumental y del método se calcula mediante la medida de seis repeticiones consecutivas de una misma muestra y de seis alícuotas independientes de una muestra, respectivamente, por cada uno de los métodos estudiados. Los resultados se muestran en los Cuadros n° 12 y 13.

**Cuadro n° 12.** Precisión instrumental y del método de la bebida de vegetales

Precisión					
	instrumental			método	
	<i>Media</i> $\pm$ <i>SD</i>	<i>CV (%)</i>	<i>S'</i>	<i>Media</i> $\pm$ <i>SD</i>	<i>CV (%)</i>
<b>TEAC</b>	1.33 $\pm$ 0.13	9,5	0.0159	0.80 $\pm$ 0.12	14,6
<b>ORAC</b>	2.60 $\pm$ 0.10	3.9	0.0102	2.90 $\pm$ 0.16	5.6
<b>DPPH</b>	0.50 $\pm$ 0.06	12.0	0.0037	0.56 $\pm$ 0.04	15.5
<b>ACL</b>	1.55 $\pm$ 0.04	2.5	0.0002	1.44 $\pm$ 0.22	10.4
<b>ACW</b>	0.66 $\pm$ 0.02	2.3	0.0002	0.66 $\pm$ 0.22	4.6

Media: capacidad antioxidante promedio (mM); SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; S': varianza muestral corregida de desviaciones estándar.

**Cuadro n° 13.** Precisión instrumental y del método de la bebida mezcla de zumo de naranja y leche

Precisión					
	instrumental			método	
	<i>Media±SD</i>	<i>CV (%)</i>	<i>S'</i>	<i>Media±SD</i>	<i>CV (%)</i>
<b>TEAC</b>	2.58±0.05	2.1	0.0029	2.29±0.22	9.7
<b>ORAC</b>	5.44±0.11	2.0	0.0111	5.68±0.08	1.4
<b>DPPH</b>	1.65±0.11	6.9	0.0128	1.68±0.19	11.1
<b>ACL</b>	1.55±0.48	15.3	0.0495	1.31±0.18	14.1
<b>ACW</b>	1.68±0.22	14.4	0.0390	1.30±0.26	20.1

Media: capacidad antioxidante promedio (mM); SD: desviación estándar; CV: coeficiente de variación; S': varianza muestral corregida de desviaciones estándar.

Para comparar la precisión de los métodos se analizan 6 alícuotas de una misma muestra por cada uno de ellos y se aplica un Test de comparación de varianzas, mediante la siguiente expresión:

$$(n_1-1)S'_1{}^2/(n_2-1)S'_2{}^2 > F^{\alpha}_{(n_1-1, n_2-1)}$$

donde  $S'^2$  es la varianza muestral corregida,  $n_1$  es el tamaño de la muestra de mayor tamaño,  $n_2$  es el tamaño de la muestra de menor tamaño,  $\alpha= 0.05$ , diferencias significativas al 95% y  $\alpha= 0.01$ , diferencias significativas al 99%

Los resultados obtenidos en el test de comparación de varianzas se muestran en el Cuadro n° 14. Puede observarse que todos los métodos son iguales en cuanto a precisión. Sin embargo, la precisión instrumental del método ACW difiere de los métodos TEAC, ORAC y DPPH cuando se aplica a la bebida de vegetales.

**Cuadro n° 14.** Comparación de la precisión entre los diferentes métodos aplicados para la determinación de la capacidad antioxidante.

		<b>BEBIDA DE VEGETALES</b>				
		<b>TEAC</b>	<b>ORAC</b>	<b>DPPH</b>	<b>ACL</b>	<b>ACW</b>
<b>ZUMO NARANJA-LECHE</b>	<b>TEAC</b>		1.558 *	4.360 *	10.823 **	66.331
	<b>ORAC</b>	0.073 *		2.799 *	6.950 **	42.573
	<b>DPPH</b>	0.224 *	0.867 *		2.483 *	15.212
	<b>ACL</b>	0.016 *	0.225 *	0.259 *		0.163 *
	<b>ACW</b>	0.021 *	0.285 *	0.329 *	0.788 *	

F<sup>0.05</sup>= 5.05; F<sup>0.01</sup>= 10.97

\* Varianzas iguales con una probabilidad del 95%

\*\* Varianzas iguales con una probabilidad del 99%

Se analizan 6 muestras por cada uno de los métodos y se realiza la comparación de medias mediante un test de datos apareados, de modo que si se cumple la siguiente expresión existen diferencias significativas en exactitud entre los métodos:

$$d/(s'_d/n^{1/2}) > t_{n-1}^{\alpha/2}$$

Donde  $d$  es la media de las diferencias de los resultados obtenidos por cada método,  $s'_d$  es la desviación estándar de las diferencias de los resultados obtenidos por cada método,  $n$  es el tamaño de la muestra, y  $\alpha = 0.05$ , diferencias significativas al 95%

De los resultados obtenidos se desprende que únicamente que no existen diferencias significativas al nivel de probabilidad del 95% entre el método ACL y ACW para determinar la capacidad antioxidante en una bebida a base de zumo y leche (Cuadro n° 15).

**Cuadro n° 15.** Comparación de la exactitud ( $d/(s'_d/n^{1/2})$ ) entre los diferentes métodos aplicados para la determinación de la capacidad antioxidante.

		BEBIDA DE VEGETALES				
		TEAC	ORAC	DPPH	ACL	ACW
ZUMO NARANJA-LECHE	TEAC		73.09	5.23	6.60	2.93
	ORAC	39.54		37.26	34.06	17.13
	DPPH	4.45	60.37		4.14	9.55
	ACL	9.52	42.97	2.76		8.21
	ACW	7.83	58.62	6.86	<b>0.09</b>	

$$t_{n-1}^{0.05/2} = 2.571$$

### *Ensayos de recuperación*

La exactitud de cada método se determina mediante ensayos de recuperación. A una muestra se le adiciona una cantidad conocida de patrón de Trolox y se determina la capacidad antioxidante por cada uno de los métodos estudiados antes y después de la adición. Los porcentajes de recuperación obtenidos se muestran en los Cuadros n° 16 y 17 para las dos matrices analizadas.

## Parte experimental

---

**Cuadro n° 16.** Exactitud para la bebida mezcla de vegetales

<b>Exactitud</b>				
	CAT muestra	Concentración Trolox	CAT muestra adicionada	Recuperación (%)
<b>TEAC</b>	1.64±0.05	2.5	3.99±0.09	94.2
<b>ORAC</b>	2.68±0.19	5.0	7.73±0.20	101.0
<b>DPPH</b>	0.63±0.01	1.25	1.87±0.02	99.2
<b>ACL</b>	1.79±0.05	3.0	4.21±0.04	96.8
<b>ACW</b>	0.31±0.03	0.5	0.80±0.07	98.8

CAT: capacidad antioxidante (mM); Concentración Trolox (mM)

**Cuadro n° 17.** Exactitud para la bebida mezcla de zumo de naranja y leche

<b>Exactitud</b>				
	CAT muestra	Concentración Trolox	CAT muestra adicionada	Recuperación (%)
<b>TEAC</b>	1.64±0.13	2.5	4.11±0.16	98.8
<b>ORAC</b>	5.56±0.15	5.0	10.47±0.24	98.2
<b>DPPH</b>	3.44±0.16	5.0	8.37±0.01	98.6
<b>ACL</b>	1.77±0.10	2.5	4.26±0.12	99.6
<b>ACW</b>	0.88±0.03	2.0	2.75±0.04	93.5

CAT: capacidad antioxidante (mM); Concentración Trolox (mM)

Los parámetros analíticos obtenidos indican que los diferentes métodos estudiados permiten la determinación de la capacidad antioxidante total de manera precisa y exacta en los alimentos estudiados, pudiendo cuantificar los cambios en la capacidad antioxidante que se produzcan durante el procesado y almacenamiento de los mismos.

En los apartados 4.3.1 y 4.4.1 se presentan los resultados obtenidos al aplicar los métodos estudiados a muestras comerciales de zumos de frutas mezclados con leche y bebidas a base de vegetales y además se detalla la evaluación de los resultados obtenidos en las mismas.

#### 4.2.5. Grasa y perfil de ácidos grasos

##### *Reactivos*

- Cloroformo, 99-99.4% ( $\delta = 1.47$  g/mL), Merck (Darmstadt, Alemania).
- Metanol, 99%, J.T.Baker (Deventer, Holanda).
- Mezcla cloroformo: metanol (2:1, v/v).
- Hexano, 99.5%, J.T. Baker (Deventer, Holanda).
- Hidróxido potásico, Scharlau (Barcelona, España).

##### *Instrumentación*

- Cromatógrafo: Focus Termo Finnigan (Termo Finnigan).
- Detector FID, Termo Finnigan.
- Software Chrom-Card Data System.
- Columna CP-Wax 52CB, Varian.
- Centrífuga Jouan GT 422.

##### *Modo operatorio*

Propuesto por Folch et al. (1957) y modificado por Manglano (1999). Éste método se basa en la extracción de la grasa por 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 y se añaden 50 mL de la mezcla de cloroformo: metanol. El embudo de decantación se agita durante 2 minutos. Se separa el contenido en 2 tubos de centrifuga (deben tener un peso similar) y se centrifugan a 7000 rpm durante 15 min a 10°C. Con una pipeta pasteur se recoge la fase inferior (cloroformo) y se coloca en un matraz de fondo redondo pasándola a través de un filtro separador de fases (Whatman n° 1). La fase superior (metanol) y la interfase (almidón, proteínas, etc) se introducen de nuevo en el embudo de decantación y se repite la

extracción. Se lava el filtro con cloroformo y se tapa el matraz hasta el momento de la evaporación en el rotavapor a 60-65°C. Una vez evaporado el cloroformo, el matraz se deja en estufa a 80°C durante 1 hora.

Obtenido el extracto seco en el matraz de fondo redondo, se redissuelve con hexano y se recoge en un tubo (hasta que no se obtenga color). Después, se evapora bajo corriente de N<sub>2</sub>.

Los lípidos han de saponificarse para liberar los ácidos grasos y a continuación formar los ésteres metílicos. Para la generación de los ésteres metílicos se añade 1 mL de hidróxido potásico en metanol (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 centrifuga a 2500 rpm durante 5 min a 10°C. Por último 1 µL se inyecta en el cromatógrafo de gases.

El programa de temperatura aplicado para la correcta separación de los diferentes picos cromatográficos se describe a continuación: la temperatura inicial es de 70°C y se aumenta hasta 180°C a 15°C/min durante un período de 8 min, después del cual, la temperatura se aumenta a 210°C a 5°C/min durante 5 min. Cuando se alcanzan 250°C, se mantiene durante 12 min. El tiempo total de análisis es de 25 min. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se identifican por comparación con los tiempos de retención de los patrones que se han inyectado previamente.

### *4.2.6. Índice de desintegración celular*

Se utiliza el método descrito por Angersbach et al. (1997; 1999) para evaluar el efecto de tecnologías no térmicas sobre la integridad de los tejidos biológicos. Este método se basa en los efectos de polarización interfacial del tipo Maxwell-Wagner en las interfases intactas de las membranas celulares. La medida de las propiedades eléctricas pasivas



frecuencia-dependientes de los sistemas celulares (para los tejidos vegetales los intervalos de frecuencia van de  $10^3$  a  $10^7$  Hz) permite la cuantificación del grado de desintegración de la membrana celular. Se utiliza un analizador de la impedancia (Electronic Manufacture Company, Mahlsdorf, Germany) para medir la frecuencia de las muestras colocadas en un sistema de electrodos compuesto de cilindros de acero.

El índice de desintegración celular (CDI) se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$CDI = 1 - b_k [(K_{HF} - K_{NF})' / (K_{HF} - K_{NF})] * 100$$

Donde  $K_{HF}$  y  $K_{NF}$  son los valores de conductividad eléctrica de la muestras sin tratar en el intervalo de alta y baja frecuencia,  $K_{HF}'$  y  $K_{NF}'$  son los valores de conductividad eléctrica de la muestra tratada y  $b_k$  es un factor de corrección. Los valores de CDI se encuentran entre 0 y 100 correspondiendo al 100% de células intactas y a la desintegración celular completa, respectivamente.

### **4.3. ZUMOS DE FRUTAS MEZCLADOS CON LECHE.**

#### *4.3.1. Caracterización de muestras comerciales a base de zumo de frutas con leche.*

Se realiza un análisis de las diferentes muestras comerciales descritas en apartado 4.1.4 y se procede a su caracterización.

##### *4.3.1.1. Parámetros fisicoquímicos*

Los resultados obtenidos para los parámetros fisicoquímicos pH, °Brix, índice de turbidez e índice de pardeamiento se muestran en el Cuadro n° 18.

Todas las bebidas analizadas tienen un pH comprendido en el intervalo 3.5-4.1. Este pH ácido es importante porque disminuye reacciones de oxidación y previene alteraciones microbiológicas en el producto (Zemel et al., 1990). Por ello, en los zumos comerciales suelen añadirse acidulantes (ej. ácido cítrico) que provocan la disminución del pH para prolongar su conservación (Cardona et al., 1992; Arranz., 2000).

En la mayoría de las bebidas, los valores de °Brix están dentro del intervalo de 12.6–15.3, excepto para las muestras 14E (6.1) y 15E (5.9) que presentan los menores valores de °Brix y que coinciden con los valores más bajos de hidratos de carbono declarados por los fabricantes en la etiqueta (4.2 y 4.0, respectivamente). La enorme variabilidad se debe 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 valores de índice de turbidez (1.691-2.729), e índice de pardeamiento (0.024-0.407) presentan una gran variabilidad debida fundamentalmente a la distinta composición y tratamiento de las muestras analizadas.

**Cuadro n° 18.** Parámetros fisicoquímicos de las bebidas de zumo y leche comerciales analizadas.

Muestras	pH	°Brix	IT	IP
1A	3.6±0.0 <sup>a</sup>	13.2±0.0 <sup>a</sup>	2.652±0.018 <sup>a</sup>	0.134±0.002 <sup>a</sup>
2A	3.8±0.0 <sup>b</sup>	13.2±0.0 <sup>a</sup>	2.567±0.045 <sup>bc</sup>	0.042±0.000 <sup>bc</sup>
3B	4.1±0.0 <sup>c</sup>	13.4±0.0 <sup>b</sup>	2.230±0.011 <sup>d</sup>	0.044±0.002 <sup>b</sup>
4B	3.9±0.0 <sup>d</sup>	13.7±0.1 <sup>c</sup>	2.607±0.027 <sup>ab</sup>	0.075±0.002 <sup>d</sup>
5C	3.9±0.0 <sup>d</sup>	13.9±0.1 <sup>d</sup>	2.668±0.006 <sup>ae</sup>	0.407±0.003 <sup>e</sup>
6C	3.7±0.0 <sup>e</sup>	14.3±0.1 <sup>e</sup>	2.504±0.020 <sup>cf</sup>	0.027±0.001 <sup>f</sup>
7C	3.8±0.0 <sup>f</sup>	13.0±0.0 <sup>f</sup>	2.642±0.022 <sup>ab</sup>	0.194±0.004 <sup>g</sup>
8C	3.5±0.0 <sup>h</sup>	14.3±0.1 <sup>e</sup>	2.605±0.007 <sup>ab</sup>	0.091±0.004 <sup>h</sup>
9C	4.0±0.0 <sup>i</sup>	15.3±0.1 <sup>g</sup>	2.729±0.012 <sup>g</sup>	0.040±0.001 <sup>b</sup>
10D	3.8±0.0 <sup>j</sup>	12.6±0.0 <sup>h</sup>	2.457±0.006 <sup>hi</sup>	0.056±0.001 <sup>i</sup>
11D	3.7±0.0 <sup>k</sup>	13.0±0.0 <sup>f</sup>	2.664±0.010 <sup>ag</sup>	0.074±0.002 <sup>d</sup>
12D	3.8±0.0 <sup>l</sup>	12.6±0.0 <sup>h</sup>	2.509±0.002 <sup>cf</sup>	0.041±0.001 <sup>bc</sup>
13D	4.0±0.0 <sup>i</sup>	14.4±0.0 <sup>e</sup>	2.520±0.008 <sup>cf</sup>	0.024±0.001 <sup>j</sup>
14E	3.7±0.0 <sup>m</sup>	6.1±0.1 <sup>i</sup>	2.308±0.033 <sup>j</sup>	0.057±0.003 <sup>i</sup>
15E	3.9±0.0 <sup>d</sup>	5.9±0.1 <sup>j</sup>	1.691±0.174 <sup>k</sup>	0.057±0.001 <sup>i</sup>
16F	3.6±0.0 <sup>a</sup>	13.1±0.1 <sup>af</sup>	2.304±0.024 <sup>dj</sup>	0.055±0.002 <sup>i</sup>
17F	3.5±0.0 <sup>n</sup>	13.0±0.0 <sup>f</sup>	2.399±0.020 <sup>h</sup>	0.118±0.003 <sup>k</sup>
18F	3.5±0.0 <sup>n̄</sup>	12.8±0.0 <sup>k</sup>	2.130±0.028 <sup>l</sup>	0.063±0.002 <sup>l</sup>

A-F indica el diferente fabricante. <sup>a-n̄</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. IT: índice de turbidez. IP: índice de pardeamiento.

Los valores de los parámetros de color obtenidos para las bebidas comerciales se muestran en el Cuadro n° 19. Existe una gran variabilidad en los parámetros de color analizados. Además, de la diferente composición de las bebidas cabe señalar que algunas bebidas comerciales poseen adicionados colorantes artificiales que modifican los valores de color de la fruta natural. La adición de colorantes a los zumos de fruta está permitida legalmente y se regula bajo la Directiva Europea

## Parte experimental

---

94/36/EC (EPC, 1994), destacando en las presentes muestras la adición de clorofila (E140), cúrcuma (E100) y carotenos (E160a).

Los valores más bajos de  $a^*$  corresponden a las muestras 5C ( $8.7 \pm 0.0$ ) y 7C ( $-4.7 \pm 0.0$ ) que contienen extractos de cúrcuma y además la muestra 5C presenta clorofila en su composición. Zulueta et al. (2007) después de analizar diferentes muestras comerciales a base de zumos de frutas y leche también atribuyen los valores más bajos de  $a^*$  a la presencia de clorofila y cúrcuma en la composición de las bebidas. Las muestras 4B y 11D son las que presentan los valores de  $a^*$  más altos 14.6 y 14.7, respectivamente. Los valores de  $a^*$  se correlacionan positivamente ( $p < 0.05$ ) con la presencia de frutas que contienen pigmentos que aportan una coloración rojo-anaranjada como son: albaricoque ( $r = 0.570$ ), guayaba ( $r = 0.677$ ), maracuyá ( $r = 0.654$ ), melocotón ( $r = 0.315$ ), naranja ( $r = 0.341$ ), papaya ( $r = 0.677$ ) y zanahoria ( $r = 0.654$ ).

La muestra 4B es la que presenta los valores más altos de  $b^*$  ( $36.1 \pm 0.0$ ) mientras que la 16F es la que presenta los más bajos ( $1.5 \pm 0.0$ ). Se observan correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) entre los valores de  $b^*$  y albaricoque ( $r = 0.376$ ), guayaba ( $r = 0.380$ ), mango ( $r = 0.389$ ), maracuyá ( $r = 0.389$ ), melocotón ( $r = 0.331$ ) y papaya ( $r = 0.380$ ), todas ellas incrementan el color amarillo de las bebidas, sin embargo, los valores más altos de  $b^*$  se correlacionan negativamente con la presencia de manzana ( $r = -0.283$ ,  $p < 0.05$ ).

La luminosidad de las muestras ( $L^*$ ) describe la capacidad de reflejar o transmitir la luz. En este estudio  $L^*$  está comprendida en el intervalo entre 36.4-58.4.

**Cuadro n° 19.** Parámetros de color de las bebidas de zumo y leche comerciales.

Muestras	a*	b*	L*	Chroma	h°
1A	13.0±0.1 <sup>a</sup>	25.1±0.2 <sup>a</sup>	40.2±0.1 <sup>ab</sup>	28.3±0.2 <sup>a</sup>	62.6±0.1 <sup>a</sup>
2A	-2.9±0.0 <sup>b</sup>	4.5±0.0 <sup>b</sup>	42.7±0.1 <sup>c</sup>	5.4±0.0 <sup>b</sup>	56.6±0.3 <sup>b</sup>
3B	2.4±0.0 <sup>c</sup>	32.9±0.5 <sup>c</sup>	41.4±0.3 <sup>d</sup>	33.0±0.5 <sup>c</sup>	85.9±0.0 <sup>c</sup>
4B	14.6±0.0 <sup>d</sup>	36.1±0.0 <sup>d</sup>	44.5±0.0 <sup>e</sup>	39.0±0.0 <sup>d</sup>	68.0±0.0 <sup>d</sup>
5C	-8.7±0.0 <sup>e</sup>	16.0±0.1 <sup>e</sup>	40.2±0.1 <sup>f</sup>	18.2±0.1 <sup>e</sup>	85.8±0.1 <sup>c</sup>
6C	-0.7±0.0 <sup>f</sup>	8.9±0.0 <sup>f</sup>	43.7±0.1 <sup>a</sup>	8.9±0.0 <sup>f</sup>	61.5±0.1 <sup>e</sup>
7C	-4.7±0.0 <sup>g</sup>	14.6±0.1 <sup>g</sup>	47.5±0.1 <sup>g</sup>	15.4±0.1 <sup>g</sup>	72.1±0.0 <sup>f</sup>
8C	4.8±0.1 <sup>h</sup>	20.1±0.2 <sup>h</sup>	45.0±0.4 <sup>h</sup>	20.6±0.2 <sup>h</sup>	76.7±0.0 <sup>g</sup>
9C	-1.6±0.0 <sup>i</sup>	5.6±0.0 <sup>i</sup>	58.4±0.3 <sup>i</sup>	5.8±0.0 <sup>i</sup>	74.2±0.2 <sup>h</sup>
10D	-1.8±0.1 <sup>j</sup>	6.7±0.1 <sup>j</sup>	47.7±0.3 <sup>g</sup>	7.0±0.1 <sup>j</sup>	75.2±0.7 <sup>i</sup>
11D	14.7±0.1 <sup>k</sup>	28.4±0.2 <sup>k</sup>	44.3±0.2 <sup>e</sup>	32.0±0.2 <sup>k</sup>	62.7±0.1 <sup>a</sup>
12D	3.1±0.0 <sup>l</sup>	21.6±0.2 <sup>l</sup>	46.0±0.1 <sup>j</sup>	21.8±0.2 <sup>l</sup>	81.9±0.0 <sup>j</sup>
13D	-0.5±0.0 <sup>m</sup>	8.4±0.0 <sup>m</sup>	43.2±0.0 <sup>k</sup>	8.5±0.0 <sup>m</sup>	86.9±0.0 <sup>k</sup>
14E	4.2±0.0 <sup>n</sup>	14.7±0.1 <sup>g</sup>	39.8±0.1 <sup>b</sup>	15.3±0.1 <sup>g</sup>	74.0±0.1 <sup>h</sup>
15E	0.8±0.0 <sup>n̄</sup>	17.5±0.1 <sup>n</sup>	36.8±0.2 <sup>l</sup>	17.5±0.1 <sup>n</sup>	87.4±0.1 <sup>l</sup>
16F	-3.4±0.1 <sup>o</sup>	1.5±0.0 <sup>n̄</sup>	40.2±0.4 <sup>a</sup>	3.7±0.1 <sup>n̄</sup>	23.7±0.1 <sup>m</sup>
17F	9.2±0.1 <sup>p</sup>	20.8±0.5 <sup>o</sup>	38.6±0.4 <sup>m</sup>	22.8±0.5 <sup>o</sup>	66.1±0.2 <sup>n</sup>
18F	2.3±0.1 <sup>q</sup>	16.3±0.3 <sup>f</sup>	36.4±0.4 <sup>n̄</sup>	16.4±0.3 <sup>p</sup>	82.1±0.0 <sup>j</sup>

A-F indica el diferente fabricante. <sup>a-q</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

## Parte experimental

---

### 4.3.1.2. *Ácido ascórbico*

Las concentraciones de ácido ascórbico en las bebidas comerciales se muestran en el Cuadro n° 20 situándose en el intervalo comprendido entre  $14.1 \pm 0.0$  y  $79.2 \pm 7.5$  mg/100 mL, observándose una gran variabilidad entre las muestras.

Se comprueba si la adición de vitamina C por parte del fabricante se corresponde con las concentraciones de ácido ascórbico halladas experimentalmente. Para ello se realiza un análisis ANOVA de un factor en la que se utiliza como factor el nivel de adición indicado por el fabricante en la etiqueta (9 y 30 mg/100 mL) (Anexo II), observando que existe una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre la media de vitamina C adicionada y las concentraciones halladas (30 y 62 mg/100 mL, respectivamente).

### 4.3.1.3. *Compuestos fenólicos*

La concentración de compuestos fenólicos solubles totales varía ampliamente de unas muestras a otras encontrándose valores de  $474.0 \pm 12.5$  mg GAE/L a  $1062.1 \pm 28.2$  mg GAE/L (Cuadro n° 20).

Dichas concentraciones difieren significativamente según la composición de las bebidas. Las muestras 4B, 5C, 8C y 18F presentan el mayor contenido de compuestos fenólicos que se correlaciona significativamente ( $p < 0.05$ ) con la presencia de: limón ( $r = 0.413$ ), melocotón ( $r = 0.551$ ) y manzana ( $r = 0.344$ ) en las bebidas analizadas.

También se observa que las muestras 6C y 13D que contienen las mismas frutas (piña y mango) y el mismo porcentaje de zumo (7%) presentan el menor contenido de fenoles ( $481.6 \pm 36.9$  y  $474.0 \pm 12.5$  mg/L, respectivamente). Teniendo en cuenta el porcentaje de zumo de cada muestra, se realiza un test de Pearson y se obtiene una correlación positiva ( $r = 0.744$ ,  $p < 0.05$ ) entre el contenido de fenoles solubles totales y el porcentaje de zumo.

**Cuadro n° 20.** Concentración de compuestos antioxidantes en bebidas de zumo y leche comerciales.

Muestras	AA (mg/100mL)	FST (mg GAE/L)	CT (µg/100mL)
1A	62.7±1.1 <sup>a</sup>	689.1±22.7 <sup>a</sup>	823.4±35.3 <sup>ab</sup>
2A	61.7±4.5 <sup>ab</sup>	676.9±17.9 <sup>a</sup>	ND
3B	65.7±2.7 <sup>a</sup>	835.1±59.1 <sup>bc</sup>	898.2±105.9 <sup>c</sup>
4B	71.5±0.5 <sup>c</sup>	1022.4±42.3 <sup>d</sup>	3131.2±123.5 <sup>d</sup>
5C	21.9±0.0 <sup>de</sup>	1050.9±86.6 <sup>d</sup>	ND
6C	23.9±1.3 <sup>de</sup>	481.6±36.9 <sup>e</sup>	374.3±35.3 <sup>ae</sup>
7C	14.1±0.0 <sup>f</sup>	833.9±8.7 <sup>bc</sup>	ND
8C	27.2±0.2 <sup>d</sup>	1061.2±50.0 <sup>d</sup>	336.8±17.6 <sup>aef</sup>
9C	19.1±0.9 <sup>ef</sup>	927.0±17.4 <sup>f</sup>	ND
10D	79.2±7.5 <sup>g</sup>	900.1±33.7 <sup>bf</sup>	ND
11D	78.4±4.6 <sup>g</sup>	827.7±58.1 <sup>bc</sup>	736.0±88.2 <sup>bc</sup>
12D	50.7±3.5 <sup>hi</sup>	933.7±64.8 <sup>f</sup>	187.1±17.6 <sup>ef</sup>
13D	48.2±0.4 <sup>h</sup>	474.0±12.5 <sup>e</sup>	ND
14E	38.4±1.3 <sup>j</sup>	874.1±34.4 <sup>bcf</sup>	237.0±17.6 <sup>aef</sup>
15E	45.1±0.0 <sup>h</sup>	690.8±32.3 <sup>a</sup>	324.4±35.3 <sup>aef</sup>
16F	56.0±1.9 <sup>ik</sup>	821.8±19.1 <sup>c</sup>	ND
17F	56.9±1.4 <sup>bi</sup>	932.8±126.8 <sup>f</sup>	511.5±52.9 <sup>g</sup>
18F	37.8±1.3 <sup>j</sup>	1062.1±28.2 <sup>d</sup>	1746.5±141.1 <sup>abe</sup>

A-F indica el diferente fabricante. <sup>a-k</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. AA: ácido ascórbico. FST: fenoles solubles totales. CT: carotenoides totales. ND: no detectable.

#### 4.3.1.4. Carotenoides totales

En todas las muestras los fabricantes adicionan 120 µg de vitamina A, excepto en la muestra 3B en la que el fabricante no indica la cantidad añadida (Anexo I).

De igual manera a lo observado para el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos, la concentración de carotenoides totales varía ampliamente de unas muestras a otras encontrándose valores de

## Parte experimental

---

187.1±17.6 µg/100mL a 3131.2±123.5 µg/100mL (veáse Cuadro n° 20). Las muestras que presentan mayor concentración de carotenoides totales son la 4B (3131.2±123.5) y la 18F (1746.5±141.1), ambas incorporan en su composición melocotón, limón y manzana así como las mismas vitaminas.

Se encuentran correlaciones entre las concentraciones de carotenoides totales y los valores de  $a^*$  ( $r= 0.707$ ,  $p<0.05$ ),  $b^*$  ( $r= 0.747$ ,  $p<0.05$ ) y ácido ascórbico ( $r= 0.421$ ,  $p<0.05$ ).

En la Figura n° 15 se muestran las bebidas según la escala de color obtenida ( $a^*b^*$ ). En los ejes de ordenadas y coordenadas se representan los valores de Chroma. Cabe destacar que la muestra 4B situada en la parte superior derecha (colores rojo-amarillentos intensos) es la que presenta mayor cantidad de carotenoides. También hay que destacar el contenido de carotenoides, muy similar en las muestras (1A, 3B, 11D) situadas en una posición similar a la 4B en el plano  $a^*b^*$ , mientras que las bebidas situadas en la parte inferior izquierda con valores negativos de  $a^*$  y valores de Chroma<20 son las que se caracterizan por su bajo contenido en carotenoides. Sin embargo, la muestra 18F no se ha podido encuadrar teniendo en cuenta el comentario anterior.



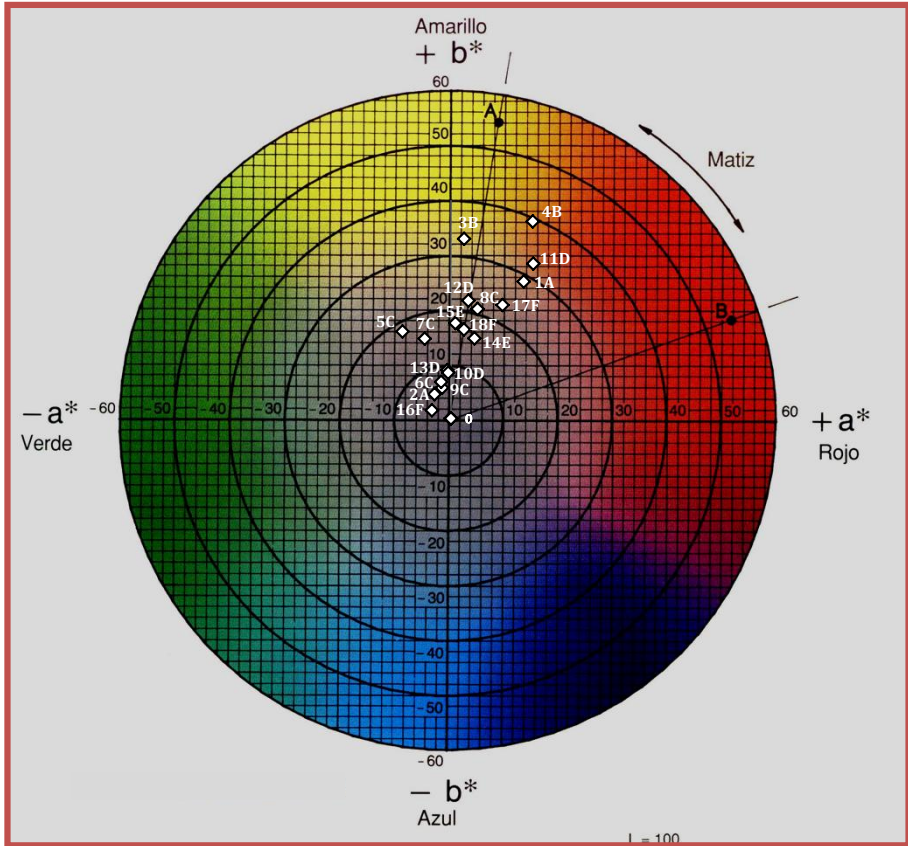


Figura n° 15. Posición de las bebidas de zumo con leche en el plano a\*b\*.

### *4.3.1.5. Capacidad antioxidante*

Como ya se ha descrito anteriormente, las muestras analizadas están adicionadas de vitaminas A, C y además los fabricantes declaran en la etiqueta que añaden 1.5 mg de vitamina E.

En el Cuadro n° 21 se muestra el valor de la capacidad antioxidante total de las bebidas de zumo con leche comerciales determinada con diferentes métodos analíticos.

En cualquier caso se observa una gran variabilidad en las muestras analizadas debido a la diferente composición de las mismas.

**Cuadro n° 21.** Capacidad antioxidante total de las bebidas de zumo y leche comerciales analizadas.

<b>Muestras</b>	<b>ACL (mM)</b>	<b>ACW (mM)</b>	<b>DPPH (mM)</b>	<b>TEAC (mM)</b>	<b>ORAC (mM)</b>
1A	6.45±0.21 <sup>a</sup>	4.45±0.07 <sup>a</sup>	4.48±0.06 <sup>a</sup>	5.74±0.05 <sup>ab</sup>	4.23±0.12 <sup>a</sup>
2A	6.93±0.00 <sup>b</sup>	4.20±0.14 <sup>b</sup>	3.99±0.04 <sup>bc</sup>	5.68±1.47 <sup>ab</sup>	5.00±0.09 <sup>bc</sup>
3B	6.08±0.25 <sup>cd</sup>	3.40±0.14 <sup>c</sup>	3.76±0.00 <sup>b</sup>	5.15±0.05 <sup>ac</sup>	4.49±0.14 <sup>ad</sup>
4B	11.45±0.07 <sup>e</sup>	3.90±0.14 <sup>d</sup>	4.11±0.04 <sup>c</sup>	6.43±0.80 <sup>b</sup>	5.72±0.12 <sup>e</sup>
5C	3.28±0.11 <sup>fg</sup>	1.65±0.07 <sup>e</sup>	1.47±0.04 <sup>d</sup>	2.47±0.05 <sup>d</sup>	2.91±0.09 <sup>f</sup>
6C	3.00±0.07 <sup>fh</sup>	1.30±0.05 <sup>f</sup>	1.01±0.04 <sup>e</sup>	2.15±0.21 <sup>de</sup>	3.23±0.25 <sup>g</sup>
7C	3.15±0.07 <sup>f</sup>	1.27±0.00 <sup>f</sup>	0.70±0.10 <sup>f</sup>	2.55±0.30 <sup>df</sup>	3.42±0.21 <sup>h</sup>
8C	3.57±0.05 <sup>g</sup>	0.83±0.05 <sup>gh</sup>	1.46±0.04 <sup>d</sup>	3.33±0.24 <sup>fg</sup>	6.38±0.10 <sup>i</sup>
9C	2.70±0.07 <sup>h</sup>	0.67±0.00 <sup>g</sup>	0.88±0.00 <sup>ef</sup>	1.75±0.13 <sup>h</sup>	1.84±0.10 <sup>j</sup>
10D	10.50±0.14 <sup>i</sup>	9.00±0.14 <sup>i</sup>	5.39±0.22 <sup>g</sup>	7.78±0.38 <sup>e</sup>	5.77±0.35 <sup>e</sup>
11D	8.23±0.05 <sup>j</sup>	5.20±0.14 <sup>j</sup>	5.08±0.11 <sup>h</sup>	5.45±0.63 <sup>a</sup>	4.63±0.07 <sup>d</sup>
12D	5.57±0.14 <sup>k</sup>	1.90±0.14 <sup>kl</sup>	3.02±0.11 <sup>i</sup>	4.44±0.45 <sup>ij</sup>	4.53±0.21 <sup>d</sup>
13D	5.80±0.19 <sup>ck</sup>	3.35±0.07 <sup>c</sup>	3.07±0.18 <sup>ij</sup>	4.17±0.30 <sup>gk</sup>	4.42±0.11 <sup>ad</sup>
14E	5.23±0.05 <sup>l</sup>	1.00±0.00 <sup>h</sup>	3.09±0.01 <sup>ij</sup>	5.39±0.09 <sup>a</sup>	3.85±0.06 <sup>k</sup>
15E	9.40±0.42 <sup>m</sup>	5.00±0.28 <sup>j</sup>	2.93±0.04 <sup>i</sup>	5.39±0.09 <sup>a</sup>	4.92±0.11 <sup>b</sup>
16F	6.57±0.14 <sup>a</sup>	2.10±0.14 <sup>k</sup>	3.28±0.16 <sup>j</sup>	5.59±0.23 <sup>a</sup>	5.20±0.20 <sup>c</sup>
17F	6.33±0.00 <sup>ad</sup>	3.70±0.00 <sup>d</sup>	4.01±0.28 <sup>c</sup>	5.48±0.43 <sup>a</sup>	4.41±0.10 <sup>ad</sup>
18F	4.20±0.09 <sup>n</sup>	1.85±0.07 <sup>el</sup>	2.28±0.04 <sup>k</sup>	3.89±0.14 <sup>gk</sup>	4.63±0.13 <sup>d</sup>

A-F indica el diferente fabricante. <sup>a-n</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

Con objeto de evaluar la contribución de la fruta que forma parte de la composición del zumo sobre la capacidad antioxidante total de las bebidas analizadas, se realiza un análisis multivariante para establecer las correlaciones existentes. Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro n° 22.

## Parte experimental

**Cuadro n° 22.** Coeficiente de correlación entre las frutas de las bebidas comerciales y la capacidad antioxidante total

Fruta	ACL	ACW	DPPH	TEAC	ORAC
Acerola	-	-	-	-	0.440
Albaricoque	-	-	0.348	-	-
Coco	0.432	0.707	0.412	0.472	-
Guayaba	-	-	0.494	-	-
Kiwi	-	-	-	-	-0.346
Lima	-	-	-	-	-0.346
Limón	-	-	-	0.344	0.671
Mango	-	-	-	-	-
Manzana	-	-	-	-	-
Maracuyá	-	-	-	-	-
Melocotón	-	-0.348	-	-	0.348
Naranja	0.437	0.373	0.422	0.500	0.401
Papaya	-	-	0.494	-	-
Piña	-	0.068	0.435	0.352	-
Plátano	-	-	0.399	-	-
Uva	-	-	-	-	-
Zanahoria	-	-	-	-	-

La influencia de las frutas en la capacidad antioxidante total varía dependiendo del método utilizado. En los métodos ACL y TEAC, la naranja es la fruta que más influye sobre la capacidad antioxidante ( $r=0.437$ ,  $p<0.05$ ) y ( $r=0.500$ ,  $p<0.05$ ), respectivamente. Las bebidas de guayaba y papaya presentan la mayor correlación para el DPPH ( $r=0.494$ ) y el limón es el de mayor influencia en el caso del ORAC ( $r=0.671$ ,  $p<0.05$ ).

Estos resultados se muestran de acuerdo con los obtenidos por Arnao et al. (1998) que tras determinar la capacidad antioxidante de zumos de limón, naranja y pomelo observan que el de limón presenta una capacidad antioxidante un 33% mayor que el de naranja y el de

pomelo y Gorinstein et al. (2001) mediante análisis TRAP (Total Radical Antioxidant Potential) encuentran una mayor capacidad antioxidante para el zumo de 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. En el Cuadro n° 23 se muestra los modelos obtenidos.

**Cuadro n° 23.** Contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante

Método	Ecuación	R <sup>2</sup> (%)
ACL	1.3455 +0.0963*[AA] -0.0002*[FST] -0.0005*[CT]	73.21
ACW	-0.5257 +0.0893*[AA] -0.0005*[FST] -0.0005*[CT]	67.39
DPPH	-0.3237 +0.0690*[AA] +0.0001*[FST] -0.0001*[CT]	93.42
TEAC	0.5717 +0.0731*[AA] +0.0007*[FST] -0.0001*[CT]	77.85
ORAC	1.9572 +0.0318*[AA] +0.0011*[FST] -0.0000*[CT]	37.71

AA: ácido ascórbico; FST: fenoles solubles totales; CT: carotenoides totales.

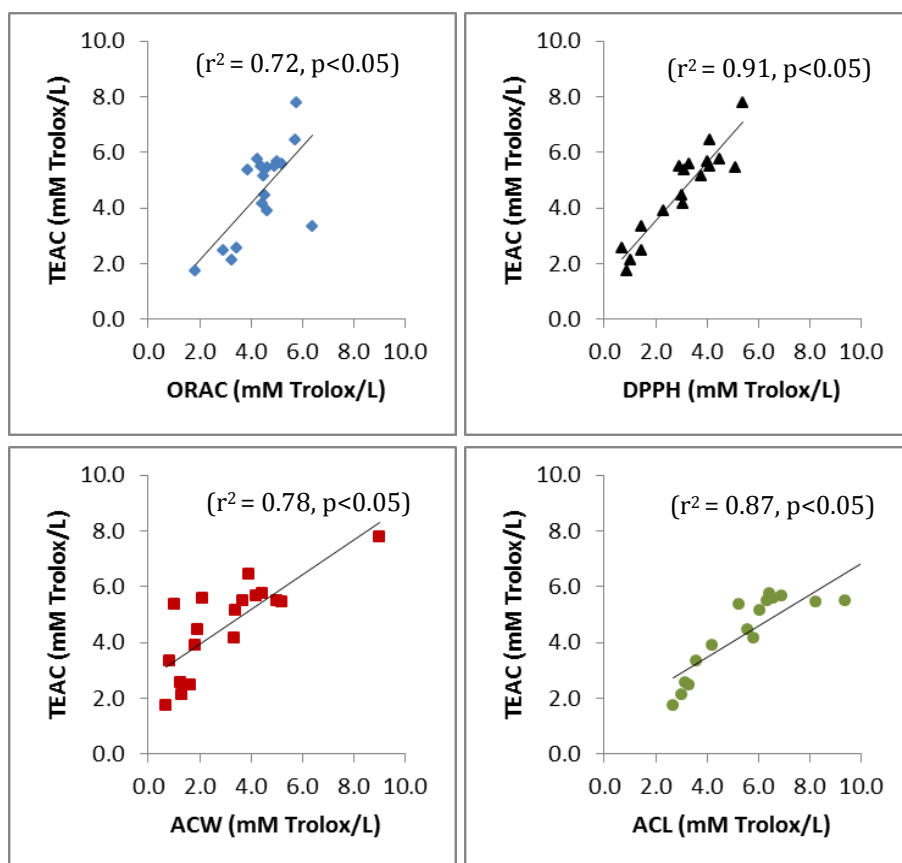
El valor de R<sup>2</sup> obtenido indica el % en el cual los distintos modelos explicarían los valores obtenidos experimentalmente. La concentración de ácido ascórbico es la que contribuye principalmente en los valores de capacidad antioxidante total determinada por los diferentes métodos estudiados.

Estos resultados 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) en el zumo de manzana. Sin embargo, Rapisarda et al. (1999) observan para diferentes zumos de naranja sanguina que la capacidad antioxidante se debe principalmente a su elevada concentración de antocianinas. El análisis de correlación realizado indica que las mejores correlaciones se obtienen entre los valores de capacidad antioxidante total y las

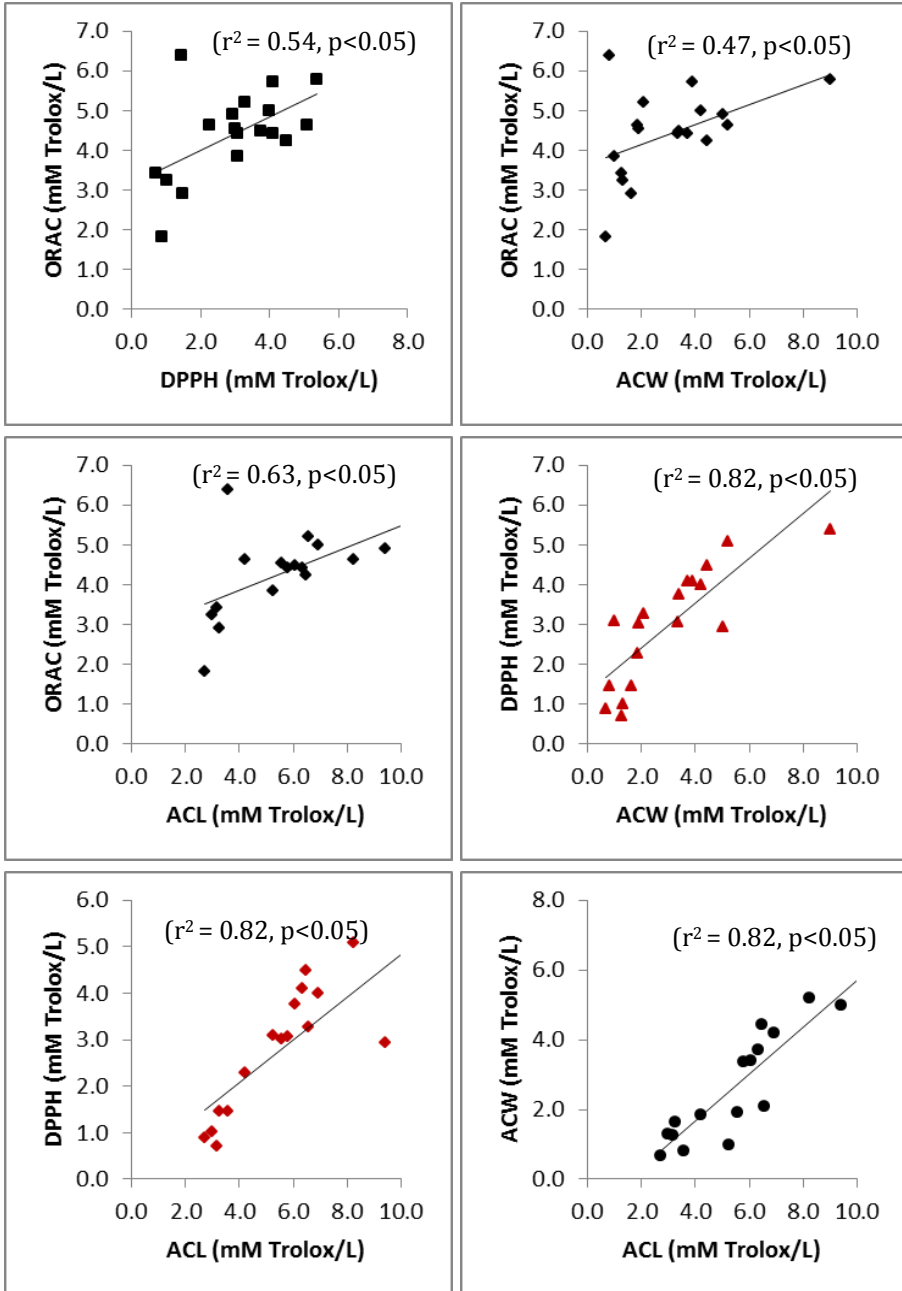
## Parte experimental

concentraciones de ácido ascórbico para los métodos ACL ( $r= 0.736$ ,  $p<0.05$ ), ACW ( $r= 0.758$ ,  $p<0.05$ ), DPPH ( $r= 0.927$ ,  $p<0.05$ ) y TEAC ( $r= 0.839$ ,  $p<0.05$ ), pero no para ORAC.

Tal como muestra la Figura n° 16 los valores de capacidad antioxidante obtenidos por los diferentes métodos, se correlacionan entre sí en todos los casos.



**Figura n° 16.** Correlación entre los valores de capacidad antioxidante en los diferentes métodos de medida.



**Figura n° 16 (continuación).** Correlación entre los valores de capacidad antioxidante en los diferentes métodos de medida.

Diversos autores han obtenido correlaciones entre los resultados tras determinar 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 también 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.

Por otra parte, Zulueta et al. (2009) tras estudiar el comportamiento de una bebida mezcla de zumo de naranja y leche e intentar establecer correlaciones entre los métodos ORAC y TEAC, observan que cuando 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 ve aumentada con un aumento 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. En nuestro estudio, los porcentajes de leche utilizados para la elaboración de las diferentes bebidas indicados por el fabricante no superan en ningún caso el 10%, esto puede explicar que sí se observen correlaciones entre los diferentes métodos. Además también se añaden vitaminas A, C, E, que están correlacionadas con un aumento en la capacidad antioxidante total.

### *4.3.2. Impacto del uso de tecnologías no térmicas y térmicas en la conservación de los parámetros nutricionales y de calidad fisicoquímica de una bebida a base de zumo de naranja y leche*

#### *4.3.2.1. Efecto de las APH y del tratamiento térmico*

Se estudia el efecto de las APH sobre parámetros nutricionales y de calidad fisicoquímica del zumo de naranja mezclado con leche preparado según se ha descrito en el apartado 4.1.1. y se compara con el producido tras aplicar un tratamiento térmico.

#### Tratamiento por APH

Para el tratamiento por APH se utiliza un equipo High Pressure Food Processor (EPSI NV, Belgium), que consta de una vasija de 100 mm de diámetro interno y 300 mm de altura, rodeada por una doble cámara por donde fluye el líquido refrigerante y que la mantiene a la temperatura de trabajo deseada. El líquido de presurización consiste en una mezcla de agua y etilenglicol. El nivel de presión, el tiempo de presurización y la temperatura se controlan automáticamente. La velocidad del incremento de presión es de 300 MPa/min y el tiempo de despresurización menor a 1 min.

Las muestras objeto de estudio se introducen en botes de PE-LD de 35 mL y se ponen en bolsas de polietileno que se llenan con agua y son termoselladas (MULTIVAC Thermosealer). Las muestras así preparadas se tratan a 100-400 MPa durante tiempos desde 120 hasta 540s. La temperatura se controla y no sobrepasa los 42°C.

Inmediatamente después del tratamiento las muestras se enfrían en un baño de agua/hielo Armfield FT61 (Armfield, Reino Unido) y se almacenan bajo refrigeración ( $4\pm 2^\circ\text{C}$ ) hasta ser analizadas.

La muestra fresca que no se procesa sirve de control para poder evaluar el efecto de las APH.

#### Tratamiento térmico

El tratamiento por pasteurización térmica se lleva a cabo en un intercambiador de placas modelo Armfield FT74P (Armfield, Reino Unido). La bebida es impulsada por una bomba desde el tanque de alimentación hacia el intercambiador de calor, donde se aplican las condiciones de tratamiento seleccionadas. Después del tratamiento, la bebida es enfriada con agua proveniente de un sistema refrigerador Armfield FT61 (Armfield, Reino Unido) se envasa y se almacena a  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis. El tratamiento térmico seleccionado es similar al que normalmente se aplica en la industria, cuyas temperaturas están comprendidas entre  $90\text{-}99^{\circ}\text{C}$  y el tiempo de tratamiento entre 15 y 30s (Irwe y Olson 1994; Braddock, 1999). Tras los diferentes tratamientos térmicos aplicados se alcanza la reducción de 5 log de inactivación de *Lactobacillus plantarum* y *Pseudomonas fluorescens* demandados por la USFDA (2000).

#### Resultados

A continuación se presentan los resultados del efecto del tratamiento por APH y por pasteurización térmica.

##### *Parámetros fisicoquímicos*

Las muestras sin tratar presentan un valor de  $3.90\pm 0.03$  para el pH y de  $14.40\pm 0.40$  °Brix. Tras la aplicación de los distintos tratamientos por APH, ambos parámetros se mantienen sin cambios estadísticamente significativos.

Por otro lado, el índice de turbidez disminuye significativamente ( $p<0.05$ ) con respecto al de la bebida no tratada cuando se aplican presiones mayores de 200 MPa, mientras que el índice de pardeamiento aumenta de forma significativa ( $p<0.05$ ) en las condiciones más intensas

## Parte experimental

(400 MPa/540s) en las que se produce un incremento del (13%). También se observa un incremento del índice de pardeamiento después de aplicar los distintos tratamientos por calor (90 y 98°C, 15 y 21 s) aunque este aumento es mayor (20-35%). El pH, °Brix y el índice de turbidez no varían tras el tratamiento térmico (véase Cuadro n° 24).

**Cuadro n° 24.** Valores de índice de turbidez e índice de pardeamiento de la bebida de zumo de naranja mezclada con leche tratada por APH y tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo (s)	Índice turbidez	Índice pardeamiento
<b>Control</b>	0	2.39±0.01 <sup>abc</sup>	0.040±0.001 <sup>a</sup>
<b>90°C</b>	15	2.37±0.00 <sup>a</sup>	0.048±0.004 <sup>b</sup>
	21	2.40±0.03 <sup>bc</sup>	0.052±0.003 <sup>bc</sup>
<b>98°C</b>	15	2.43±0.02 <sup>c</sup>	0.054±0.003 <sup>bc</sup>
	21	2.40±0.02 <sup>bc</sup>	0.052±0.002 <sup>b</sup>
<b>APH</b>	120	2.39±0.04 <sup>abc</sup>	0.041±0.001 <sup>a</sup>
<b>100 MPa</b>	300	2.36±0.08 <sup>abde</sup>	0.040±0.003 <sup>a</sup>
	420	2.37±0.06 <sup>abcd</sup>	0.041±0.004 <sup>a</sup>
	540	2.36±0.06 <sup>abde</sup>	0.038±0.001 <sup>a</sup>
<b>APH</b>	120	2.31±0.01 <sup>de</sup>	0.039±0.000 <sup>a</sup>
<b>200 MPa</b>	300	2.30±0.01 <sup>e</sup>	0.040±0.000 <sup>a</sup>
	420	2.30±0.05 <sup>e</sup>	0.042±0.000 <sup>a</sup>
	540	2.30±0.01 <sup>e</sup>	0.042±0.001 <sup>a</sup>
<b>APH</b>	120	2.31±0.01 <sup>de</sup>	0.041±0.001 <sup>a</sup>
<b>300 MPa</b>	300	2.33±0.01 <sup>ade</sup>	0.042±0.003 <sup>a</sup>
	420	2.31±0.05 <sup>de</sup>	0.043±0.001 <sup>a</sup>
	540	2.33±0.01 <sup>ade</sup>	0.041±0.001 <sup>a</sup>
<b>APH</b>	120	2.30±0.01 <sup>de</sup>	0.040±0.001 <sup>a</sup>
<b>400 MPa</b>	300	2.30±0.00 <sup>e</sup>	0.042±0.001 <sup>a</sup>
	420	2.31±0.00 <sup>de</sup>	0.044±0.001 <sup>a</sup>
	540	2.30±0.02 <sup>e</sup>	0.045±0.001 <sup>b</sup>

<sup>a-e</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

En cuanto a los parámetros de color (Cuadro n° 25 y 26), los valores de  $a^*$  de la bebida de zumo de naranja mezclada con leche disminuyen conforme aumentan la presión (300 y 400 MPa) y el tiempo de tratamiento (120-540s). A 400 MPa/540s se observa la mayor disminución en los valores de  $a^*$ . También se observa una disminución en los valores de  $a^*$  tras el tratamiento térmico.

Los valores de  $b^*$  disminuyen significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando se aplican presiones superiores a 300 MPa/300s, obteniendo el menor valor de  $b^*$  a 400 MPa/540s (Cuadro n° 25). Sin embargo tras el tratamiento térmico, se observa un aumento significativo en los valores de  $b^*$ . Además, al aplicar el test de Pearson se observa una correlación positiva entre el índice de pardeamiento y los valores de  $b^*$  ( $p = 0.027$ ).

Los valores de luminosidad ( $L^*$ ) de la bebida disminuyen significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando se aplican presiones de 200-400 MPa. Una posible explicación a esta disminución de  $L^*$  puede ser la desintegración de las micelas de caseína en pequeños fragmentos por efecto de la presión. Se observa una correlación ( $p = 0.0024$ ) entre el índice de pardeamiento y la disminución en los valores de  $L^*$  cuando la bebida se trata térmicamente.

Cuando la presión aplicada es superior a 300 MPa durante 300s, la intensidad del color (Chroma) es significativamente menor ( $p < 0.05$ ) en comparación con las bebidas no tratadas. En el caso del tratamiento térmico se observa un aumento significativo.

El análisis ANOVA de dos factores (presión, tiempo) controlados realizado muestra que ambos tienen un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ , así como también sobre Chroma y  $h$ , mientras que para el parámetro  $L^*$  solo influye significativamente la presión aplicada. Se pone de manifiesto que estos factores interactúan entre sí. Los resultados obtenidos se muestran gráficamente en la Figura n° 17.

## Parte experimental

**Cuadro n° 25.** Valores de a\*, b\* y L\* de la bebida de zumo de naranja mezclado con leche tratada por APH y tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo (s)	a*	b*	L*
<b>Sin tratar</b>	0	1.35±0.05 <sup>abc</sup>	37.02±0.09 <sup>abc</sup>	71.11±0.01 <sup>a</sup>
<b>90 °C</b>	15	-0.37±0.03 <sup>k</sup>	42.59±0.12 <sup>e</sup>	71.52±0.06 <sup>b</sup>
	21	-0.36±0.04 <sup>k</sup>	42.85±0.13 <sup>f</sup>	70.65±0.04 <sup>de</sup>
<b>98 °C</b>	15	-0.47±0.03 <sup>l</sup>	42.78±0.12 <sup>ef</sup>	70.91±0.06 <sup>ac</sup>
	21	-0.47±0.02 <sup>l</sup>	42.88±0.05 <sup>f</sup>	70.85±0.03 <sup>cd</sup>
<b>APH</b>	120	1.28±0.06 <sup>ad</sup>	36.89±0.10 <sup>cf</sup>	70.87±0.07 <sup>cd</sup>
<b>100 MPa</b>	300	1.39±0.03 <sup>b</sup>	37.22±0.08 <sup>ad</sup>	70.94±0.02 <sup>ac</sup>
	420	1.34±0.02 <sup>abc</sup>	37.05±0.08 <sup>abc</sup>	70.95±0.01 <sup>ac</sup>
	540	1.37±0.02 <sup>bc</sup>	37.12±0.06 <sup>ab</sup>	70.92±0.04 <sup>ac</sup>
<b>APH</b>	120	1.49±0.06 <sup>b</sup>	37.40±0.06 <sup>d</sup>	70.57±0.06 <sup>e</sup>
<b>200 MPa</b>	300	1.34±0.01 <sup>abc</sup>	37.23±0.09 <sup>ad</sup>	70.12±0.07 <sup>f</sup>
	420	1.31±0.08 <sup>acd</sup>	37.00±0.25 <sup>bc</sup>	70.00±0.14 <sup>fg</sup>
	540	1.18±0.24 <sup>e</sup>	36.75±0.51 <sup>f</sup>	69.95±0.12 <sup>fg</sup>
<b>APH</b>	120	1.23±0.03 <sup>de</sup>	37.00±0.03 <sup>bc</sup>	69.45±0.05 <sup>i</sup>
<b>300MPa</b>	300	0.92±0.13 <sup>g</sup>	35.95±0.41 <sup>gh</sup>	69.25±0.03 <sup>ij</sup>
	420	0.82±0.02 <sup>h</sup>	35.91±0.05 <sup>h</sup>	69.11±0.36 <sup>j</sup>
	540	0.88±0.05 <sup>gh</sup>	35.77±0.17 <sup>h</sup>	69.02±0.85 <sup>j</sup>
<b>APH</b>	120	1.01±0.10 <sup>f</sup>	36.16±0.28 <sup>g</sup>	69.12±0.15 <sup>j</sup>
<b>400MPa</b>	300	0.69±0.05 <sup>i</sup>	34.56±0.04 <sup>i</sup>	69.70±0.02 <sup>h</sup>
	420	0.61±0.04 <sup>ij</sup>	34.53±0.05 <sup>ij</sup>	69.86±0.02 <sup>gh</sup>
	540	0.59±0.02 <sup>j</sup>	34.34±0.24 <sup>j</sup>	69.85±0.02 <sup>gh</sup>

<sup>a-l</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

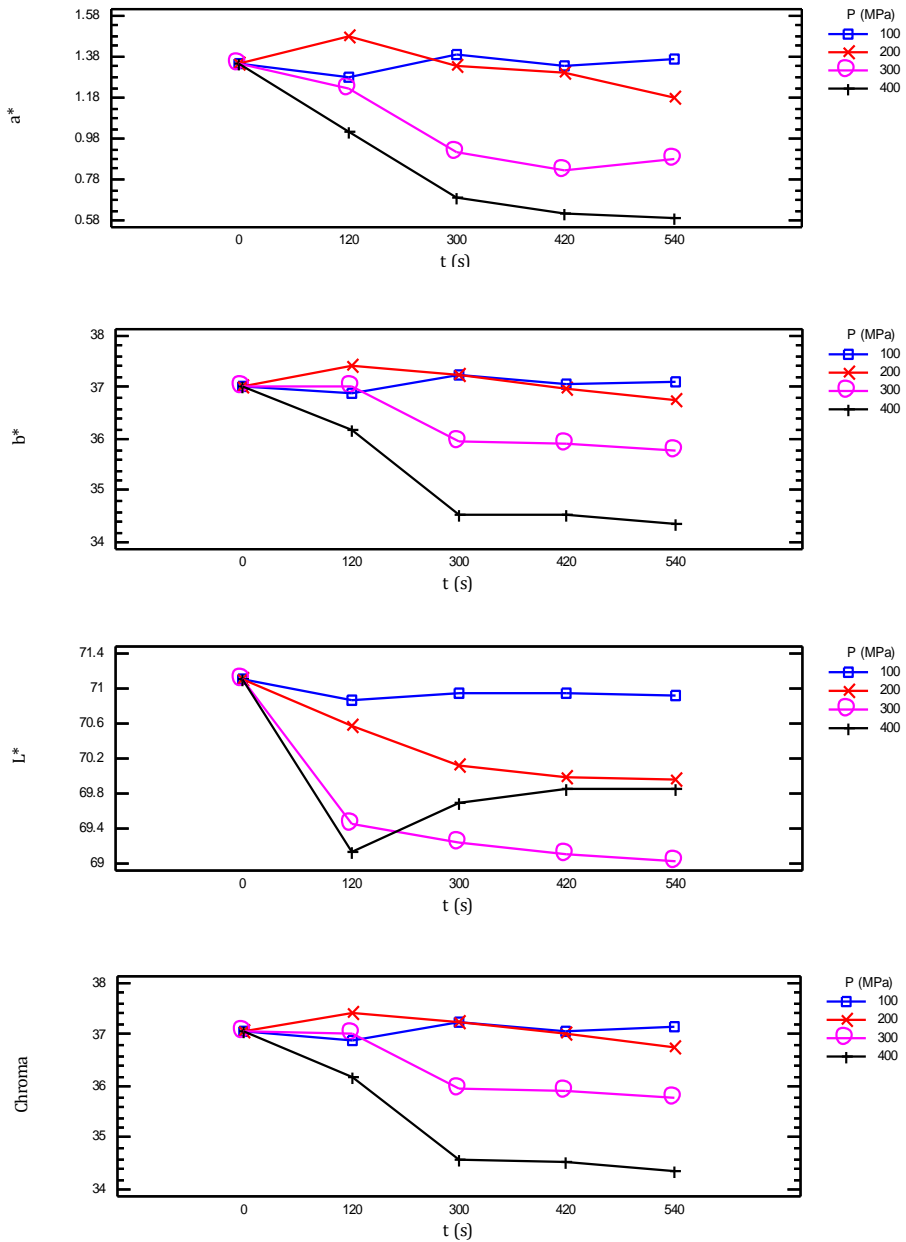


Figura n° 17. Efecto de la presión y tiempo de tratamiento sobre los parámetros de color  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  y Chroma.

## Parte experimental

Las diferencias totales de color ( $\Delta E$ ) obtenidas para las muestras tratadas por APH, por calor y la bebida sin tratar se muestran en el Cuadro n° 26.

En los tratamientos de 300 y 400 MPa las diferencias totales de color son perceptibles (1.66-3.07) siendo intensas únicamente en el tratamiento de 400 MPa durante 540s (>3). Tras el tratamiento térmico, los valores de  $\Delta E$  son superiores a 5.84 en todos los casos.

**Cuadro n° 26.** Valores de Chroma,  $h^0$  e  $\Delta E$  de la bebida de zumo de naranja mezclado con leche tratada por APH y tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo (s)	Chroma	$h^0$	$\Delta E$
<b>Sin tratar</b>	0	37.05±0.09 <sup>abc</sup>	87.91±0.07 <sup>ab</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>90°C</b>	15	42.59±0.12 <sup>e</sup>	89.51±0.04 <sup>l</sup>	5.84±0.11 <sup>j</sup>
	21	42.85±0.13 <sup>f</sup>	89.51±0.06 <sup>l</sup>	6.09±0.12 <sup>k</sup>
<b>98°C</b>	15	42.79±0.12 <sup>ef</sup>	89.38±0.04 <sup>k</sup>	6.05±0.11 <sup>jk</sup>
	21	42.89±0.05 <sup>f</sup>	89.37±0.03 <sup>k</sup>	6.15±0.05 <sup>k</sup>
<b>APH</b>	120	36.91±0.10 <sup>ag</sup>	88.02±0.09 <sup>bd</sup>	0.29±0.12 <sup>b</sup>
<b>100 MPa</b>	300	37.25±0.08 <sup>cd</sup>	87.86±0.04 <sup>a</sup>	0.28±0.04 <sup>b</sup>
	420	37.08±0.09 <sup>abc</sup>	87.94±0.03 <sup>ab</sup>	0.18±0.00 <sup>b</sup>
	540	37.14±0.06 <sup>bc</sup>	87.89±0.03 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>b</sup>
<b>APH</b>	120	37.43±0.06 <sup>d</sup>	87.73±0.10 <sup>c</sup>	0.68±0.04 <sup>c</sup>
<b>200 MPa</b>	300	37.25±0.09 <sup>cd</sup>	87.95±0.02 <sup>ab</sup>	1.01±0.08 <sup>d</sup>
	420	37.02±0.25 <sup>ab</sup>	87.98±0.11 <sup>ab</sup>	1.14±0.15 <sup>de</sup>
	540	36.76±0.52 <sup>g</sup>	88.17±0.35 <sup>e</sup>	1.30±0.25 <sup>e</sup>
<b>APH</b>	120	37.02±0.03 <sup>ab</sup>	88.10±0.05 <sup>de</sup>	1.66±0.05 <sup>f</sup>
<b>300 MPa</b>	300	35.96±0.42 <sup>hi</sup>	88.54±0.19 <sup>g</sup>	2.22±0.21 <sup>g</sup>
	420	35.92±0.05 <sup>i</sup>	88.69±0.03 <sup>h</sup>	2.36±0.31 <sup>gh</sup>
	540	35.78±0.17 <sup>i</sup>	88.59±0.08 <sup>gh</sup>	2.55±0.61 <sup>h</sup>
<b>APH</b>	120	36.17±0.28 <sup>h</sup>	88.40±0.14 <sup>f</sup>	2.20±0.26 <sup>g</sup>
<b>400 MPa</b>	300	34.56±0.04 <sup>j</sup>	88.86±0.08 <sup>i</sup>	2.92±0.03 <sup>i</sup>
	420	34.54±0.05 <sup>jk</sup>	88.99±0.06 <sup>j</sup>	2.88±0.05 <sup>i</sup>
	540	34.34±0.24 <sup>k</sup>	89.02±0.03 <sup>j</sup>	3.07±0.20 <sup>i</sup>

<sup>a-l</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.



### *Ácido ascórbico*

Los resultados obtenidos se muestran en el Cuadro n° 27. Las concentraciones de ácido ascórbico en la bebida tratada a 200 MPa durante 420 y 540s así como a 300 y 400 MPa (para todos los tiempos), son significativamente menores que en el producto no tratado ( $p < 0.05$ ), aunque la retención de ácido ascórbico es superior al 91% en todos los casos estudiados. Tras el tratamiento térmico, la concentración de ácido ascórbico disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) en todos los casos, con pérdidas de hasta el 18% cuando se aplica una temperatura de 98°C durante 21 s.

En el ANOVA de dos factores (presión y tiempo) realizado, se observa que sólo la presión tiene una significancia estadística ( $p < 0.05$ ) sobre la retención de ácido ascórbico, aunque ambos factores interaccionan entre sí (Figura n° 18).

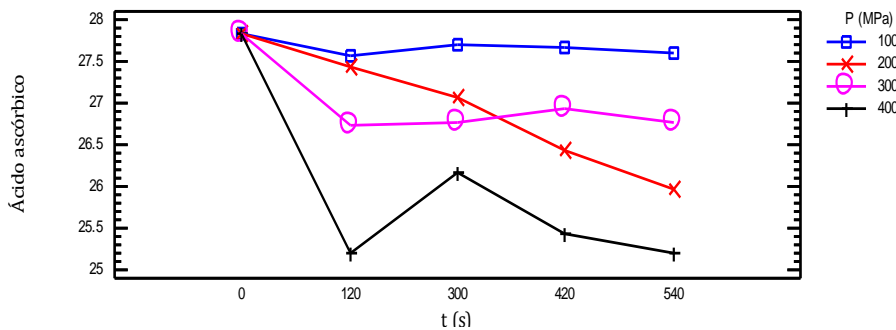
Con el objeto de poder explicar la evolución del ácido ascórbico con el tratamiento de APH se representa la concentración de ácido ascórbico frente a la presión y el tiempo de tratamiento y se realiza un análisis de regresión múltiple obteniendo que sólo la presión del tratamiento tiene un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre la variación en la concentración de ácido ascórbico. La ecuación que explica este efecto es:  $y = 28.14 - 0.007 \cdot P$ , donde "y" es la concentración de ácido ascórbico (mg/100mL) y "P" es la presión expresada en MPa ( $R^2 = 63.3$ , error estándar = 0,52).

## Parte experimental

**Cuadro n° 27.** Concentración de varios compuestos antioxidantes de la bebida de zumo de naranja mezclada con leche tratada por APH y tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo (s)	AA (mg/100 mL)	FST (mg GAE/L)	CT (mg/100 mL)
Sin tratar	0	27.8±0.0 <sup>a</sup>	742.6±27.5 <sup>ab</sup>	0.066±0.002 <sup>abcde</sup>
90°C	15	23.7±0.1 <sup>b</sup>	804.5±33.6 <sup>acd</sup>	0.087±0.001 <sup>ghi</sup>
	21	23.4±0.2 <sup>bc</sup>	866.3±10.8 <sup>de</sup>	0.098±0.005 <sup>i</sup>
98°C	15	23.0±0.1 <sup>bc</sup>	826.7±34.0 <sup>acde</sup>	0.080±0.004 <sup>fg</sup>
	21	22.7±0.2 <sup>c</sup>	869.4±15.9 <sup>de</sup>	0.082±0.004 <sup>fgh</sup>
APH	120	27.6±0.3 <sup>ade</sup>	771.4±43.1 <sup>abc</sup>	0.052±0.004 <sup>bjk</sup>
100 MPa	300	27.7±0.1 <sup>a</sup>	849.3±48.0 <sup>cde</sup>	0.061±0.005 <sup>bdej</sup>
	420	27.7±0.2 <sup>ae</sup>	905.6±49.7 <sup>e</sup>	0.079±0.012 <sup>acfg</sup>
	540	27.6±0.2 <sup>ade</sup>	797.2±42.5 <sup>acd</sup>	0.097±0.004 <sup>hi</sup>
APH	120	27.4±0.6 <sup>ade</sup>	798.9±56.9 <sup>acd</sup>	0.046±0.005 <sup>jk</sup>
200 MPa	300	27.1±0.3 <sup>adef</sup>	771.0±12.6 <sup>abc</sup>	0.074±0.023 <sup>acefg</sup>
	420	26.4±0.5 <sup>fg</sup>	817.1±13.2 <sup>acde</sup>	0.089±0.005 <sup>ghi</sup>
	540	26.0±0.1 <sup>ghi</sup>	736.7±12.1 <sup>ab</sup>	0.086±0.012 <sup>fghi</sup>
APH	120	26.7±0.2 <sup>dfig</sup>	877.5±75.1 <sup>de</sup>	0.044±0.002 <sup>k</sup>
300 MPa	300	26.8±1.7 <sup>defg</sup>	838.9±10.9 <sup>cde</sup>	0.042±0.004 <sup>k</sup>
	420	26.9±0.2 <sup>defg</sup>	855.6±11.5 <sup>cde</sup>	0.071±0.005 <sup>acdef</sup>
	540	26.8±0.3 <sup>defg</sup>	837.6±85.4 <sup>cde</sup>	0.074±0.002 <sup>acefg</sup>
APH	120	25.2±0.2 <sup>h</sup>	852.7±6.0 <sup>de</sup>	0.056±0.002 <sup>bdjk</sup>
400 MPa	300	26.2±0.2 <sup>figi</sup>	823.4±33.6 <sup>acde</sup>	0.064±0.002 <sup>bcde</sup>
	420	25.4±0.4 <sup>hi</sup>	798.0±19.2 <sup>acd</sup>	0.077±0.001 <sup>acfg</sup>
	540	25.2±0.2 <sup>h</sup>	685.9±42.0 <sup>b</sup>	0.084±0.002 <sup>fgh</sup>

<sup>a-k</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. AA: ácido ascórbico. FST: fenoles solubles totales. CT: carotenoides totales.



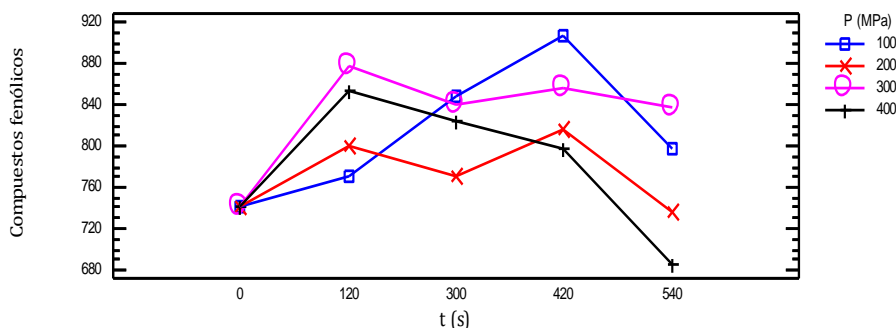
**Figura n° 18.** Efecto de la presión y tiempo de tratamiento sobre ácido ascórbico

### *Compuestos fenólicos totales*

Se observa un aumento en los niveles de compuestos fenólicos totales (veáse Cuadro n° 27) en la bebida procesada por APH, con un aumento máximo a 100 MPa/420s (22%) con respecto a la bebida no tratada. Sánchez-Moreno et al. (2005) también obtienen un aumento en el contenido de algunos compuestos fenólicos que puede ser debido a que las APH provocan alteraciones en las paredes celulares de la planta que favorecen la extractabilidad de estos compuestos. Sin embargo, se observa un ligero descenso pero significativo ( $p < 0.05$ ) en el contenido de compuestos fenólicos en la bebida tratada a 400 MPa/540s.

El análisis ANOVA de dos factores realizado muestra que ambos factores (tiempo y presión) influyen de forma significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de fenoles totales tras el tratamiento por APH de la bebida de zumo de naranja y leche, aunque no existen interacciones entre los factores (Figura n° 19).

Respecto al tratamiento térmico también se obtiene un aumento de los fenoles solubles totales en todos los tratamientos aplicados pero de igual tendencia.

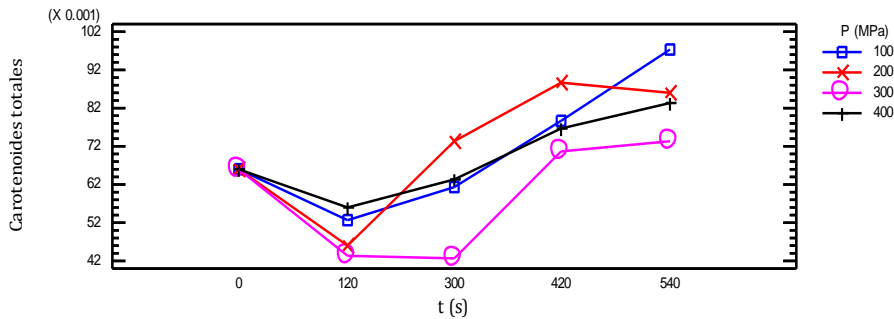


**Figura n° 19.** Efecto de la presión y tiempo de tratamiento sobre los compuestos fenólicos

### *Carotenoides totales*

Los carotenoides totales aumentan de forma significativa ( $p < 0.05$ ) en todas las muestras procesadas por APH (100-400 MPa) durante 420 y 540s respecto a la bebida no procesada (Cuadro n° 27). Se observa que el mayor aumento en el contenido total de carotenoides se produce al aplicar 100 MPa durante 540s y 200 MPa durante 420s. Según Butz et al. (1994), puede ser porque presiones de 100 MPa sean suficientes para causar la ruptura de las vacuolas intracelulares y las paredes celulares de la planta. Sin embargo, Hsu (2008) explican que el aumento en los carotenoides tras aplicar APH en zumo de tomate puede ser debido a que probablemente se produce una modificación en la estructura de las proteínas que se enlazan con los carotenoides.

El análisis ANOVA de dos factores realizado muestra que el tiempo y la presión influyen significativamente ( $p < 0.05$ ) en el contenido de carotenoides totales tras el tratamiento por APH de la bebida, aunque no existen interacciones significativas (Figura n° 20).



**Figura n° 20.** Efecto de la presión y tiempo de tratamiento sobre los carotenoides totales

Al realizar el análisis de regresión múltiple se obtiene que la ecuación del modelo ajustado es:  $y = 0.052 - 4.000 \cdot 10^5 \cdot P + 7.777 \cdot 10^5 \cdot t$ , donde “y” es el contenido total de carotenoides (mg/100mL) y “P” es la presión expresada en MPa y “t” el tiempo en segundos ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 60.0\%$ , error estándar = 0.0098).

Tras aplicar el tratamiento térmico se obtiene un aumento en la concentración de carotenoides totales en todos los casos.

#### *Capacidad antioxidante total*

En el Cuadro n° 28 se muestran los valores de capacidad antioxidante total (TEAC y ORAC) tanto para la bebida no tratada como para las procesadas por APH y por calor.

## Parte experimental

**Cuadro n° 28.** Valores de capacidad antioxidante total de la bebida de zumo de naranja mezclado con leche tratada por APH y por tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo (s)	TEAC (mM Trolox)	ORAC (mM Trolox)
<b>Sin tratar</b>	0	2.02±0.16 <sup>abc</sup>	6.96±0.13 <sup>ab</sup>
<b>90°C</b>	15	1.89±0.03 <sup>abcd</sup>	6.46±0.06 <sup>de</sup>
	21	1.83±0.10 <sup>bd</sup>	6.44±0.05 <sup>de</sup>
<b>98°C</b>	15	1.47±0.01 <sup>fg</sup>	6.33±0.04 <sup>e</sup>
	21	1.34±0.11 <sup>fghi</sup>	6.16±0.06 <sup>f</sup>
<b>APH</b>	120	1.41±0.12 <sup>fgh</sup>	6.57±0.04 <sup>d</sup>
<b>100 MPa</b>	300	1.17±0.16 <sup>i</sup>	6.51±0.04 <sup>d</sup>
	420	1.41±0.07 <sup>fgh</sup>	6.88±0.04 <sup>bc</sup>
	540	1.31±0.08 <sup>ghi</sup>	6.82±0.02 <sup>bc</sup>
<b>APH</b>	120	2.08±0.21 <sup>ac</sup>	7.26±0.08 <sup>g</sup>
<b>200 MPa</b>	300	1.85±0.23 <sup>bd</sup>	7.05±0.06 <sup>a</sup>
	420	2.15±0.29 <sup>a</sup>	7.28±0.06 <sup>g</sup>
	540	1.82±0.08 <sup>bde</sup>	7.29±0.06 <sup>g</sup>
<b>APH</b>	120	1.20±0.05 <sup>ghi</sup>	6.91±0.01 <sup>abc</sup>
<b>300 MPa</b>	300	1.35±0.03 <sup>ghi</sup>	6.76±0.13 <sup>c</sup>
	420	1.21±0.04 <sup>ghi</sup>	6.87±0.12 <sup>bc</sup>
	540	1.19±0.08 <sup>hi</sup>	6.79±0.08 <sup>c</sup>
<b>APH</b>	120	1.60±0.23 <sup>ef</sup>	6.83±0.11 <sup>bc</sup>
<b>400 MPa</b>	300	1.86±0.19 <sup>bcd</sup>	6.75±0.04 <sup>bc</sup>
	420	1.90±0.18 <sup>bcd</sup>	6.72±0.09 <sup>c</sup>
	540	1.78±0.27 <sup>de</sup>	6.52±0.04 <sup>d</sup>

<sup>a-i</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

Las muestras tratadas por APH presentan valores inferiores de capacidad antioxidante determinada por el método TEAC con respecto a la bebida no procesada ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, se obtienen valores elevados de capacidad antioxidante con el método TEAC para 200 MPa (120 y 420s).

Se obtienen también valores más bajos por el método ORAC para todos los tratamientos excepto para 200 MPa que son mayores que la muestra sin tratar. Este aumento en la capacidad antioxidante puede ser debido a una mejor extractabilidad de los compuestos antioxidantes tras el tratamiento por APH (Corrales et al., 2008).

Al estudiar la posible correlación (test de Pearson) entre los diferentes parámetros analizados que contribuyen a la capacidad antioxidante (ácido ascórbico, fenoles totales y carotenos totales) sólo se observa una correlación negativa entre los valores de capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos totales ( $p=0.0082$ ).

El análisis ANOVA de dos factores muestra que sólo la presión influye significativamente ( $p<0.05$ ) en la capacidad antioxidante total tras el tratamiento por APH de la bebida.

También se obtienen valores bajos de capacidad antioxidante tras aplicar el tratamiento térmico ( $98^{\circ}\text{C}$ , 21s) con una disminución del 34% y 11% ( $p<0.05$ ) para TEAC y ORAC, respectivamente.

### *Vitaminas liposolubles*

Para evaluar el efecto de la presión tras aplicar APH sobre la fracción grasa (vitaminas liposolubles, contenido de grasa y perfil lipídico) de la bebida se realiza el estudio de diferentes presiones (100-400MPa) durante 300s.

El contenido de vitamina  $D_2$  y  $D_3$  en la bebida a base de zumo de naranja y leche no tratada es de  $6.33\pm 0.11\mu\text{g}/100\text{mL}$  y  $6.62\pm 0.27\mu\text{g}/100\text{mL}$  respectivamente, no produciéndose cambios estadísticamente significativos al aplicar los distintos tratamientos por APH y también por calor ( $90^{\circ}\text{C}/15\text{s}$ ).

En el Cuadro n° 29 se muestra el contenido de tocoferoles y actividad vitamínica E, en la bebida tratada por calor y por APH.

## Parte experimental

**Cuadro n° 29.** Concentraciones de vitamina E ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ) en zumo de naranja mezclado con leche sin tratar, tratado térmicamente y por APH.

	$\delta$ - T	$\gamma$ - T	$\alpha$ - T	Vit E
Sin tratar	63.42 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>	26.01 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	132.57 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	137.08 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>
90°C/15s	63.06 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	25.95 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	131.81 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	136.30 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>
100 MPa	68.45 $\pm$ 1.77 <sup>ab</sup>	30.71 $\pm$ 3.45 <sup>a</sup>	159.14 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	164.27 $\pm$ 0.79 <sup>b</sup>
200 MPa	83.08 $\pm$ 4.64 <sup>c</sup>	40.27 $\pm$ 3.80 <sup>b</sup>	217.14 $\pm$ 2.94 <sup>c</sup>	223.66 $\pm$ 3.46 <sup>d</sup>
300 MPa	73.18 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>	34.08 $\pm$ 0.30 <sup>ab</sup>	222.94 $\pm$ 0.95 <sup>c</sup>	228.54 $\pm$ 0.92 <sup>d</sup>
400 MPa	75.56 $\pm$ 1.59 <sup>bc</sup>	30.24 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	192.76 $\pm$ 5.44 <sup>d</sup>	198.05 $\pm$ 5.46 <sup>c</sup>

<sup>a-d</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.  $\delta$  - T: Delta Tocoferol.  $\gamma$  - T: Gamma Tocoferol.  $\alpha$  - T: Alfa Tocoferol.

En todos los casos, después del tratamiento por APH se observa un aumento en la actividad vitamínica E fundamentalmente debido a un aumento en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol, que es máximo a 300 MPa (68%). Este aumento es significativo en todos los tocoferoles a partir de 200 MPa.

Al realizar un análisis de la varianza, no se observan cambios estadísticamente significativos en las concentraciones de vitamina E entre las muestras de zumo de naranja leche no tratadas y las que se les aplica calor, pues como puede observarse el tratamiento térmico no afecta al contenido de estos compuestos.

### *Grasa y perfil ácidos grasos*

En el Cuadro n° 30 se muestra el contenido graso y perfil de ácidos grasos de la bebida sin tratar y tratada térmicamente.



**Cuadro n° 30.** Perfil de ácidos grasos en zumo de naranja mezclado con leche sin tratar y tras aplicar tratamiento térmico.

	Sin tratar	90°C/15s
Grasa	0.40±0.04 <sup>a</sup>	0.35±0.03 <sup>a</sup>
C12:0	0.14±0.01 <sup>a</sup>	0.14±0.01 <sup>a</sup>
C14:0	0.98±0.01 <sup>a</sup>	1.14±0.03 <sup>b</sup>
C16:0	10.70±0.03 <sup>a</sup>	11.45±0.21 <sup>b</sup>
C18:0	3.92±0.04 <sup>a</sup>	4.46±0.06 <sup>b</sup>
C16:1	0.69±0.03 <sup>a</sup>	0.63±0.04 <sup>a</sup>
C18:1	63.46±0.27 <sup>a</sup>	63.97±0.32 <sup>a</sup>
C18:2	13.64±0.13 <sup>a</sup>	13.47±0.18 <sup>a</sup>
C18:3	0.48±0.01 <sup>a</sup>	0.44±0.02 <sup>a</sup>
C20:4	0.35±0.01 <sup>a</sup>	0.34±0.01 <sup>a</sup>
C20:5	1.48±0.03 <sup>a</sup>	1.47±0.01 <sup>a</sup>
C20:6	0.69±0.01 <sup>a</sup>	0.68±0.01 <sup>a</sup>
SFA	16.08±0.01 <sup>a</sup>	17.53±0.33 <sup>b</sup>
MUFA	64.15±0.30 <sup>a</sup>	64.59±0.35 <sup>a</sup>
PUFA	16.28±0.15 <sup>a</sup>	16.05±0.18 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> distinto superíndice en una misma fila indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

El contenido total de grasa disminuye en la muestra tratada por calor, se observa un aumento significativo en el contenido de SFA mientras que no se obtienen diferencias en MUFA y PUFA en las muestras tratadas térmicamente y las muestras frescas.

En el Cuadro n° 31 se muestra el contenido graso y perfil de ácidos grasos de la bebida sin tratar y tratada por APH.

Se observa en todas las muestras tratadas por APH que su contenido graso disminuye ( $p < 0.05$ ). Este cambio también se ha obtenido en el tratamiento por calor.

El porcentaje de SFA, MUFA y PUFA en la bebida de zumo de naranja mezclado con leche sin tratar es de 16.1, 64.2 y 16.3%, respectivamente. Tras aplicar un análisis de la variación en las muestras tratadas por APH, se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de SFA a 100 y 200 MPa debido principalmente a un incremento en los

## Parte experimental

niveles de C<sub>16:0</sub> y C<sub>18:0</sub>, sin embargo a medida que aumenta la presión de tratamiento (300 y 400 MPa) se disminuye el porcentaje de SFA. En lo que respecta a los MUFA se observa un pequeño aumento aunque significativo ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de ácido oleico (C<sub>18:1</sub>) en todas las bebidas a base de zumo de naranja mezcladas con leche respecto a la bebida sin tratar. Sin embargo, no se obtienen cambios significativos en el perfil de PUFA tras aplicar APH.

**Cuadro n° 31.** Perfil de ácidos grasos en zumo de naranja mezclado con leche sin tratar y tras aplicar APH.

	Sin tratar	100 MPa	200 MPa	300 MPa	400 MPa
Grasa	0.40±0.04 <sup>a</sup>	0.38±0.02 <sup>a</sup>	0.36±0.02 <sup>a</sup>	0.35±0.02 <sup>a</sup>	0.34±0.03 <sup>a</sup>
C12:0	0.14±0.01 <sup>a</sup>	0.13±0.01 <sup>ab</sup>	0.13±0.01 <sup>ab</sup>	0.12±0.01 <sup>ab</sup>	0.11±0.01 <sup>b</sup>
C14:0	0.98±0.01 <sup>a</sup>	1.09±0.01 <sup>ab</sup>	1.06±0.01 <sup>ab</sup>	0.60±0.06 <sup>c</sup>	0.58±0.04 <sup>c</sup>
C16:0	10.70±0.03 <sup>a</sup>	11.48±0.35 <sup>b</sup>	11.15±0.11 <sup>ab</sup>	10.63±0.04 <sup>a</sup>	10.59±0.06 <sup>a</sup>
C18:0	3.92±0.04 <sup>a</sup>	4.36±0.18 <sup>ab</sup>	4.26±0.20 <sup>ab</sup>	3.22±0.08 <sup>c</sup>	3.25±0.02 <sup>c</sup>
C16:1	0.69±0.03 <sup>a</sup>	0.58±0.02 <sup>a</sup>	0.67±0.08 <sup>a</sup>	0.61±0.04 <sup>a</sup>	0.74±0.01 <sup>a</sup>
C18:1	63.46±0.27 <sup>a</sup>	64.77±0.11 <sup>c</sup>	65.37±0.22 <sup>c</sup>	64.39±0.13 <sup>b</sup>	64.56±0.12 <sup>bc</sup>
C18:2	13.64±0.13 <sup>ab</sup>	14.13±0.13 <sup>b</sup>	13.90±0.13 <sup>ab</sup>	13.65±0.15 <sup>ab</sup>	13.69±0.18 <sup>ab</sup>
C18:3	0.48±0.01 <sup>ab</sup>	0.52±0.02 <sup>b</sup>	0.49±0.01 <sup>ab</sup>	0.47±0.01 <sup>ab</sup>	0.47±0.01 <sup>ab</sup>
C20:4	0.35±0.01 <sup>ab</sup>	0.37±0.01 <sup>a</sup>	0.33±0.01 <sup>bc</sup>	0.31±0.01 <sup>c</sup>	0.30±0.01 <sup>d</sup>
C20:5	1.48±0.03 <sup>a</sup>	1.50±0.01 <sup>a</sup>	1.51±0.01 <sup>a</sup>	1.49±0.02 <sup>a</sup>	1.48±0.01 <sup>a</sup>
C20:6	0.69±0.01 <sup>a</sup>	0.69±0.01 <sup>a</sup>	0.69±0.00 <sup>a</sup>	0.68±0.01 <sup>a</sup>	0.68±0.01 <sup>a</sup>
SFA	16.08±0.01 <sup>a</sup>	17.42±0.19 <sup>b</sup>	16.93±0.08 <sup>b</sup>	14.87±0.06 <sup>c</sup>	14.82±0.01 <sup>c</sup>
MUFA	64.15±0.30 <sup>a</sup>	65.35±0.09 <sup>bc</sup>	66.04±0.30 <sup>c</sup>	65.04±0.16 <sup>ab</sup>	65.30±0.11 <sup>bc</sup>
PUFA	16.28±0.15 <sup>ab</sup>	16.83±0.18 <sup>b</sup>	16.59±0.13 <sup>ab</sup>	16.27±0.18 <sup>ab</sup>	16.32±0.17 <sup>ab</sup>

<sup>a-c</sup> distinto superíndice en una misma fila indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

*4.3.2.2. Estudio comparativo del efecto de APH, PEAI y ultrasonidos en la inactivación microbiana y los parámetros nutricionales y de calidad.*

Este estudio se realiza en el laboratorio del Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering en la Technological University of Berlin (Alemania) y tiene como objetivo tratar la muestra de zumo de naranja mezclado con leche con otros equipos de APH y PEAI, así como por ultrasonidos.

Para el tratamiento por APH se utiliza un equipo High Pressure Food Processor (U 4000 Unipress, Poland). Con una vasija cuyo volumen de trabajo es de 700 mL y con una presión máxima de trabajo recomendada de 800 MPa. El nivel de presión, el tiempo de presurización y la temperatura se controlan automáticamente. El tiempo necesario para alcanzar la presión deseada es de 60s y el tiempo de descompresión de aproximadamente 10 s. El líquido de presurización consiste en una mezcla de agua y 1,2-propanodiol (50:50, v/v).

Las muestras objeto de estudio se introducen en botes de PE-LD 15 mL y después se ponen en bolsas de polietileno que se llenan con agua y son termoselladas. Posteriormente las muestras se tratan a 200-600 MPa durante tiempos desde 300 hasta 900s a 25°C. La temperatura máxima alcanzada en las muestras durante la presurización es de 42°C y se enfrían hasta aproximadamente 15°C durante la descompresión.

El trabajo específico de compresión ( $W_{compr}$ ), se expresa de acuerdo a la siguiente expresión (Ardia, 2004):

$$W_{compr} = - \int V \cdot dp$$

Donde  $V = f(p)$  es la relación funcional para el agua para situaciones isotérmicas proporcionada por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

El tratamiento por PEAI se realiza en un sistema con una fuente de alimentación de alto voltaje FUG HCK 800M-20000, 20 kV, 80 mA (FUG,

## Parte experimental

---

Rosenheim, Alemania), un sistema de condensadores de capacidad Ceramite Y5U 6800Z (Behlke, Kronberg, Alemania) (capacidad 19.1 nF en total). El sistema también presenta un interruptor de alto voltaje HTS 160-500 SCR, 16 kV, 5 kA, 2 kHz (Behlke, Kronberg, Alemania) que se utiliza como interruptor para la descarga de pulsos exponenciales decayentes. Además incorpora una resistencia protectora de 2.5 Ohm (Stervice, Francia), un diodo de tiempo de retorno FDA 150-200, 20 kV, 1.5 kA (Behlke, Kronberg, Alemania), un generador de frecuencia AFG 320 (Sony Tektronix, Beaverton, USA), y un interruptor de la fuente de alimentación A400, 5V, 2A (EMS Power, Basingstoke, Reino Unido). La recogida y control de los datos obtenidos se realiza con un ordenador conectado por GPIB, con un software basado en TestPoint (Keithley Instruments, Cleveland, USA), un osciloscopio de 100 MHz TDS220 y un sensor de alto voltaje P6015A (ambos de Tektronix Inc., Beaverton, USA).

Para el tratamiento de la muestra por esta tecnología se ponen 390  $\mu\text{L}$  de la misma en la cámara de tratamiento, que consiste en dos electrodos de acero inoxidable de distintos diámetros (15.4, 12.5 y 9.5 mm) que se sitúan en paralelo con una distancia de 2.1, 3.2 y 5.4 mm recubiertos por teflón. Posteriormente las muestras se tratan a 16, 27 y 40 kV/cm aplicando 45, 89 y 134 pulsos a 20°C para conseguir energías de 80, 160 y 240 kJ/kg. El voltaje aplicado es de 8500 V.

La energía utilizada durante el tratamiento por PEAI se calcula de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$E = U/d$$

Donde E es el campo eléctrico (kV/cm), U es el voltaje (V) y d la distancia (cm) entre los electrodos.

De este modo la energía por pulso ( $W_p$ ) expresada en kJ/kg se calcula:

$$W_p = \frac{1}{2} \cdot U^2 \cdot C$$

Donde  $U$  es el voltaje aplicado ( $V$ ) y  $C$  es la capacidad ( $nF$ ) de los condensadores.

El cálculo de la energía total ( $Wt$ ) utilizada se basa en la energía utilizada por pulso:

$$Wt = Wp \cdot n/m$$

Donde  $n$  es el número de pulsos aplicados y  $m$  la cantidad ( $g$ ) de producto tratado.

El tratamiento por ultrasonidos se lleva a cabo en una unidad con un generador UIP 2000 (Hielscher GmbH, Teltow, Germany), una sonda BS2d 18(F) (Hielscher GmbH, Teltow, Germany) y un transductor B2-2.2 (Hielscher GmbH, Teltow, Germany). Las muestras se tratan a distintas amplitudes (25, 50, 70 y 100%) durante diferentes tiempos (1-56 s). La potencia utilizada para cada amplitud se mide mediante una sonda y se obtienen valores de 160, 190, 240 y 280 W, respectivamente.

Para el cálculo de la energía utilizada durante el tratamiento se mide la potencia básica ( $P_b$ ) en vatios que utiliza la unidad de ultrasonidos sin muestra y la potencia ( $P_t$ ) que se consume durante el tratamiento a un nivel de amplitud determinado, usando una sonda de ultrasonidos. El consumo real de potencia ( $P_r$ ) se calcula de la siguiente forma:

$$P_r = P_t - P_b$$

Se pueden calcular las condiciones del tratamiento en función del  $P_r$  (vatios), el tiempo de tratamiento deseado ( $t$ ) expresado en segundos, la masa tratada ( $m$ ) expresada en gramos o la energía deseada  $W$  (kJ/kg):

$$W = (P_r \cdot t/m)$$

Se seleccionan los tiempos necesarios para alcanzar 4 niveles de energía diferentes (100, 200, 300 y 600 kJ/kg) para cada amplitud.

### Resultados

A continuación se detallan los resultados del efecto del tratamiento por APH, PEAI y ultrasonidos sobre los diferentes parámetros estudiados

#### *Inactivación microbiana tras la aplicación de APH, PEAI y ultrasonidos*

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de tratamiento por APH, PEAI y ultrasonidos en un nuevo alimento es necesario elegir un microorganismo de referencia para llevar a cabo los estudios además de estudiar la influencia de los parámetros de procesado sobre la muerte de los microorganismos y los factores de calidad, cuya elección depende del alimento objeto de estudio. *Lactobacillus plantarum* es capaz de crecer en un amplio intervalo de pH y contaminar los zumos de frutas frescos o mínimamente procesados debido a su naturaleza ácida, produciendo aromas de manteca y llevando a la hinchazón de los envases.

Algunos autores han investigado el efecto de las tecnologías no térmicas en la inactivación de *Lactobacillus plantarum* en diferentes sustratos (Wouters et al., 2001; Rodrigo et al., 2003; Abram et al., 2003) y en particular en la matriz alimentaria objeto de estudio zumo de naranja y leche (Sampedro et al., 2006; Sampedro et al., 2007).

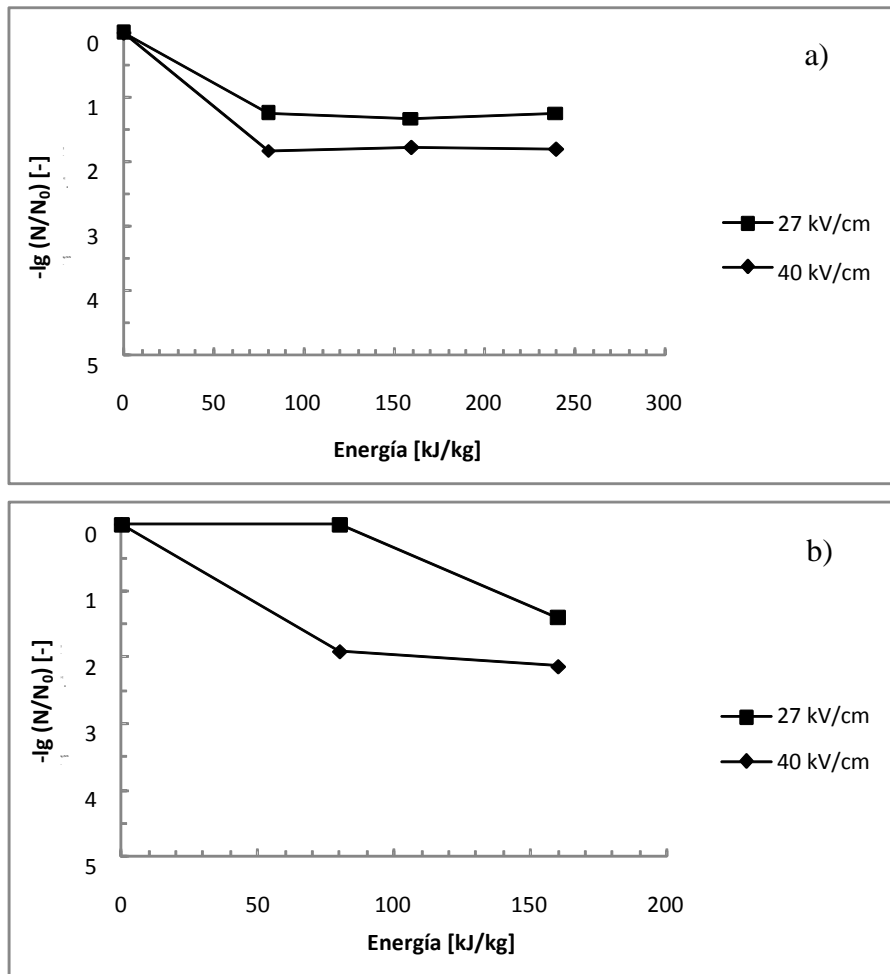
*Pseudomonas fluorescens* es el microorganismo de elección para evaluar el efecto de la pasteurización térmica en la inactivación microbiana en leche (Wouters y Smelt, 1997) y además también se ha utilizado para evaluar el efecto de las tecnologías no térmicas en la inactivación de microorganismos en leche (Ho et al., 1995; Gervilla et al., 1997; Villamiel y De Jong, 2000).

Tras los diferentes tratamientos por APH aplicados se alcanza la reducción de 5 log de inactivación de *Lactobacillus plantarum* y *Pseudomonas fluorescens* demandados por la USFDA (2000).

En el caso del tratamiento por PEAI, tras la aplicación de tratamientos de baja intensidad de campo y energía (27 kV/cm, 80 kJ/kg) se observa una disminución del recuento de *Pseudomonas fluorescens* (1.2 ciclos logarítmicos) y *Lactobacillus plantarum* (1.4 ciclos logarítmicos). Sin embargo, tras la aplicación de campos más altos (40 kV/cm) con niveles superiores de energía (80-240 kJ/kg) se observa una fracción más resistente, obteniendo un aumento en la inactivación para *Pseudomonas fluorescens* (1.8 ciclos logarítmicos) y *Lactobacillus plantarum* (1.9-2.1 ciclos logarítmicos). También se ve que los distintos niveles de energía para los diferentes campos eléctricos no conllevan un aumento en el grado de inactivación. En la Figura n° 21 se muestran las curvas de inactivación de *Pseudomonas fluorescens* y *Lactobacillus plantarum* en función de la energía utilizada en el tratamiento por PEAI (27-40 kV/cm, 80-240 kJ/kg).

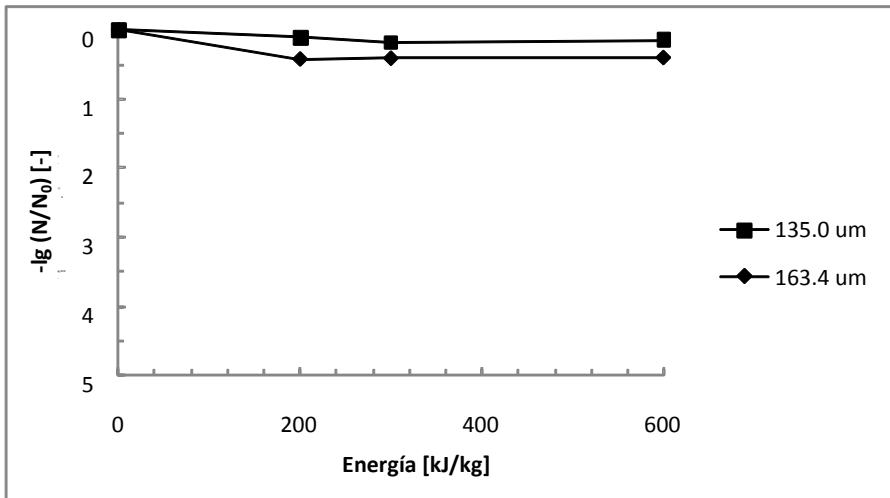
Tras aplicar los diferentes tratamientos por ultrasonidos tan sólo se obtienen 0.4 ciclos logarítmicos de inactivación para *Pseudomonas fluorescens* cuando se utilizan amplitudes de 163.4  $\mu\text{m}$  y energías de 100 kJ/kg y no se observa un aumento de los ciclos logarítmicos de inactivación cuando se utilizan amplitudes y energías superiores (Figura n° 22). En el caso de *Lactobacillus plantarum*, no se obtiene inactivación microbiana tras la aplicación del tratamiento por ultrasonidos.

## Parte experimental



**Figura n° 21.** Requerimientos de energía eléctrica para la inactivación de a) *Pseudomonas fluorescens* y b) *Lactobacillus plantarum* en una bebida a base de zumo de naranja mezclado con leche a dos campos eléctricos de 27 y 40 kV/cm.





**Figura n° 22.** Requerimiento de energía eléctrica para la inactivación de *Pseudomonas fluorescens* en zumo de naranja mezclado con leche tratado por ultrasonidos con 2 amplitudes diferentes de 135 y 163.4  $\mu\text{m}$

*Impacto de las APH, PEAI y ultrasonidos sobre la concentración de ácido ascórbico, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en la bebida de zumo de naranja con leche.*

Las concentraciones de ácido ascórbico, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de la bebida mezcla de zumo de naranja y leche tras aplicar los distintos tratamientos por APH, PEAI y ultrasonidos así como también sin tratar se muestran en los Cuadros n° 32-34.

Las concentraciones de ácido ascórbico en las muestras procesadas por APH son significativamente ( $p < 0.05$ ) más bajas que las muestras no tratadas, observando en el tratamiento más severo una pérdida máxima que corresponde con el 13.6%.

Por otra parte, se observa un aumento que no siempre es significativo en el contenido de compuestos fenólicos en las muestras procesadas por APH a 200 y 400 MPa y las tratadas a 600 MPa presentan una tendencia a disminuir el contenido de FST.

## Parte experimental

Se obtiene un aumento en la capacidad antioxidante total de todas las muestras tras aplicar los diferentes tratamientos por APH. Este aumento en la capacidad antioxidante, a pesar de que el ácido ascórbico disminuye, puede ser debido a que las APH aumentan la extractabilidad de algunos compuestos con actividad antioxidante (Corrales et al., 2008), entre los que se incluyen los compuestos fenólicos.

**Cuadro n° 32.** Valores de compuestos antioxidantes en la bebida de zumo de naranja leche tratada por APH a diferentes presiones y tiempos.

Tratamiento	Tiempo (s)	Energía (kJ/kg)	AA (mg/100ml)	FST (mg GAE/L)	TEAC (mMTrolox)
Sin tratar	0	0	25.1±0.2 <sup>a</sup>	671.4±17.4 <sup>ab</sup>	2.36±0.07 <sup>a</sup>
APH	300	8	23.9±0.1 <sup>b</sup>	827.2±68.1 <sup>c</sup>	2.56±0.06 <sup>b</sup>
200 MPa	540	8	23.4±0.2 <sup>bc</sup>	773.4±37.1 <sup>bc</sup>	2.85±0.07 <sup>d</sup>
	900	8	23.2±0.1 <sup>c</sup>	751.6±21.4 <sup>bc</sup>	2.73±0.04 <sup>cd</sup>
APH	300	20	23.6±0.3 <sup>bc</sup>	777.7±77.8 <sup>bc</sup>	2.77±0.01 <sup>d</sup>
400MPa	540	20	23.4±0.2 <sup>bc</sup>	836.2±46.9 <sup>c</sup>	2.75±0.06 <sup>d</sup>
	900	20	23.2±0.2 <sup>c</sup>	764.2±51.0 <sup>bc</sup>	2.46±0.05 <sup>ab</sup>
APH	300	37	23.2±0.2 <sup>c</sup>	610.3±26.3 <sup>a</sup>	2.58±0.10 <sup>bc</sup>
600MPa	540	37	21.9±0.3 <sup>d</sup>	788.6±76.3 <sup>bc</sup>	2.53±0.04 <sup>b</sup>
	900	37	21.7±0.3 <sup>d</sup>	593.1±78.8 <sup>a</sup>	2.58±0.11 <sup>bc</sup>

<sup>a-d</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. AA: ácido ascórbico. FST: fenoles solubles totales. TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.

Según vemos en el Cuadro n° 33 después de aplicar los diferentes tratamientos por PEAI la concentración de ácido ascórbico disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) en los campos de 27 y 40 kV/cm. En el primer caso cuando la energía aplicada es igual o superior a 160 kJ/kg. También Zulueta et al. (2010) tras aplicar PEAI en continuo a una bebida de zumo de naranja con leche obtiene pérdidas de ácido ascórbico comprendidas entre el 2-6% cuando utilizan campos eléctricos de 15-40 kV/cm, con energías de 35-375 kJ/kg.

No se observan cambios significativos en el contenido de los fenoles solubles totales en ninguno de los tratamientos por PEAI, aunque la tendencia es a aumentar. Zulueta (2009) obtiene un comportamiento similar en el contenido de compuestos fenólicos en una bebida de zumo de naranja con leche tras aplicar PEAI en continuo (15-40 kV/cm, 35-375 kJ/kg), observando un aumento de los FST, que es máximo a 40 kV/cm (6%) pero no es significativo. La capacidad antioxidante total sólo disminuye significativamente tras aplicar campos de 27 y 40 kV/cm con una energía de 240 kJ/kg.

**Cuadro n° 33.** Valores de compuestos antioxidantes en la bebida de zumo de naranja leche tratada por PEAI a diferentes campos eléctricos y tiempos.

E (kV/cm)	n° de pulsos	Energía (kJ/kg)	AA (mg/100ml)	FST (mg GAE/l)	TEAC (mM trolox)
Sin tratar	0	0	25.1±0.2 <sup>a</sup>	671.4±17.4 <sup>a</sup>	2.36±0.07 <sup>ab</sup>
16	45	80	25.1±0.2 <sup>a</sup>	717.9±24.4 <sup>a</sup>	2.43±0.07 <sup>ab</sup>
	89	160	25.1±0.1 <sup>a</sup>	725.5±29.4 <sup>a</sup>	2.53±0.08 <sup>a</sup>
	134	240	25.1±0.2 <sup>a</sup>	726.8±32.6 <sup>a</sup>	2.32±0.04 <sup>abc</sup>
27	45	80	25.1±0.1 <sup>a</sup>	725.8±27.6 <sup>a</sup>	2.40±0.03 <sup>ab</sup>
	89	160	24.5±0.2 <sup>b</sup>	702.0±18.0 <sup>a</sup>	2.20±0.04 <sup>bcd</sup>
	134	240	24.1±0.1 <sup>b</sup>	700.4±43.5 <sup>a</sup>	2.04±0.05 <sup>cd</sup>
40	45	80	24.4±0.1 <sup>b</sup>	703.6±14.4 <sup>a</sup>	2.25±0.02 <sup>abc</sup>
	89	160	23.4±0.1 <sup>c</sup>	690.6±18.6 <sup>a</sup>	2.19±0.09 <sup>bcd</sup>
	134	240	22.6±0.6 <sup>d</sup>	681.0±23.4 <sup>a</sup>	1.96±0.06 <sup>d</sup>

<sup>a-d</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. E: campo eléctrico. AA: ácido ascórbico. FST: fenoles solubles totales. TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.

En el Cuadro n° 34 se puede ver que tras aplicar los diferentes tratamientos por ultrasonidos se observan pérdidas importantes de ácido ascórbico con respecto a la muestra no tratada y en el tratamiento a 163.4 µm de amplitud y 600 kJ/kg se obtienen pérdidas del 27%.

## Parte experimental

También se obtiene un aumento en el contenido de compuestos fenólicos con el tratamiento por ultrasonidos, aunque sólo presentan valores muy elevados en el tratamiento a 163.4 $\mu$ m. Con respecto a la capacidad antioxidante total se observa una disminución.

**Cuadro n° 34.** Valores de compuestos antioxidantes en la bebida de zumo de naranja leche tratada por ultrasonidos a diferentes amplitudes y tiempos.

Amplitud ( $\mu$ m)	P (W)	Tiempo (s)	Energía (kJ/kg)	AA (mg/100ml)	FST (mgGAE/L)	TEAC (mM trolox)
NP	0		0	25.1 $\pm$ 0.2 <sup>a</sup>	671.4 $\pm$ 17.4 <sup>abc</sup>	2.36 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>
<b>101.4</b>	160	10	100	24.7 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	705.1 $\pm$ 28.5 <sup>bcd</sup>	2.22 $\pm$ 0.03 <sup>ac</sup>
		19	200	22.3 $\pm$ 1.0 <sup>bc</sup>	719.4 $\pm$ 16.9 <sup>cde</sup>	2.08 $\pm$ 0.11 <sup>cdef</sup>
		28	300	22.0 $\pm$ 0.5 <sup>bcd</sup>	729.1 $\pm$ 34.2 <sup>cde</sup>	2.45 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>
		56	600	21.5 $\pm$ 0.1 <sup>def</sup>	722.7 $\pm$ 46.1 <sup>cde</sup>	2.24 $\pm$ 0.05 <sup>ac</sup>
<b>116.2</b>	190	8	100	22.4 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>	752.4 $\pm$ 25.0 <sup>de</sup>	2.10 $\pm$ 0.06 <sup>cd</sup>
		16	200	21.8 $\pm$ 0.1 <sup>cdef</sup>	750.9 $\pm$ 39.3 <sup>de</sup>	2.10 $\pm$ 0.14 <sup>cde</sup>
		24	300	20.7 $\pm$ 0.2 <sup>gh</sup>	669.5 $\pm$ 33.1 <sup>abc</sup>	2.37 $\pm$ 0.06 <sup>ab</sup>
		48	600	19.7 $\pm$ 0.2 <sup>i</sup>	637.6 $\pm$ 28.6 <sup>a</sup>	1.98 $\pm$ 0.04 <sup>defg</sup>
<b>135.0</b>	240	6	100	22.2 $\pm$ 0.1 <sup>bcd</sup>	651.6 $\pm$ 35.5 <sup>ab</sup>	2.34 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>
		12	200	21.4 $\pm$ 0.2 <sup>cf</sup>	675.4 $\pm$ 19.5 <sup>abc</sup>	1.93 $\pm$ 0.04 <sup>fg</sup>
		19	300	21.2 $\pm$ 0.2 <sup>fg</sup>	719.9 $\pm$ 42.2 <sup>cde</sup>	1.75 $\pm$ 0.08 <sup>h</sup>
		38	600	21.2 $\pm$ 0.2 <sup>fg</sup>	776.5 $\pm$ 33.8 <sup>e</sup>	1.98 $\pm$ 0.04 <sup>defg</sup>
<b>163.4</b>	280	5	100	21.5 $\pm$ 0.0 <sup>ef</sup>	895.0 $\pm$ 9.0 <sup>f</sup>	1.82 $\pm$ 0.13 <sup>gh</sup>
		11	200	21.4 $\pm$ 0.0 <sup>ef</sup>	939.6 $\pm$ 30.6 <sup>fg</sup>	1.93 $\pm$ 0.04 <sup>efg</sup>
		16	300	20.5 $\pm$ 0.2 <sup>h</sup>	979.5 $\pm$ 36.4 <sup>gh</sup>	1.95 $\pm$ 0.10 <sup>defg</sup>
		32	600	18.2 $\pm$ 0.3 <sup>j</sup>	1011.8 $\pm$ 18.6 <sup>h</sup>	1.76 $\pm$ 0.07 <sup>h</sup>

<sup>a-j</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. P: potencia. AA: ácido ascórbico. FST: fenoles solubles totales. TEAC: Trolox equivalent antioxidant capacity.

## **4.4. BEBIDA A BASE DE VEGETALES.**

### *4.4.1. Caracterización físico-química y nutricional de bebidas a base de vegetales comerciales.*

Previamente a la elaboración de la bebida de vegetales objeto de estudio se realiza un análisis de mercado de las diferentes muestras comerciales de bebidas a base de vegetales 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 los distintos vegetales que se utilizan como ingredientes. La descripción de la muestra se ha realizado en el apartado 4.1.5.

A continuación se detallan los resultados después de realizar los análisis de las diferentes muestras comerciales.

#### *4.4.1.1. Parámetros fisicoquímicos*

Los resultados obtenidos al determinar los parámetros fisicoquímicos pH, °Brix, índice de turbidez e índice de pardeamiento se muestran en el Cuadro n° 35. Estos parámetros están directamente relacionados con la calidad del producto y son fundamentales para la estabilidad de los compuestos bioactivos de los alimentos.

Todas las bebidas de vegetales analizadas están en el intervalo de pH de 3.9 y 4.1. Este pH ácido es importante porque evita reacciones de oxidación y alteraciones microbiológicas en el producto. Daoudi (2004) y Pinilla et al. (2005) obtienen resultados similares en diferentes bebidas de vegetales.

Los valores de °Brix están comprendidos entre 4.8 y 6.8. Este es un factor importante a tener en cuenta ya que los °Brix están relacionados

## Parte experimental

con el contenido en azúcares y el aroma de estas bebidas (Pinilla et al., 2005).

Tal como puede observarse existe una gran variabilidad en los valores del índice de turbidez (0.28-1.49) y los del índice de pardeamiento (0.11-0.27), debido a la diferente composición de las muestras analizadas y también al tratamiento de conservación empleado.

**Cuadro n° 35.** Parámetros fisicoquímicos de las bebidas de vegetales.

Muestra	pH	°Brix	IT	IP
1 A	4.1±0.0 <sup>a</sup>	5.6±0.0 <sup>a</sup>	0.51±0.01 <sup>ab</sup>	0.21±0.01 <sup>a</sup>
2 A	4.0±0.0 <sup>a</sup>	6.0±0.0 <sup>b</sup>	0.64±0.01 <sup>cde</sup>	0.22±0.00 <sup>b</sup>
3 B	4.0±0.0 <sup>bcd</sup>	6.2±0.0 <sup>a</sup>	0.53±0.01 <sup>abc</sup>	0.10±0.00 <sup>c</sup>
4 B	3.9±0.0 <sup>e</sup>	4.8±0.0 <sup>c</sup>	0.70±0.00 <sup>de</sup>	0.11±0.01 <sup>cd</sup>
5 C	4.0±0.0 <sup>bcd</sup>	6.4±0.0 <sup>d</sup>	1.49±0.09 <sup>f</sup>	0.23±0.00 <sup>b</sup>
6 C	4.0±0.0 <sup>cd</sup>	6.6±0.0 <sup>e</sup>	0.25±0.02 <sup>g</sup>	0.17±0.00 <sup>f</sup>
7 C	4.0±0.0 <sup>bc</sup>	6.8±0.0 <sup>b</sup>	0.53±0.03 <sup>abc</sup>	0.17±0.00 <sup>f</sup>
8 D	3.9±0.0 <sup>ef</sup>	6.0±0.0 <sup>b</sup>	1.13±0.15 <sup>h</sup>	0.16±0.00 <sup>i</sup>
9 E	4.0±0.0 <sup>a</sup>	6.8±0.0 <sup>f</sup>	0.28±0.01 <sup>g</sup>	0.26±0.01 <sup>g</sup>
10 E	4.0±0.0 <sup>bcd</sup>	6.2±0.0 <sup>g</sup>	0.46±0.00 <sup>a</sup>	0.25±0.00 <sup>h</sup>
11 E	3.9±0.0 <sup>df</sup>	5.0±0.0 <sup>h</sup>	0.74±0.01 <sup>e</sup>	0.19±0.00 <sup>e</sup>
12 F	4.1±0.0 <sup>a</sup>	6.4±0.0 <sup>d</sup>	0.75±0.11 <sup>e</sup>	0.12±0.00 <sup>d</sup>
13 G	4.1±0.0 <sup>g</sup>	6.8±0.0 <sup>f</sup>	0.29±0.01 <sup>g</sup>	0.27±0.01 <sup>i</sup>
14 H	4.0±0.0 <sup>b</sup>	5.9±0.0 <sup>b</sup>	0.59±0.03 <sup>bcd</sup>	0.25±0.00 <sup>gh</sup>

A-H indica el diferente fabricante. <sup>a-j</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función de la muestra analizada. IT: índice de turbidez. IP: índice de pardeamiento.

Los valores de color obtenidos para las bebidas de vegetales se muestran en el Cuadro n° 36. Como se puede observar los valores de L\* en todas las bebidas de vegetales analizadas se encuentran en el intervalo 24.4–39.9, lo cual indica que las muestras presentan colores

muy oscuros. Estos resultados son similares a los observados por Pinilla et al. (2005) en bebidas de vegetales. Los valores de  $b^*$  obtenidos (15.4-34.9) también son similares a los observados por estos autores.

Debido al gran porcentaje de tomate presente en las diferentes bebidas, éstas tienen una marcada tendencia al color rojo, esto se manifiesta en el alto valor de  $a^*$  (11.6–22.3), así como también en los valores de tonalidad ( $h^0$ ) (45.8°-68.5°). La cromaticidad se encuentra entre 21.1 y 41.0, indicando la alta intensidad de color de los resultados (Chroma).

**Cuadro n° 36.** Parámetros de color de las bebidas de vegetales comerciales analizadas.

Muestra	$a^*$	$b^*$	$L^*$	Chroma	$h^0$
1 A	22.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	30.8 ± 0.4 <sup>a</sup>	39.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	38.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	54.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
2 A	16.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	19.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	32.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	25.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	49.0 ± 0.0 <sup>b</sup>
3 B	19.8 ± 0.0 <sup>c</sup>	32.6 ± 0.0 <sup>c</sup>	34.8 ± 0.0 <sup>c</sup>	38.1 ± 0.1 <sup>c</sup>	58.7 ± 0.0 <sup>c</sup>
4 B	11.6 ± 0.1 <sup>d</sup>	20.6 ± 0.3 <sup>d</sup>	35.7 ± 0.4 <sup>c</sup>	23.6 ± 0.3 <sup>d</sup>	68.5 ± 0.1 <sup>d</sup>
5 C	15.5 ± 0.1 <sup>e</sup>	23.4 ± 0.7 <sup>e</sup>	38.1 ± 0.1 <sup>d</sup>	28.0 ± 0.6 <sup>e</sup>	56.5 ± 0.6 <sup>e</sup>
6 C	15.5 ± 0.1 <sup>e</sup>	21.4 ± 0.1 <sup>f</sup>	33.3 ± 0.3 <sup>e</sup>	26.4 ± 0.2 <sup>f</sup>	54.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
7 C	19.6 ± 0.1 <sup>f</sup>	31.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	28.9 ± 0.0 <sup>f</sup>	36.9 ± 0.3 <sup>g</sup>	57.9 ± 0.1 <sup>f</sup>
8 D	16.1 ± 0.1 <sup>g</sup>	20.4 ± 0.0 <sup>d</sup>	24.4 ± 0.0 <sup>g</sup>	26.0 ± 0.1 <sup>bf</sup>	51.8 ± 0.0 <sup>g</sup>
9 E	14.8 ± 0.1 <sup>h</sup>	15.4 ± 0.2 <sup>g</sup>	29.4 ± 0.4 <sup>f</sup>	21.4 ± 0.2 <sup>h</sup>	46.1 ± 0.2 <sup>h</sup>
10 E	20.4 ± 0.1 <sup>i</sup>	26.3 ± 0.3 <sup>h</sup>	37.6 ± 0.2 <sup>d</sup>	33.3 ± 0.3 <sup>i</sup>	52.2 ± 0.2 <sup>g</sup>
11 E	15.0 ± 0.4 <sup>h</sup>	20.4 ± 1.2 <sup>d</sup>	33.3 ± 0.9 <sup>e</sup>	25.3 ± 1.2 <sup>b</sup>	53.6 ± 0.8 <sup>i</sup>
12 F	21.4 ± 0.0 <sup>j</sup>	34.9 ± 0.0 <sup>i</sup>	34.5 ± 0.0 <sup>h</sup>	41.0 ± 0.0 <sup>j</sup>	58.6 ± 0.0 <sup>j</sup>
13 G	15.7 ± 0.1 <sup>e</sup>	16.1 ± 0.2 <sup>j</sup>	29.4 ± 0.2 <sup>f</sup>	22.5 ± 0.2 <sup>k</sup>	45.8 ± 0.3 <sup>h</sup>
14 H	13.3 ± 0.1 <sup>k</sup>	16.4 ± 0.5 <sup>j</sup>	31.0 ± 0.6 <sup>i</sup>	21.1 ± 0.6 <sup>h</sup>	51.0 ± 0.1 <sup>k</sup>

A-H indica el diferente fabricante. <sup>a-k</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función de la muestra analizada.

### 4.4.1.2. *Ácido ascórbico*

No se detecta ácido ascórbico en ninguna de las bebidas de vegetales estudiadas ni tras la determinación por polarografía diferencial de impulsos ni por electroforesis capilar, lo cual, teniendo en cuenta que se trata de una bebida de vegetales y que éstos en fresco tienen un contenido apreciable de vitamina C, indica que se ha perdido totalmente durante el procesado. Pinilla et al. (2005) y también Arnao et al. (2001) obtienen valores de vitamina C en el intervalo de 6-13 mg/100mL en bebidas de vegetales pasteurizadas y por otra parte Elez-Martinez y Martín-Belloso (2007) obtienen un contenido de 18 mg/100mL en una bebida de vegetales preparada en el laboratorio después de pasteurización térmica (90°C/1min). Estos últimos autores atribuyen los niveles más altos de vitamina C obtenidos en su estudio al origen de los vegetales frescos utilizados y al tratamiento aplicado en el procesado para la preparación de las muestras.

Todas las bebidas de vegetales analizadas en nuestro estudio se almacenan y comercializan a temperatura ambiente, con lo cual se deduce que son sometidos a un tratamiento de esterilización, que afecta de forma muy intensa a la degradación de ácido ascórbico.

### 4.4.1.3. *Compuestos fenólicos*

Las concentraciones de compuestos fenólicos totales de las diferentes bebidas de vegetales analizadas se sitúan en el intervalo  $62.4 \pm 8.5$  a  $272.1 \pm 16.5$  mg ácido gálico/100 mL bebida, obteniendo el contenido más bajo de compuestos fenólicos para la muestra 5C que es la única que no presenta en su composición cebolla (véase Cuadro nº 37). Pinilla et al. (2005) obtienen valores de contenido en compuestos fenólicos en bebidas de vegetales comprendidos en similares intervalos a los observados en este estudio. La variabilidad entre el contenido de fenoles totales es debida a la diferente composición de las bebidas de vegetales y probablemente también al tratamiento térmico al que han



sido sometidas. Pinilla et al. (2005) observan en su estudio como el tratamiento térmico puede favorecer la ruptura celular y favorecer la liberación de compuestos intracelulares como los compuestos fenólicos.

**Cuadro n° 37.** Concentración de compuestos fenólicos totales y carotenoides totales de las bebidas de vegetales comerciales analizadas.

Muestra	FST (mg GAE/100mL)	CT (µg/100mL)
1 A	167.9±12.4 <sup>a</sup>	3609.4±115.2 <sup>a</sup>
2 A	173.0±12.3 <sup>a</sup>	1422.2±49.9 <sup>b</sup>
3 B	91.5±1.3 <sup>bc</sup>	2436.7±130.5 <sup>c</sup>
4 B	71.4±5.6 <sup>d</sup>	984.0±19.8 <sup>d</sup>
5 C	62.4± 8.5 <sup>d</sup>	1085.3±123.5 <sup>d</sup>
6 C	75.5±5.2 <sup>cd</sup>	1896.2±70.6 <sup>e</sup>
7 C	124.9±5.6 <sup>e</sup>	2262.1±80.2 <sup>c</sup>
8 D	72.5±1.4 <sup>d</sup>	1634.2±123.5 <sup>b</sup>
9 E	102.6±4.1 <sup>b</sup>	2802.7±203.2 <sup>f</sup>
10 E	272.1±16.5 <sup>f</sup>	2781.9±88.2 <sup>f</sup>
11 E	142.4±12.8 <sup>g</sup>	1605.1±51.9 <sup>b</sup>
12 F	93.7±12.3 <sup>bc</sup>	2844.3±70.6 <sup>f</sup>
13 G	98.5±6.8 <sup>b</sup>	2295.4±176.1 <sup>c</sup>
14 H	101.6±9.5 <sup>b</sup>	2470.1±141.1 <sup>c</sup>

A-H indica el diferente fabricante. <sup>a-g</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función de la muestra analizada.

#### 4.4.1.4. Carotenoides totales

La concentración de carotenoides totales también varía ampliamente de unas muestras a otras encontrándose de 984.0±19.8 µg/100mL a 3609.4±115.2 µg/100mL (veáse Cuadro n° 37).

Respecto a los parámetros fisicoquímicos se encuentran correlaciones positivas entre las concentraciones de carotenoides totales y los valores de pH ( $r= 0.559$ ,  $p<0.05$ ),  $a^*$  ( $r= 0.693$ ,  $p<0.05$ ) y  $b^*$

## Parte experimental

---

( $r= 0.416$ ,  $p<0.05$ ), mientras que se correlacionan negativamente con los valores de índice de turbidez ( $r= -0.522$ ,  $p<0.05$ ). También se observan correlaciones entre el contenido de carotenoides y el de compuestos fenólicos ( $r= 0.393$ ,  $p<0.05$ ).

En la Figura n° 23 se muestra la localización de las bebidas según la escala de color obtenida ( $a^*b^*$ ). En los ejes de ordenadas y coordenadas se representan los valores de Chroma. Cabe destacar que las muestras 1A, 7C, 10E y 12F, situadas en la parte superior derecha (colores rojo-amarillentos intensos) y con valores de Chroma $>25$  son las muestras que presentan una mayor cantidad de carotenoides, mientras que las muestras 9E, 13G y 14H que también presentan un alto contenido en carotenoides se encuentran situadas en la parte inferior izquierda. Estas muestras al igual que las anteriores también presentan valores positivos de  $a^*$  pero valores de Chroma $<25$ .

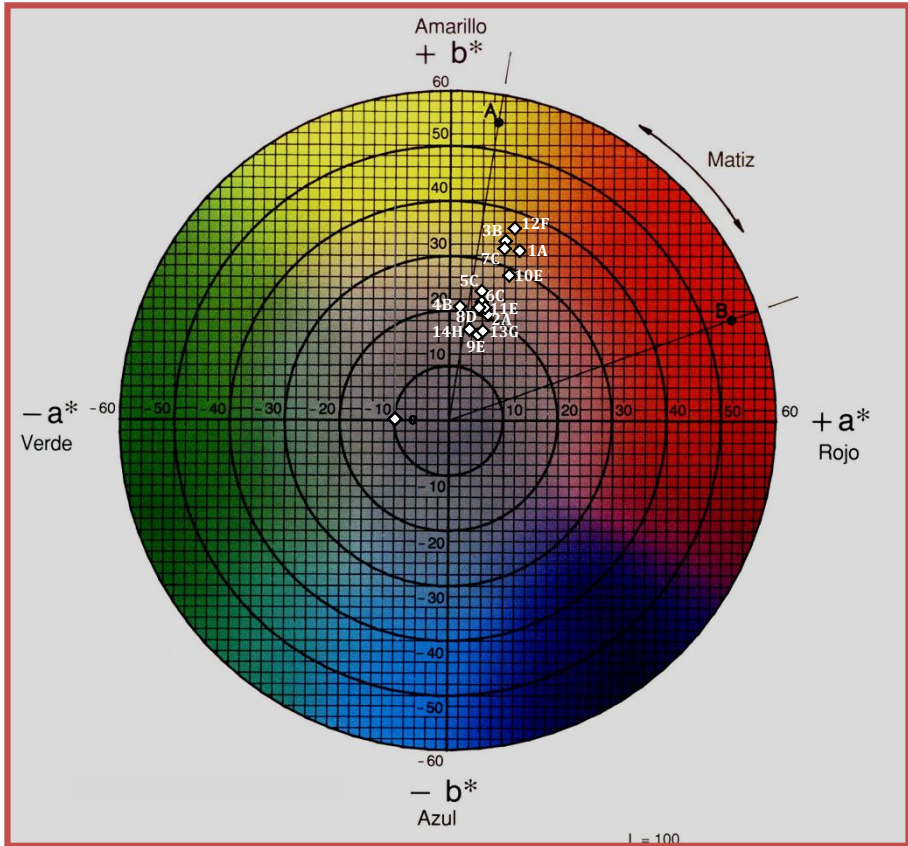


Figura n° 23. Posición de las bebidas de vegetales en el plano  $a^*b^*$ .

## Parte experimental

### 4.4.1.5. Capacidad antioxidante

En el Cuadro n° 38 se muestra la capacidad antioxidante total de las bebidas a base de vegetales comercializadas obtenida por diferentes métodos.

Como puede observarse, la capacidad antioxidante obtenida para las diferentes bebidas mediante ensayo ORAC presenta un valor numérico superior en todos los casos a la obtenida mediante los otros ensayos y que los valores más bajos se obtienen con el método DPPH.

**Cuadro n° 38.** Capacidad antioxidante total de las bebidas de vegetales comerciales analizadas.

Muestras	ACL (mM)	ACW (mM)	DPPH (mM)	TEAC (mM)	ORAC (mM)
1 A	0.79±0.00 <sup>a</sup>	0.78±0.04 <sup>a</sup>	0.27±0.01 <sup>ab</sup>	1.74±0.07 <sup>a</sup>	7.14±0.08 <sup>abc</sup>
2 A	0.90±0.02 <sup>b</sup>	0.99±0.09 <sup>b</sup>	0.18±0.04 <sup>c</sup>	1.02±0.09 <sup>b</sup>	6.84±0.11 <sup>de</sup>
3 B	0.40±0.00 <sup>c</sup>	0.41±0.02 <sup>c</sup>	0.09±0.00 <sup>d</sup>	1.78±0.17 <sup>c</sup>	6.93±0.10 <sup>abde</sup>
4 B	0.40±0.00 <sup>c</sup>	0.65±0.00 <sup>d</sup>	0.18±0.00 <sup>c</sup>	0.98±0.08 <sup>b</sup>	4.08±0.11 <sup>f</sup>
5 C	0.46±0.00 <sup>d</sup>	0.44±0.02 <sup>c</sup>	0.30±0.00 <sup>d</sup>	0.76±0.06 <sup>c</sup>	5.26±0.20 <sup>g</sup>
6 C	0.84±0.02 <sup>e</sup>	0.63±0.00 <sup>d</sup>	0.26±0.01 <sup>ae</sup>	1.55±0.09 <sup>d</sup>	7.07±0.12 <sup>abcd</sup>
7 C	0.46±0.01 <sup>d</sup>	0.63±0.04 <sup>d</sup>	0.32±0.00 <sup>f</sup>	1.97±0.04 <sup>ef</sup>	6.81±0.13 <sup>de</sup>
8 D	0.46±0.02 <sup>d</sup>	0.76±0.02 <sup>a</sup>	0.30±0.01 <sup>d</sup>	2.18±0.24 <sup>eg</sup>	6.78±0.11 <sup>de</sup>
9 E	0.49±0.00 <sup>de</sup>	0.30±0.00 <sup>e</sup>	0.19±0.00 <sup>c</sup>	1.80±0.23 <sup>fh</sup>	7.24±0.15 <sup>c</sup>
10 E	0.53±0.00 <sup>fg</sup>	0.86±0.02 <sup>f</sup>	0.37±0.02 <sup>g</sup>	1.45±0.03 <sup>d</sup>	7.29±0.13 <sup>c</sup>
11 E	0.54±0.02 <sup>f</sup>	0.78±0.04 <sup>a</sup>	0.29±0.01 <sup>bd</sup>	1.13±0.07 <sup>b</sup>	6.87±0.06 <sup>ade</sup>
12 F	0.36±0.00 <sup>h</sup>	0.46±0.02 <sup>c</sup>	0.24±0.00 <sup>eh</sup>	1.83±0.11 <sup>fh</sup>	6.72±0.08 <sup>e</sup>
13 G	0.86±0.04 <sup>be</sup>	0.73±0.00 <sup>a</sup>	0.29±0.01 <sup>bd</sup>	2.20±0.02 <sup>g</sup>	7.20±0.21 <sup>ac</sup>
14 H	0.36±0.00 <sup>h</sup>	0.43±0.00 <sup>c</sup>	0.23±0.00 <sup>h</sup>	1.04±0.06 <sup>b</sup>	7.28±0.18 <sup>c</sup>

A-H indica el diferente fabricante. <sup>a-h</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función de la muestra analizada.

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 múltiple, obteniéndose los siguientes modelos (Cuadro n° 39):

El valor de R<sup>2</sup> obtenido indica el % en el cual los distintos modelos explicarían los valores obtenidos experimentalmente.

Las concentraciones de compuestos fenólicos son las que determinarían principalmente los valores de capacidad antioxidante total para el método ACW.

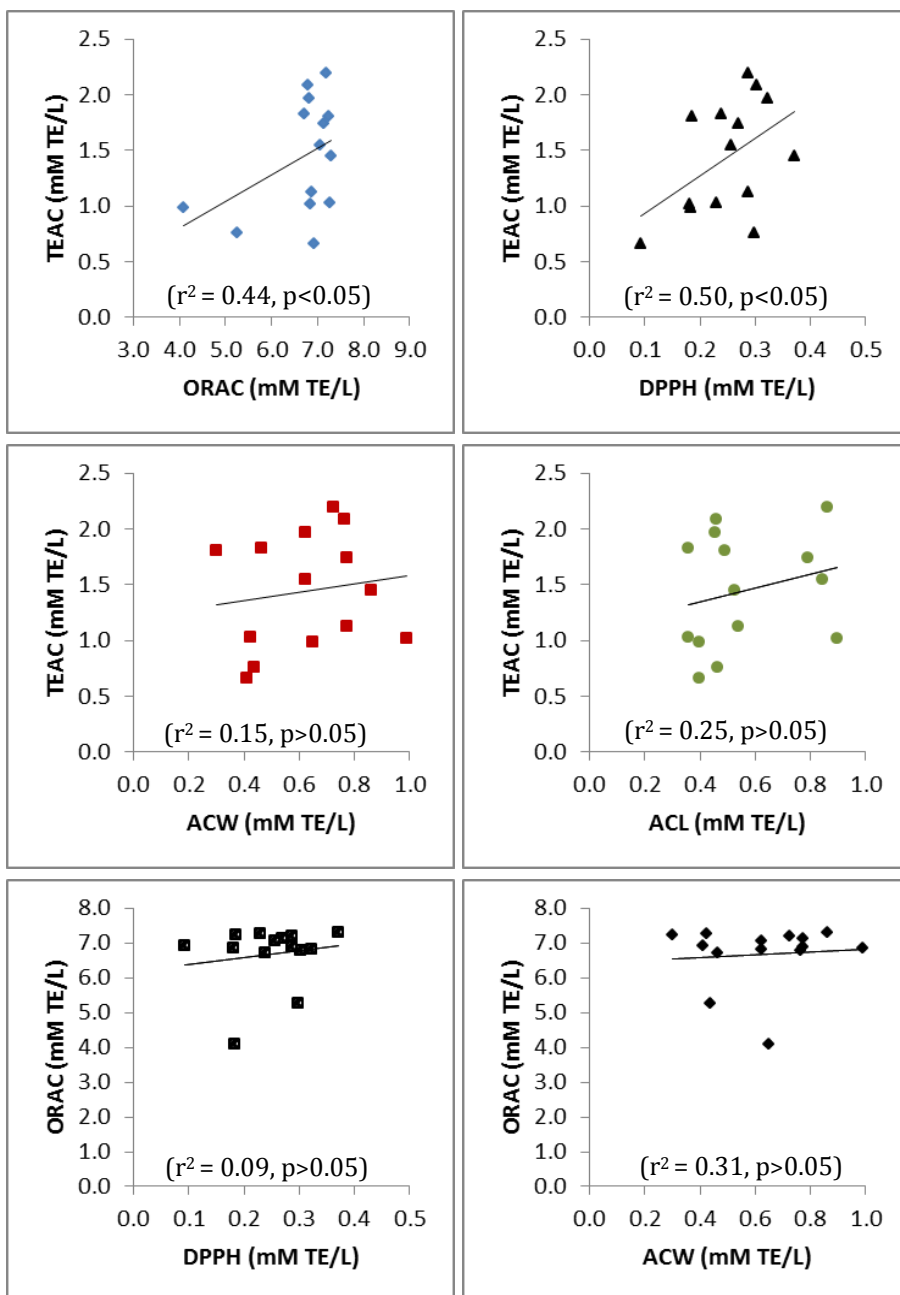
**Cuadro n° 39.** Contribución de los compuestos bioactivos a la capacidad antioxidante

Método	Ecuación	R <sup>2</sup> (%)
ACL	$0.6027+0.0008*[FST]-0.0000*[CT]$	8.99*
ACW	$0.6883+0.0026*[FST]-0.0001*[CT]$	62.30*
DPPH	$0.2102+0.0005*[FST]-0.0000*[CT]$	14.91*
TEAC	$0.7671-0.0016*[FST]+0.0003*[CT]$	24.10*
ORAC	$4.3718+0.0027*[FST]+0.0007*[CT]$	54.19*

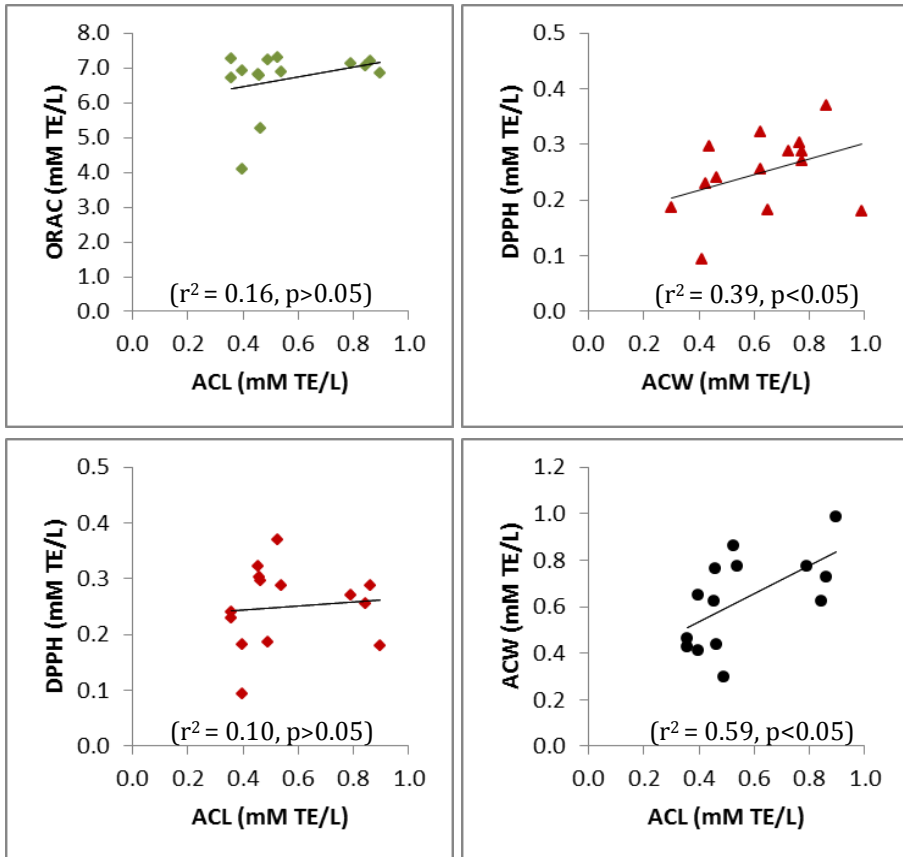
FST: fenoles solubles totales. CT: carotenoides totales. ND: no detectable.\*nivel de confianza 95%.

Se observan las correlaciones lineares entre los métodos en la Figura n° 24.

## Parte experimental



**Figura n° 24.** Correlación entre los valores de capacidad antioxidante en los diferentes métodos de medida.



**Figura n° 24 (continuación).** Correlación entre los valores de capacidad antioxidante en los diferentes métodos de medida.

#### 4.4.1.6. Grasa y perfil ácidos grasos

El contenido de grasa de las bebidas de vegetales estudiadas está comprendido en el intervalo 1.36-3.77 g/100 mL.

La composición de ácidos grasos (%) de las bebidas de vegetales estudiadas se muestra en los Cuadros n° 40-42. Los ácidos grasos mayoritarios son oleico (18:1), linoleico (18:2), palmítico (16:0) y esteárico (18:0).

En la bebida 10E se obtiene un perfil de ácidos grasos diferente a todas las demás muestras estudiadas, ya que además de aceite de oliva

## Parte experimental

contiene mayonesa (con aceite de girasol y yema de huevo) y nata, lo cual modifica el perfil lipídico de forma considerable. Así pues, en lo que respecta a los SFA, la muestra 10E presenta ácido láurico (12:0) y mirístico (14:0) en su composición a diferencia de todas las demás muestras, en las que no se detectan estos ácidos grasos, además también se observa un mayor porcentaje de esteárico (18:0). El porcentaje de MUFA es inferior al resto de muestras, debido al menor porcentaje de oleico presente en la muestra 10E.

La cantidad de PUFA observada es significativamente ( $p < 0.05$ ) superior en esta muestra si se compara con el resto de bebidas debido al contenido en ácido linoleico (34.3%) procedente del aceite de girasol.

**Cuadro n° 40.** Ácidos grasos saturados (%) de las muestras analizadas

Muestra	Láurico C12:0	Mirístico C14:0	Palmítico C16:0	Esteárico C18:0	SFA
1 A	ND	ND	11.5±0.1 <sup>a</sup>	3.4±0.0 <sup>abc</sup>	14.9±0.0 <sup>a</sup>
2 A	ND	ND	10.7±0.1 <sup>b</sup>	3.3±0.1 <sup>ade</sup>	14.0±0.0 <sup>b</sup>
3 B	ND	ND	11.1±0.1 <sup>cd</sup>	3.2±0.1 <sup>de</sup>	14.3±0.2 <sup>cd</sup>
4 B	ND	ND	10.5±0.1 <sup>be</sup>	3.5±0.1 <sup>f</sup>	14.1±0.0 <sup>bc</sup>
5 C	ND	ND	12.4±0.1 <sup>f</sup>	3.3±0.1 <sup>abcd</sup>	15.7±0.0 <sup>e</sup>
6 C	ND	ND	10.0±0.1 <sup>g</sup>	3.4±0.0 <sup>ab</sup>	13.4±0.0 <sup>f</sup>
7 C	ND	ND	11.2±0.1 <sup>c</sup>	3.2±0.1 <sup>e</sup>	14.4±0.1 <sup>dg</sup>
8 D	ND	ND	11.0±0.2 <sup>d</sup>	3.2±0.1 <sup>e</sup>	14.1±0.3 <sup>bc</sup>
9 E	ND	ND	10.4±0.1 <sup>eh</sup>	3.3±0.0 <sup>abcd</sup>	13.7±0.1 <sup>f</sup>
10 E	0.2±0.0	0.5±0.0	10.0±0.1 <sup>g</sup>	4.0±0.1 <sup>g</sup>	14.6±0.1 <sup>g</sup>
11 E	ND	ND	11.2±0.1 <sup>c</sup>	3.4±0.0 <sup>bf</sup>	14.7±0.1 <sup>ag</sup>
12 F	ND	ND	10.3±0.1 <sup>h</sup>	3.3±0.0 <sup>abde</sup>	13.5±0.2 <sup>f</sup>
13 G	ND	ND	10.3±0.0 <sup>h</sup>	3.4±0.0 <sup>abc</sup>	13.7±0.0 <sup>f</sup>
14 H	ND	ND	9.2±0.1 <sup>i</sup>	2.3±0.1 <sup>h</sup>	11.5±0.2 <sup>h</sup>

A-H indica el diferente fabricante. <sup>a-i</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función de la muestra analizada.



En la mayoría de las muestras, los porcentajes de ácido oleico están dentro del intervalo de  $73.4 \pm 0.2$ – $79.9 \pm 0.1$ , excepto para la bebida 5C ( $66.6 \pm 0.0$ ) y la anteriormente comentada 10E ( $49.4 \pm 0.1$ ) que presentan el menor contenido de todas.

El perfil de ácidos grasos en las diferentes bebidas de vegetales es muy parecido al observado por otros autores para aceite de oliva, ya que la fracción grasa obtenida corresponde mayoritariamente al aceite de oliva que se añade (Kim et al., 2010). Sin embargo, se observan algunas modificaciones en los distintos ácidos grasos entre las muestras por la cantidad de aceite añadido, siendo otro de los factores que influye decisivamente en el perfil lipídico los vegetales y el porcentaje de los mismo añadido y dependiendo de la variedad de tomate utilizada, los ácidos grasos mayoritarios son el linoleico, palmítico y oleico, con niveles de ácido linoleico comprendidos en un intervalo de 60.4 a 61.8% (Guil-Guerrero et al., 2009). Esto puede explicar el mayor porcentaje de ácido linoleico que presentan las muestras 5C (15.1%), 7C (9.6%), 8D (10.1%), 12F (8.7%) en comparación con los niveles de ácido linoleico observados por Kim et al. (2010) en aceite de oliva que fueron de 7.2%.

## Parte experimental

---

**Cuadro n° 41.** Ácidos grasos monoinsaturados (%) de las muestras analizadas

Muestra	Palmitoleico C16:1	Oleico C18:1	MUFA
1 A	0.4±0.1 <sup>ab</sup>	75.3±0.1 <sup>a</sup>	75.8±0.0 <sup>a</sup>
2 A	0.6±0.0 <sup>cd</sup>	76.3±0.0 <sup>b</sup>	76.9±0.1 <sup>bc</sup>
3 B	0.9±0.0 <sup>e</sup>	78.0±0.0 <sup>c</sup>	78.9±0.0 <sup>d</sup>
4 B	0.7±0.0 <sup>f</sup>	79.9±0.1 <sup>d</sup>	80.6±0.2 <sup>e</sup>
5 C	ND	66.6±0.0 <sup>e</sup>	66.6±0.0 <sup>f</sup>
6 C	0.5±0.0 <sup>ad</sup>	78.3±0.0 <sup>f</sup>	78.8±0.0 <sup>g</sup>
7 C	0.6±0.0 <sup>cd</sup>	73.6±0.2 <sup>g</sup>	74.2±0.1 <sup>h</sup>
8 D	0.7±0.0 <sup>cf</sup>	73.4±0.2 <sup>g</sup>	74.1±0.1 <sup>h</sup>
9 E	0.5±0.0 <sup>ad</sup>	76.2±0.1 <sup>b</sup>	76.8±0.1 <sup>b</sup>
10 E	0.4±0.0 <sup>b</sup>	49.4±0.1 <sup>h</sup>	49.8±0.0 <sup>i</sup>
11 E	0.4±0.1 <sup>b</sup>	75.3±0.1 <sup>a</sup>	75.7±0.1 <sup>a</sup>
12 F	0.6±0.1 <sup>cd</sup>	75.2±0.2 <sup>a</sup>	75.6±0.2 <sup>a</sup>
13 G	0.5±0.0 <sup>ab</sup>	76.5±0.1 <sup>i</sup>	77.0±0.0 <sup>c</sup>
14 H	0.4±0.0 <sup>ab</sup>	78.1±0.1 <sup>cf</sup>	78.5±0.0 <sup>j</sup>

A-H indica el diferente fabricante. <sup>a-j</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función de la muestra analizada.

**Cuadro n° 42.** Ácidos grasos poliinsaturados (%) de las muestras analizadas

Sample	Linoleico C18:2	$\alpha$ -Linolénico C18:3	Aráquico C20:4	PUFA
1 A	7.5±0.2 <sup>ab</sup>	ND	ND	7.5±0.2 <sup>a</sup>
2 A	7.5±0.0 <sup>a</sup>	ND	ND	7.5±0.0 <sup>a</sup>
3 B	5.0±0.1 <sup>c</sup>	1.0±0.1 <sup>ab</sup>	0.4±0.0 <sup>b</sup>	6.4±0.2 <sup>b</sup>
4 B	4.7±0.0 <sup>d</sup>	ND	ND	4.7±0.0 <sup>c</sup>
5 C	15.1±0.1 <sup>e</sup>	2.4±0.1 <sup>d</sup>	ND	17.5±0.2 <sup>d</sup>
6 C	6.3±0.1 <sup>f</sup>	ND	ND	6.3±0.1 <sup>b</sup>
7 C	9.6±0.1 <sup>g</sup>	0.9±0.0 <sup>e</sup>	0.3±0.0 <sup>cd</sup>	10.8±0.0 <sup>e</sup>
8 D	10.1±0.1 <sup>h</sup>	0.9±0.1 <sup>e</sup>	0.4±0.0 <sup>be</sup>	11.4±0.0 <sup>f</sup>
9 E	7.5±0.1 <sup>ab</sup>	0.9±0.0 <sup>e</sup>	0.3±0.1 <sup>cd</sup>	8.7±0.2 <sup>g</sup>
10 E	34.3±0.1 <sup>i</sup>	0.6±0.1 <sup>c</sup>	0.3±0.0 <sup>cd</sup>	35.1±0.0 <sup>h</sup>
11 E	7.3±0.0 <sup>ab</sup>	0.7±0.0 <sup>f</sup>	0.3±0.0 <sup>d</sup>	8.3±0.0 <sup>i</sup>
12 F	8.7±0.3 <sup>j</sup>	1.1±0.0 <sup>g</sup>	0.4±0.0 <sup>be</sup>	10.2±0.2 <sup>j</sup>
13 G	7.5±0.1 <sup>ab</sup>	0.9±0.0 <sup>e</sup>	0.3±0.0 <sup>c</sup>	8.7±0.0 <sup>g</sup>
14 H	7.3±0.1 <sup>b</sup>	0.6±0.0 <sup>c</sup>	0.4±0.0 <sup>e</sup>	8.3±0.1 <sup>i</sup>

A-H indica el diferente fabricante. <sup>a-j</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función de la muestra analizada.

### *4.4.2. Preparación y caracterización de una nueva bebida de vegetales*

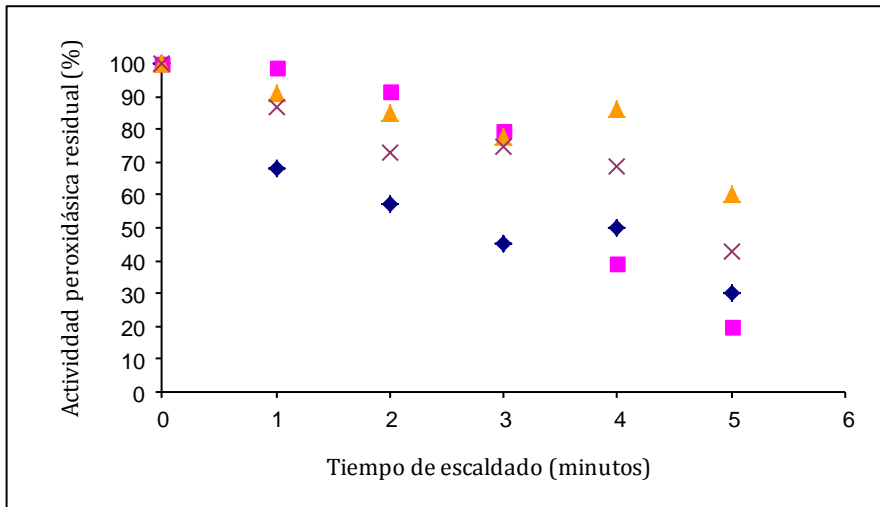
Una vez analizadas las bebidas del mercado, se procede a preparar una bebida de similares características, con un alto contenido en compuestos bioactivos y con una buena aceptación desde el punto de vista organoléptico por parte del consumidor. El tipo de vegetales seleccionados en la formulación de la bebida son: tomate y pimiento, mayoritariamente y en menor proporción pepino, cebolla, zanahoria, además se añade zumo de limón, agua y aceite de oliva. Todos éstos constituyentes presentan una gran riqueza nutricional (ácido ascórbico, carotenoides, compuestos fenólicos y minerales). La descripción de la muestra se detalla en el apartado 4.1.2.

#### *Optimización de la preparación de la bebida.*

Las primeras pruebas realizadas se encaminan a conseguir la estabilidad de los micronutrientes en los diferentes vegetales utilizados. Durante la preparación de la bebida se observan pérdidas del 100% en las concentraciones de ácido ascórbico debido fundamentalmente a la actividad enzimática residual. Para garantizar que dichos micronutrientes se mantienen en la bebida se procede a realizar un tratamiento de escaldado de los vegetales. El escaldado no constituye un método de conservación por sí mismo, sino que sólo es un tratamiento de acondicionamiento de la materia prima, cuyo objetivo es inactivar enzimas que puedan producir modificaciones organolépticas y nutritivas del alimento. La eficacia del escaldado se puede controlar mediante la inactivación o persistencia de la peroxidasa, ya que es una de las enzimas más termorresistentes, de modo que cuando se inactiva, implica que normalmente los demás sistemas enzimáticos están inactivados. Por otra parte, el ácido ascórbico es soluble en agua, perdiéndose fácilmente durante los procesos de escaldado y lavado de

frutas, verduras y hortalizas, y es una de las vitaminas más termolábiles, por lo que es utilizada como parámetro de calidad, siendo un indicador de la pérdida vitamínica de un alimento durante su procesado y almacenamiento.

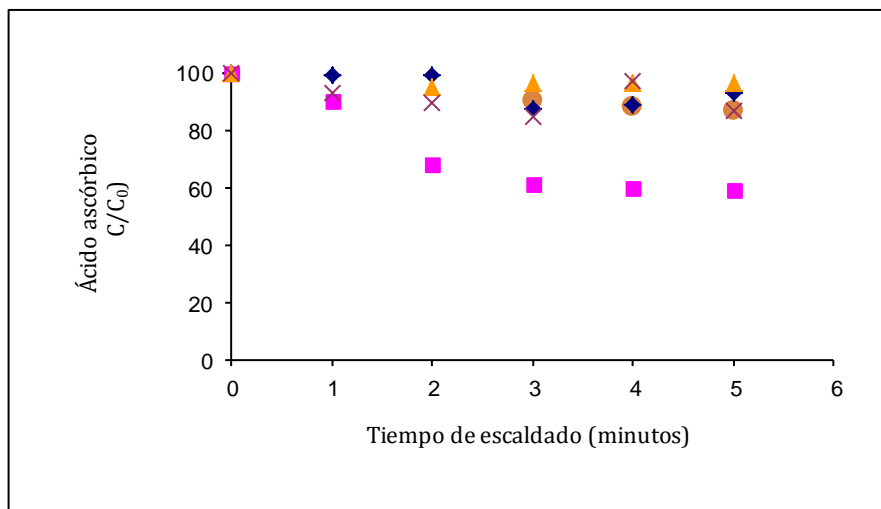
Cada vegetal se escalda por separado a  $95\pm 2^\circ\text{C}$  durante 1, 2, 3, 4 y 5 minutos. Como puede observarse en la Figura n° 25 tras aplicar un tratamiento de escaldado durante 5 minutos, la actividad peroxidásica residual es de 19.6%, 29.9%, 42.5% y 60.0% en pimiento, tomate, apio y pepino, respectivamente.



**Figura n° 25.** Actividad peroxidásica residual en diferentes vegetales (◆ tomate, ■ pimiento verde, △ pepino, × apio) durante el escaldado

Por otra parte, el contenido de ácido ascórbico expresado en mg/100g de producto se muestra en la Figura n° 26.

## Parte experimental



**Figura n° 26.** Concentración remanente de ácido ascórbico en diferentes vegetales (◆ tomate, ■ pimienta verde, △ pepino, × apio) durante el escaldado

Las concentraciones de ácido ascórbico en los vegetales frescos son de 147.5, 17.1, 1.8 y 1.2 mg /100g en pimienta, tomate, apio y pepino, respectivamente. La concentración remanente después de cada tratamiento de ácido ascórbico se determina para tomate y pimienta, vegetales que poseen las mayores concentraciones.

La concentración remanente de ácido ascórbico en el tomate oscila entre el 80 y 85% a partir de 3 minutos de escaldado, sin embargo en el pimienta verde entre 60-65% a partir de 2 minutos de escaldado.

También se determina la concentración de ácido ascórbico a las 4 y 24 horas después de aplicar el tratamiento de escaldado, con el objeto de conocer su estabilidad. Se ha comprobado que después de escaldar los distintos vegetales (tomate, pimienta verde, pepino y apio) el contenido de ácido ascórbico permanece estable durante 48 horas en refrigeración a 4° C. Por tanto las condiciones de escaldado seleccionadas son: 95±2°C durante 5 minutos.

En el presente trabajo se pretende evaluar el efecto de las APH sobre una bebida a base de vegetales con un alto contenido en compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Por lo que en cada uno de los vegetales seleccionados para la formulación de la bebida se determina la concentración de ácido ascórbico, carotenoides totales, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante. Los resultados se muestran en el Cuadro n° 43.

**Cuadro n° 43.** Contenido en compuestos bioactivos y capacidad antioxidante de distintos vegetales.

	AA (mg/100g)	FST mg GAE/kg	CT (µg/100g)	ORAC (mM/kg)	TEAC (mM/kg)
Tomate	18.7±0.4	640.6±7.3	1590.5±100.1	10.4±0.3	1.53±0.03
Pimiento verde	147.1±7.4	495.2±6.0	790.3±80.4	7.1±0.3	1.04±0.06
Cebolla	19.1±0.7	886.7±11.8	270.3±20.3	10.3±0.7	2.46±0.03
Apio	1.8±0.2	221.2±6.8	460.3±30.2	5.3±0.5	1.77±0.03
Pepino	1.6±0.1	330.6±9.6	110.5±10.3	3.3±0.4	1.27±0.02
Zanahoria	-	563.7±11.8	4020.3±100.6	11.4±0.5	2.32±0.03
Limón	37.6±0.7	1018.3±28.1	320.3±20.2	6.5±0.4	3.35±0.01

#### *4.4.3. Efecto de las APH sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante de la bebida a base de vegetales.*

Las condiciones del tratamiento por APH son: 100, 200, 300 y 400 MPa durante 120, 300, 420 y 540s. El equipo y modo operatorio se describen en el apartado 4.3.2.1.

Para poder evaluar el efecto de las APH, paralelamente se analiza una muestra sin tratar y también tratada térmicamente (90 y 98°C, 15 y 21 s) para poder comparar los resultados obtenidos.

Las muestras control presentan un valor de pH de  $4.21 \pm 0.02$ , de °Brix de  $4.20 \pm 0.01$  y de  $0.26 \pm 0.01$  para el índice de turbidez. Tras la aplicación de los distintos tratamientos por APH, los parámetros anteriormente citados se mantienen sin variaciones estadísticamente significativas. Por otra parte el índice de pardeamiento de la muestra sin tratar (0.076) aumenta significativamente ( $p < 0.05$ ) al aplicar los diferentes tratamientos por APH (0.080-0.087).

La concentración de ácido ascórbico en el producto sin tratar es de  $18.0 \pm 0.6$  mg/100 mL. En el Cuadro n° 44 se muestran las concentraciones de ácido ascórbico obtenidas al aplicar los distintos tratamientos por APH. Se observa una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) cuando el tiempo de tratamiento es de 420 s o superior, pero en cualquier caso las pérdidas son inferiores al 9%. En el caso del tratamiento térmico, el porcentaje remanente oscila entre 94% y 88% para el tratamiento más suave y más severo respectivamente.

En lo que respecta al contenido en compuestos fenólicos, después de los distintos tratamientos por APH no se observan modificaciones dependientes de la presión o del tiempo de aplicación aunque tampoco en el tratamiento térmico (Cuadro n° 44).



**Cuadro n° 44.** Concentración de varios compuestos antioxidantes de la bebida de vegetales sin tratar, tratada por APH y por tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo (s)	AA (mg/100 mL)	FST (mg GAE/L)	CT (mg/100 mL)
<b>Sin tratar</b>	0	18.0±0.6 <sup>a</sup>	746.9±90.5 <sup>a</sup>	0.262±0.035 <sup>abc</sup>
<b>90°C</b>	15	17.0±0.1 <sup>bcde</sup>	848.7±56.0 <sup>a</sup>	0.271±0.012 <sup>ab</sup>
	21	16.4±0.2 <sup>def</sup>	807.8±60.7 <sup>a</sup>	0.272±0.018 <sup>ab</sup>
<b>98°C</b>	15	16.5±0.3 <sup>cdef</sup>	732.6±21.9 <sup>a</sup>	0.256±0.012 <sup>abcd</sup>
	21	15.9±0.1 <sup>f</sup>	820.7±31.0 <sup>a</sup>	0.281±0.023 <sup>a</sup>
<b>APH</b>	120	17.7±0.1 <sup>ab</sup>	684.9±28.3 <sup>a</sup>	0.195±0.018 <sup>cdef</sup>
<b>100 MPa</b>	300	17.0±0.4 <sup>bcde</sup>	737.0±31.1 <sup>a</sup>	0.178±0.005 <sup>ef</sup>
	420	16.5±0.4 <sup>def</sup>	702.9±26.1 <sup>a</sup>	0.135±0.004 <sup>f</sup>
	540	16.4±0.3 <sup>def</sup>	735.1±56.1 <sup>a</sup>	0.187±0.011 <sup>def</sup>
<b>APH</b>	120	17.6±0.4 <sup>ab</sup>	768.1±8.3 <sup>a</sup>	0.171±0.016 <sup>ef</sup>
<b>200 MPa</b>	300	17.5±0.3 <sup>ab</sup>	782.6±20.0 <sup>a</sup>	0.181±0.009 <sup>ef</sup>
	420	16.5±0.0 <sup>def</sup>	678.6±41.6 <sup>a</sup>	0.141±0.016 <sup>ef</sup>
	540	16.4±0.1 <sup>ef</sup>	724.9±10.5 <sup>a</sup>	0.200±0.021 <sup>bcdef</sup>
<b>APH</b>	120	17.5±0.2 <sup>abc</sup>	750.0±53.2 <sup>a</sup>	0.145±0.007 <sup>f</sup>
<b>300 MPa</b>	300	17.0±0.2 <sup>abcde</sup>	761.5±88.2 <sup>a</sup>	0.187±0.001 <sup>def</sup>
	420	16.4±0.2 <sup>ef</sup>	780.1±55.7 <sup>a</sup>	0.167±0.032 <sup>ef</sup>
	540	16.4±0.1 <sup>def</sup>	758.4±67.6 <sup>a</sup>	0.221±0.009 <sup>abcde</sup>
<b>APH</b>	120	17.5±0.2 <sup>abc</sup>	805.1±37.0 <sup>a</sup>	0.188±0.030 <sup>def</sup>
<b>400MPa</b>	300	17.3±0.3 <sup>abcd</sup>	718.9±53.3 <sup>a</sup>	0.157±0.014 <sup>ef</sup>
	420	16.4±0.0 <sup>def</sup>	754.9±14.5 <sup>a</sup>	0.153±0.002 <sup>ef</sup>
	540	16.4±0.1 <sup>ef</sup>	726.2±58.8 <sup>a</sup>	0.165±0.025 <sup>ef</sup>

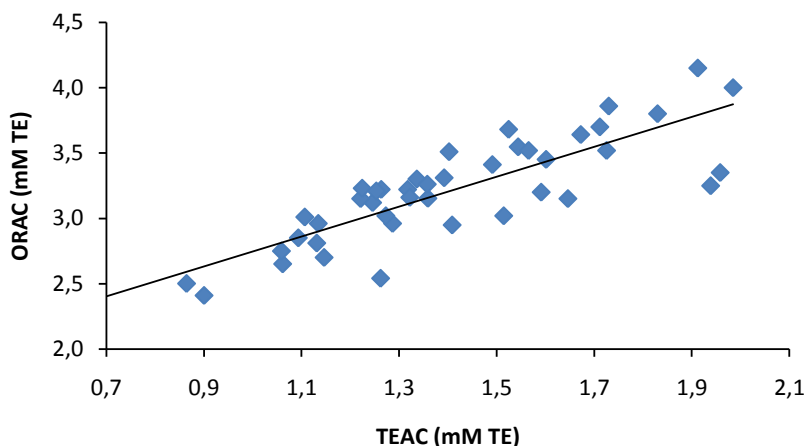
<sup>a-h</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. AA: ácido ascórbico. FST: fenoles solubles totales. CT: carotenoides totales.

Los carotenoides totales se ven particularmente afectados tras el tratamiento por APH, obteniendo resultados inferiores en comparación con la muestra no tratada (véase Cuadro n° 44). El tratamiento térmico no afecta significativamente al contenido en carotenoides totales.

## Parte experimental

---

La capacidad antioxidante promedio de la bebida no tratada es  $1.61 \pm 0.10$  y  $3.70 \pm 0.22$  Mm Trolox para los ensayos TEAC y ORAC, respectivamente. Tras los tratamientos por APH, se observa una disminución en la capacidad antioxidante de la bebida de vegetales. En el Cuadro n° 45 se muestran los resultados de capacidad antioxidante total obtenidos mediante los métodos TEAC y ORAC. Como se observa en la Figura n° 27 existe una correlación positiva ( $r = 0.823$ ,  $p < 0.05$ ) entre ambos métodos.



**Figura n° 27.** Correlación entre los valores de TEAC y ORAC en la bebida a base de vegetales procesada por APH.

Con objeto de evaluar la influencia de presión y tiempo en el tratamiento por APH, se diseña un análisis de regresión múltiple, y los resultados obtenidos muestran que sólo la presión afecta significativamente a los valores de capacidad antioxidante obtenidos por los ensayos TEAC y ORAC (coeficiente de correlación= 0.5124, DE= 0.2215,  $p = 0.0001$ , coeficiente de correlación= 0.5894, DE= 0.3384,  $p = 0.0004$ , respectivamente). Tras el tratamiento por pasteurización térmica se observa un aumento o descenso no significativo en la

capacidad antioxidante (TEAC) mientras que la capacidad antioxidante (ORAC) disminuye.

**Cuadro n° 45.** Valores de capacidad antioxidante total determinada por los métodos TEAC y ORAC de la bebida de vegetales sin tratar, tratada por APH y por tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo (s)	TEAC (mM trolox)	ORAC (mM trolox)
<b>Sin tratar</b>	0	1.61±0.10 <sup>abc</sup>	3.70±0.22 <sup>a</sup>
<b>90°C</b>	15	1.40±0.16 <sup>abcdefg</sup>	2.99±0.04 <sup>bcd</sup>
	21	1.35±0.08 <sup>adefg</sup>	2.75±0.29 <sup>de</sup>
<b>98°C</b>	15	1.80±0.16 <sup>ch</sup>	3.20±0.07 <sup>bfg</sup>
	21	1.75±0.19 <sup>ch</sup>	3.28±0.11 <sup>bf</sup>
<b>APH 100 MPa</b>	120	1.10±0.03 <sup>gi</sup>	2.73±0.11 <sup>e</sup>
	300	1.13±0.07 <sup>gi</sup>	2.73±0.04 <sup>e</sup>
	420	1.28±0.02 <sup>efg</sup>	3.07±0.07 <sup>bcf</sup>
	540	1.21±0.03 <sup>g</sup>	2.46±0.06 <sup>h</sup>
<b>APH 200 MPa</b>	120	1.32±0.03 <sup>defg</sup>	3.19±0.05 <sup>bfg</sup>
	300	1.51±0.13 <sup>abcdef</sup>	3.36±0.07 <sup>gi</sup>
	420	1.66±0.15 <sup>bch</sup>	3.63±0.25 <sup>a</sup>
	540	1.62±0.14 <sup>abcdh</sup>	3.60±0.11 <sup>ai</sup>
<b>APH 300 MPa</b>	120	1.23±0.10 <sup>g</sup>	3.09±0.11 <sup>bcf</sup>
	300	1.33±0.02 <sup>defg</sup>	3.28±0.03 <sup>bf</sup>
	420	1.26±0.03 <sup>efg</sup>	3.19±0.05 <sup>bfg</sup>
	540	1.24±0.02 <sup>fg</sup>	3.22±0.01 <sup>bfg</sup>
<b>APH 400MPa</b>	120	1.11±0.03 <sup>gi</sup>	2.91±0.08 <sup>cde</sup>
	300	1.58±0.09 <sup>abcd</sup>	3.58±0.08 <sup>ai</sup>
	420	1.56±0.22 <sup>abcde</sup>	3.61±0.03 <sup>ai</sup>
	540	1.50±0.09 <sup>abcdef</sup>	4.08±0.11 <sup>j</sup>

<sup>a-h</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

## Parte experimental

En el Cuadro n° 46 se muestran los resultados para los parámetros de color L\*, a\*, b\*.

**Cuadro n° 46.** Valores de a\*, b\* y L\* de una bebida de vegetales sin tratar, tratada por APH y por tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo (s)	a*	b*	L
<b>Sin tratar</b>	0	2.84±0.09 <sup>a</sup>	18.21±0.38 <sup>a</sup>	27.89±0.16 <sup>ef</sup>
<b>90°C</b>	15	3.52±0.02 <sup>gh</sup>	24.11±0.18 <sup>hi</sup>	25.86±0.05 <sup>b</sup>
	21	3.32±0.04 <sup>def</sup>	23.51±0.48 <sup>h</sup>	25.30±0.24 <sup>a</sup>
<b>98°C</b>	15	3.94±0.04 <sup>i</sup>	25.56±0.12 <sup>j</sup>	26.32±0.06 <sup>c</sup>
	21	3.57±0.03 <sup>h</sup>	24.31±0.29 <sup>i</sup>	27.68±0.04 <sup>de</sup>
<b>APH</b>	120	3.28±0.03 <sup>def</sup>	18.58±0.16 <sup>ab</sup>	28.42±0.13 <sup>ij</sup>
<b>100 MPa</b>	300	3.41±0.01 <sup>fg</sup>	18.73±0.10 <sup>abc</sup>	28.89±0.03 <sup>kl</sup>
	420	3.88±0.01 <sup>i</sup>	19.74±0.23 <sup>ef</sup>	29.51±0.09 <sup>m</sup>
	540	3.79±0.07 <sup>i</sup>	19.49±0.02 <sup>de</sup>	29.28±0.03 <sup>m</sup>
<b>APH</b>	120	4.18±0.05 <sup>j</sup>	20.80±0.05 <sup>g</sup>	29.21±0.10 <sup>lm</sup>
<b>200 MPa</b>	300	4.36±0.06 <sup>k</sup>	21.01±0.03 <sup>g</sup>	29.39±0.10 <sup>m</sup>
	420	4.22±0.03 <sup>jk</sup>	19.37±0.09 <sup>cde</sup>	27.77±0.09 <sup>def</sup>
	540	3.86±0.02 <sup>i</sup>	18.91±0.10 <sup>abcd</sup>	27.49±0.05 <sup>d</sup>
<b>APH</b>	120	3.36±0.05 <sup>efg</sup>	20.32±0.06 <sup>fg</sup>	28.08±0.13 <sup>ghi</sup>
<b>300 MPa</b>	300	3.02±0.04 <sup>b</sup>	19.22±0.15 <sup>bcde</sup>	27.56±0.22 <sup>de</sup>
	420	3.21±0.04 <sup>cde</sup>	19.19±0.10 <sup>bcde</sup>	27.57±0.19 <sup>de</sup>
	540	2.79±0.06 <sup>a</sup>	19.04±0.09 <sup>bcde</sup>	27.59±0.11 <sup>de</sup>
<b>APH</b>	120	3.20±0.04 <sup>cd</sup>	18.28±0.22 <sup>a</sup>	28.25±0.08 <sup>hij</sup>
<b>400 MPa</b>	300	3.17±0.07 <sup>bcd</sup>	18.58±0.43 <sup>ab</sup>	27.92±0.12 <sup>efg</sup>
	420	3.42±0.08 <sup>fgh</sup>	19.06±0.37 <sup>bcde</sup>	28.38±0.14 <sup>ij</sup>
	540	3.12±0.03 <sup>bc</sup>	18.83±0.07 <sup>abcd</sup>	28.56±0.05 <sup>jk</sup>

<sup>a-h</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

Los valores de L\* de la bebida de vegetales no tratada (27.89) se ven modificados significativamente ( $p < 0.05$ ) tras los tratamientos por APH presentando valores entre 27.49–29.51, aunque como puede observarse los cambios son muy pequeños. Tras el tratamiento por pasteurización

térmica, se obtiene una disminución significativa en el valor de  $L^*$ , pero también es pequeño el cambio.

Por otra parte, los valores de  $a^*$  ( $2.84 \pm 0.09$ ) muestran una tendencia positiva hacia la coloración roja ( $2.79-4.36$ ) para todas las bebidas tratadas por APH. Los valores de  $b^*$  ( $18.21$ ) también se ven incrementados significativamente ( $p < 0.05$ ) al aplicar el tratamiento por APH ( $18.28-21.01$ ). Tras el tratamiento térmico también se ven incrementados significativamente ( $p < 0.05$ ) los valores de  $a^*$  ( $3.32-3.94$ ) y de  $b^*$  ( $23.51-25.56$ ).

Los valores de  $a^*$  y  $b^*$  presentan una correlación positiva ( $p = 0.0181$ ). En este estudio, también se observa una correlación positiva ( $p = 0.0006$ ) entre el índice de pardeamiento y el valor  $L^*$  en todas las muestras procesadas por APH, sin embargo se observa una correlación negativa entre el valor de índice de pardeamiento y el valor de  $b^*$ .

En el Cuadro n° 47 se muestran los valores de Chroma,  $h^0$  y  $\Delta E^*$  tras aplicar los diferentes tratamientos por APH y pasteurización térmica.

Las muestras tratadas por APH presentan una mayor intensidad de color (Chroma) que la bebida no tratada, pero cuando se trata térmicamente ésta es mucho mayor y significativa. Tras el tratamiento por APH se observa una disminución en  $h^0$  y un ligero aumento en este parámetro en las tratadas por calor.

Tras los diferentes tratamientos por APH aplicados, no se observan cambios notables en el color de las bebidas ( $\Delta E < 3$ ), excepto en dos casos (120 y 300s) cuando se aplican 200 MPa, sin embargo el tratamiento térmico, en todos los casos, le confiere cambios de color notables iguales o superiores a 6.

## Parte experimental

**Cuadro n° 47.** Chroma,  $h^0$  e  $\Delta E$  de la bebida de vegetales sin tratar, tratada por APH y por tratamiento térmico.

Tratamiento	Tiempo(s)	Chroma	$h^0$	$\Delta E$
<b>Sin tratar</b>	0	18.43±0.38 <sup>a</sup>	81.15±0.11 <sup>j</sup>	0 <sup>a</sup>
<b>90°C</b>	15	24.36±0.13 <sup>ij</sup>	81.70±0.09 <sup>k</sup>	6.27±0.11 <sup>g</sup>
	21	23.75±0.47 <sup>i</sup>	81.95±0.25 <sup>k</sup>	5.93±0.50 <sup>g</sup>
<b>98°C</b>	15	25.87±0.13 <sup>k</sup>	81.23±0.05 <sup>j</sup>	7.60±0.14 <sup>h</sup>
	21	24.57±0.29 <sup>j</sup>	81.64±0.07 <sup>k</sup>	6.14±0.29 <sup>g</sup>
<b>APH</b>	120	18.86±0.16 <sup>abc</sup>	80.00±0.13 <sup>fgh</sup>	0.80±0.04 <sup>bc</sup>
<b>100 MPa</b>	300	19.04±0.10 <sup>abc</sup>	79.68±0.04 <sup>f</sup>	1.26±0.06 <sup>c</sup>
	420	20.12±0.23 <sup>ef</sup>	78.87±0.10 <sup>de</sup>	2.47±0.10 <sup>e</sup>
	540	19.85±0.04 <sup>de</sup>	79.00±0.18 <sup>e</sup>	2.11±0.06 <sup>de</sup>
<b>APH</b>	120	21.22±0.06 <sup>gh</sup>	78.65±0.10 <sup>cd</sup>	3.21±0.09 <sup>f</sup>
<b>200 MPa</b>	300	21.45±0.02 <sup>hi</sup>	78.28±0.15 <sup>b</sup>	3.52±0.06 <sup>f</sup>
	420	19.83±0.09 <sup>de</sup>	77.72±0.08 <sup>a</sup>	1.81±0.06 <sup>d</sup>
	540	19.20±0.10 <sup>bcd</sup>	78.39±0.02 <sup>bc</sup>	1.26±0.03 <sup>c</sup>
<b>APH</b>	120	20.60±0.07 <sup>fg</sup>	80.61±0.12 <sup>i</sup>	2.19±0.08 <sup>de</sup>
<b>300 MPa</b>	300	19.45±0.15 <sup>cde</sup>	81.07±0.05 <sup>j</sup>	1.10±0.08 <sup>c</sup>
	420	19.46±0.10 <sup>cde</sup>	80.52±0.08 <sup>i</sup>	1.11±0.05 <sup>c</sup>
	540	19.24±0.10 <sup>bcd</sup>	81.65±0.14 <sup>k</sup>	0.89±0.04 <sup>bc</sup>
<b>APH</b>	120	18.55±0.22 <sup>ab</sup>	80.08±0.02 <sup>gh</sup>	0.55±0.04 <sup>b</sup>
<b>400 MPa</b>	300	18.85±0.43 <sup>abc</sup>	80.32±0.03 <sup>hi</sup>	0.55±0.33 <sup>b</sup>
	420	19.36±0.37 <sup>cd</sup>	79.84±0.15 <sup>fg</sup>	1.17±0.24 <sup>c</sup>
	540	19.09±0.07 <sup>bc</sup>	80.60±0.12 <sup>i</sup>	0.96±0.06 <sup>bc</sup>

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

Se observa una correlación negativa entre  $\Delta E$  y el contenido en ácido ascórbico ( $p= 0.0483$ ) y positiva entre  $\Delta E$  y el contenido total de carotenoides ( $p= 0.0001$ ).

Con el objeto de establecer la relación existente entre los distintos parámetros estudiados en la bebida no tratada, así como tratada por APH y por pasteurización térmica, se diseña un análisis de los componentes principales (PCA), los cuales explican el 80.7% de la

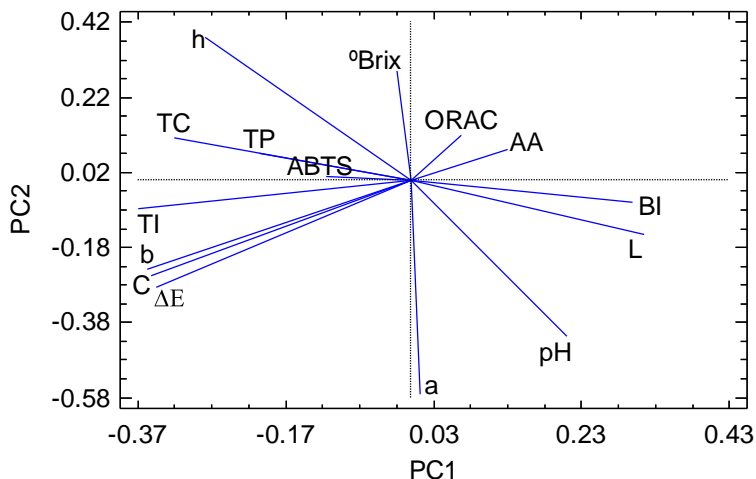
variabilidad en los datos originales. En el Cuadro n° 48 se muestran los cuatro componentes principales.

**Cuadro n° 48.** Coeficientes de las funciones discriminantes para los diferentes compuestos bioactivos y parámetros fisicoquímicos estudiados.

	1	2	3	4
AA	0.3019	-0.2306	-0.5221	0.7160
FST	-0.1008	0.8436	-0.7325	0.3309
CT	-0.2441	-0.9488	-0.8795	0.2517
TEAC	-0.3933	-1.0347	0.4434	0.0980
ORAC	0.7155	1.0202	-1.5872	0.9035
pH	-0.1435	0.5012	-0.2336	-0.2180
°Brix	-0.1281	-0.3935	0.5074	-0.2564
IT	1.3156	-1.3133	0.5118	0.5880
IP	0.1997	0.5557	-0.7562	-0.1412
a*	10.7378	14.1229	-1.2622	-0.7914
b*	25.3895	73.0132	9.2705	40.8983
L*	1.7748	-2.4850	1.2910	0.4420
Chroma	-31.5617	-84.9458	-7.1865	-43.1849
h <sup>0</sup>	5.43277	8.4365	-0.5913	-2.0325
ΔE	-2.5836	3.9140	-1.9460	1.8822

AA: ácido ascórbico. FST: fenoles solubles totales. CT: carotenoides totales. IT: índice de turbidez. IP: índice de pardeamiento.

En la Figura n° 28 se muestra la influencia de los dos primeros componentes obtenidos (PC1 y PC2).

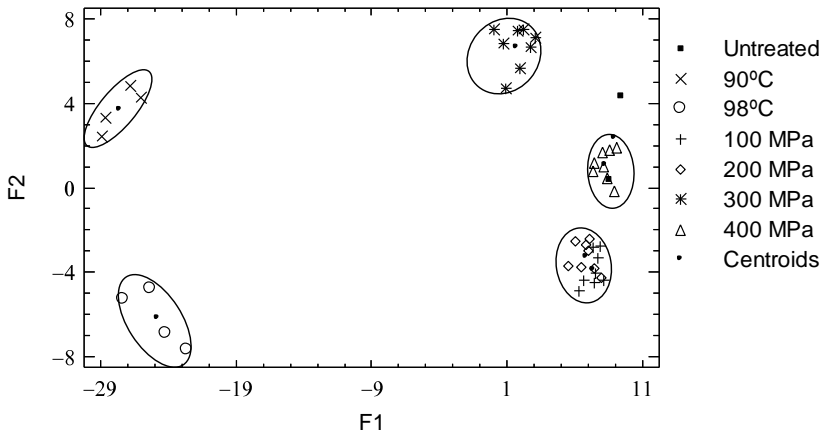


**Figura n° 28.** Principales componentes de una bebida de vegetales no tratada, procesada por APH y térmicamente (TC: carotenoides totales; TP: fenoles solubles totales; TI: índice de turbidez; C: Chroma; BI: índice de pardeamiento; AA: ácido ascórbico).

La primera función tiene un peso relativo de 82.9% y la segunda es responsable del 3%.

Como se puede observar en la Figura n° 29 es posible diferenciar la bebida de vegetales estudiada dependiendo del tratamiento aplicado, aunque las bebidas tratadas a 100 y 200 MPa no son fáciles de diferenciar.





**Figura n° 29.** Funciones discriminantes para los diferentes tratamientos aplicados en la bebida de vegetales.

### *Vitaminas liposolubles*

Para evaluar el efecto de la presión cuando se aplica un tratamiento por APH sobre la fracción grasa (vitaminas liposolubles, contenido grasa y perfil lipídico) de la bebida se realiza el estudio de diferentes presiones (100-400MPa) durante 300s.

El contenido de vitamina D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> en la bebida a base de vegetales no tratada es de 0.88±0.01 µg/100mL en ambos casos, no produciéndose cambios estadísticamente significativos por calor o por APH.

En el Cuadro n° 49 se muestra el contenido de tocoferoles y actividad vitamínica E, en la bebida tratada por calor y por APH.

## Parte experimental

**Cuadro n° 49.** Concentraciones de vitamina E ( $\mu\text{g}/100\text{mL}$ ) en bebida a base de vegetales sin tratar, tratado térmicamente y por APH.

	$\delta$ - T	$\gamma$ - T	$\alpha$ - T	Vit E
Sin tratar	18.44 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>	9.81 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	307.14 $\pm$ 4.43 <sup>a</sup>	308.67 $\pm$ 4.44 <sup>a</sup>
90°C/15s	16.81 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	9.74 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	239.33 $\pm$ 6.46 <sup>b</sup>	240.80 $\pm$ 6.45 <sup>b</sup>
100 MPa	23.65 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	10.57 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	246.92 $\pm$ 0.74 <sup>b</sup>	248.69 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>
200 MPa	26.37 $\pm$ 0.20 <sup>d</sup>	14.41 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	351.31 $\pm$ 3.75 <sup>c</sup>	353.54 $\pm$ 3.77 <sup>c</sup>
300 MPa	17.33 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	15.98 $\pm$ 0.07 <sup>d</sup>	368.35 $\pm$ 4.42 <sup>c</sup>	370.46 $\pm$ 4.43 <sup>c</sup>
400 MPa	17.28 $\pm$ 0.36 <sup>b</sup>	15.89 $\pm$ 0.21 <sup>d</sup>	368.46 $\pm$ 9.96 <sup>c</sup>	370.56 $\pm$ 9.99 <sup>c</sup>

<sup>a-d</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.  $\delta$  - T: Delta Tocoferol.  $\gamma$  - T: Gamma Tocoferol.  $\alpha$  - T: Alfa Tocoferol.

Tras aplicar el tratamiento térmico, se obtiene una disminución del 22% en la actividad vitamínica E.

Se observa una disminución del 19% en la actividad vitamínica E cuando se aplican presiones de 100 MPa, sin embargo se obtiene un aumento significativo que oscila entre 15% y 20% cuando se aplican presiones de 200, 300 y 400 MPa.

En los Cuadros n° 50-51 se muestran los resultados de contenido graso y perfil de ácidos grasos de la bebida a base de vegetales sin tratar y tratada térmicamente y por APH. El porcentaje de SFA, MUFA y PUFA en la bebida de vegetales es de 17.7, 64.5 y 15.8%, respectivamente. El tratamiento térmico no afecta al porcentaje de los ácidos grasos estudiados.

**Cuadro n° 50.** Contenido en grasa y perfil de ácidos grasos en la bebida de vegetales sin tratar y tratada térmicamente.

	Sin tratar	90°C/15s
Grasa	0.41±0.01 <sup>a</sup>	0.40±0.01 <sup>a</sup>
C12:0	ND	ND
C14:0	ND	ND
C16:0	14.79±0.17 <sup>a</sup>	14.75±0.17 <sup>a</sup>
C18:0	2.93±0.11 <sup>a</sup>	2.99±0.04 <sup>a</sup>
C16:1	1.44±0.05 <sup>a</sup>	1.27±0.05 <sup>b</sup>
C18:1	63.11±0.70 <sup>a</sup>	62.85±0.14 <sup>a</sup>
C18:2	14.13±0.31 <sup>a</sup>	13.98±0.11 <sup>a</sup>
C18:3	1.71±0.03 <sup>a</sup>	1.68±0.04 <sup>a</sup>
SFA	17.72±0.06 <sup>a</sup>	17.74±0.21 <sup>a</sup>
MUFA	64.54±0.65 <sup>a</sup>	64.12±0.09 <sup>a</sup>
PUFA	15.84±0.28 <sup>a</sup>	15.65±0.07 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> distinto superíndice en una misma fila indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.

**Cuadro n° 51.** Contenido en grasa y perfil de ácidos grasos en la bebida de vegetales sin tratar y tratada por APH.

	Sin tratar	100 MPa	200 MPa	300 MPa	400 MPa
Grasa	0.41±0.01 <sup>a</sup>	0.40±0.01 <sup>a</sup>	0.40±0.01 <sup>a</sup>	0.40±0.01 <sup>a</sup>	0.40±0.01 <sup>a</sup>
C12:0	ND	ND	ND	ND	ND
C14:0	ND	ND	ND	ND	ND
C16:0	14.79±0.17 <sup>a</sup>	14.70±0.33 <sup>a</sup>	14.63±0.10 <sup>a</sup>	14.49±0.02 <sup>a</sup>	14.25±0.28 <sup>a</sup>
C18:0	2.93±0.11 <sup>ab</sup>	2.90±0.08 <sup>ab</sup>	2.89±0.06 <sup>ab</sup>	2.66±0.07 <sup>b</sup>	2.94±0.04 <sup>ab</sup>
C16:1	1.44±0.05 <sup>a</sup>	1.26±0.01 <sup>b</sup>	1.31±0.01 <sup>b</sup>	1.29±0.02 <sup>b</sup>	1.30±0.06 <sup>b</sup>
C18:1	63.11±0.70 <sup>ab</sup>	64.19±0.13 <sup>c</sup>	64.29±0.13 <sup>bc</sup>	64.22±0.09 <sup>c</sup>	64.38±0.35 <sup>c</sup>
C18:2	14.13±0.31 <sup>ab</sup>	14.25±0.14 <sup>b</sup>	14.44±0.21 <sup>b</sup>	14.05±0.21 <sup>ab</sup>	13.88±0.10 <sup>a</sup>
C18:3	1.71±0.03 <sup>a</sup>	1.71±0.01 <sup>a</sup>	1.73±0.01 <sup>a</sup>	1.70±0.04 <sup>a</sup>	1.71±0.04 <sup>a</sup>
SFA	17.72±0.06 <sup>a</sup>	17.60±0.41 <sup>a</sup>	17.52±0.04 <sup>a</sup>	17.15±0.05 <sup>a</sup>	17.18±0.31 <sup>a</sup>
MUFA	64.54±0.65 <sup>a</sup>	65.45±0.13 <sup>a</sup>	65.59±0.13 <sup>a</sup>	65.50±0.11 <sup>a</sup>	65.68±0.29 <sup>a</sup>
PUFA	15.84±0.28 <sup>ab</sup>	15.96±0.13 <sup>a</sup>	16.17±0.23 <sup>bc</sup>	15.75±0.16 <sup>bc</sup>	15.59±0.06 <sup>bc</sup>

<sup>a-c</sup> distinto superíndice en una misma fila indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. ND: no detectable.

Tras aplicar un análisis de la varianza, no se observan cambios estadísticamente significativos con los diferentes tratamientos por APH cuando agrupamos los ácidos grasos en SFA, MUFA y PUFA. Sin embargo, sí que se obtiene un aumento en el porcentaje de MUFA con 400 MPa del 5% destacando el aumento en el porcentaje de ácido oleico

## Parte experimental

---

que se obtiene tras los diferentes tratamientos por APH. Cuando comparamos el contenido de  $C_{16:1}$  si que vemos una disminución en el mismo para todos los tratamientos por APH.

#### **4.5. EFECTO DE LAS APH EN EL ZUMO DE NARANJA CON LECHE Y EN LA BEBIDA A BASE DE VEGETALES.**

Un estudio del Institute of Food Tecnology (IFT, 2000) pone de manifiesto las necesidades de investigación sobre las tecnologías emergentes de conservación, entre las que se resalta cómo pueden afectar a la inactivación bacteriana, a la calidad, al valor nutritivo y a la vida útil de los alimentos, los cambios en los factores críticos de los procesos o la introducción de nuevos factores.

A continuación se evalúa el efecto de las APH sobre los diferentes parámetros estudiados con el objeto de analizar la posible influencia de la matriz (alimento) y sus características. Para ello se realiza un análisis de la varianza de tres factores controlados (tipo de muestra, presión y tiempo de tratamiento) y se comprueba la existencia o no de interacciones en el efecto de las APH sobre cada parámetro estudiado (pH, °Brix, índice de pardeamiento, índice de turbidez, parámetros de color ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ , Chroma,  $\Delta E$ ), ácido ascórbico, fenoles solubles totales, carotenoides totales y capacidad antioxidante total).

Existe un interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tres factores en el valor del pH, °Brix, índice de pardeamiento, capacidad antioxidante y parámetros de color ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$ , Chroma,  $\Delta E$ ). Sin embargo, esto no ocurre para el contenido de ácido ascórbico, fenoles solubles totales, carotenoides totales e índice de turbidez. Hay que destacar que en todos los casos los cambios encontrados para cada presión aplicada con el tiempo de tratamiento siempre dependen de la matriz alimentaria estudiada, tanto los parámetros fisicoquímicos como nutricionales y compuestos bioactivos (Anexo II).

Los cambios de pH y °Brix no son significativos mientras que para el índice de pardeamiento éstos son significativos tras aplicar los distintos tratamientos en cada una de las muestras (como ya se ha comentado en

los apartados 4.3.2 y 4.4.3) aunque estas modificaciones no son de importancia desde el punto de vista de calidad.

La tendencia de la capacidad antioxidante tras los distintos tratamientos aplicados (intensidad y tiempo) difiere según la muestra estudiada. Los cambios se ven claramente en las Figuras n° 30 (método TEAC) y n° 31 (método ORAC) pudiéndose detectar como el valor de capacidad antioxidante depende del método utilizado para su medida, y el hecho más importante es comprobar los posibles cambios que se detectan con uno y otro método pudiéndonos llevar a conclusiones erróneas cuando evaluamos el efecto del tratamiento de conservación como es el objeto de este estudio. Esto puede deberse a la diferente naturaleza de los compuestos antioxidantes que se determinan y que se encuentran en los vegetales.

También es importante tener en cuenta las variaciones en el contenido de ácido ascórbico que, aunque no presenten interacciones significativas los tres factores, hay que destacar que la degradación del mismo depende de su concentración inicial, siendo mayor la degradación cuanto mayor es la concentración inicial en la matriz (alimento) (Figura n° 32).

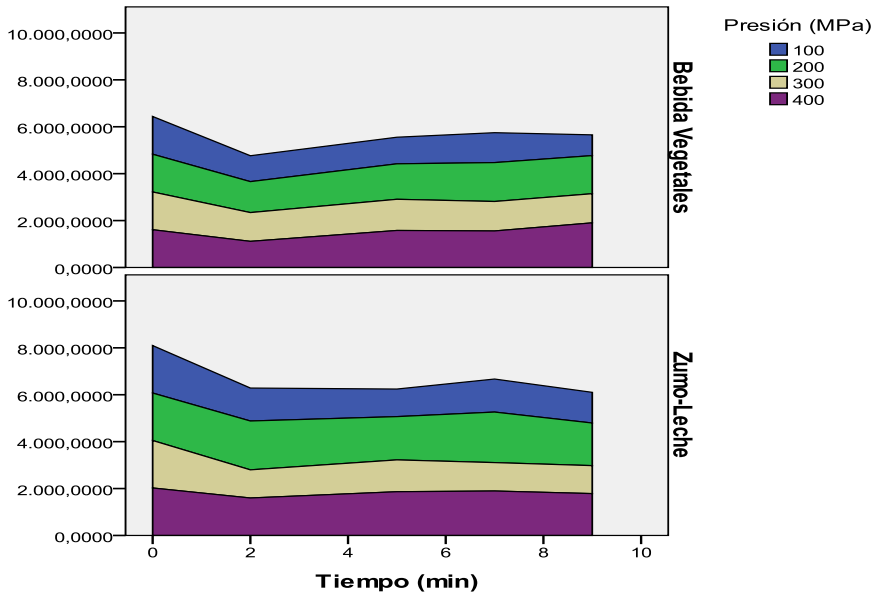


Figura n° 30. Capacidad antioxidante (TEAC): interacciones

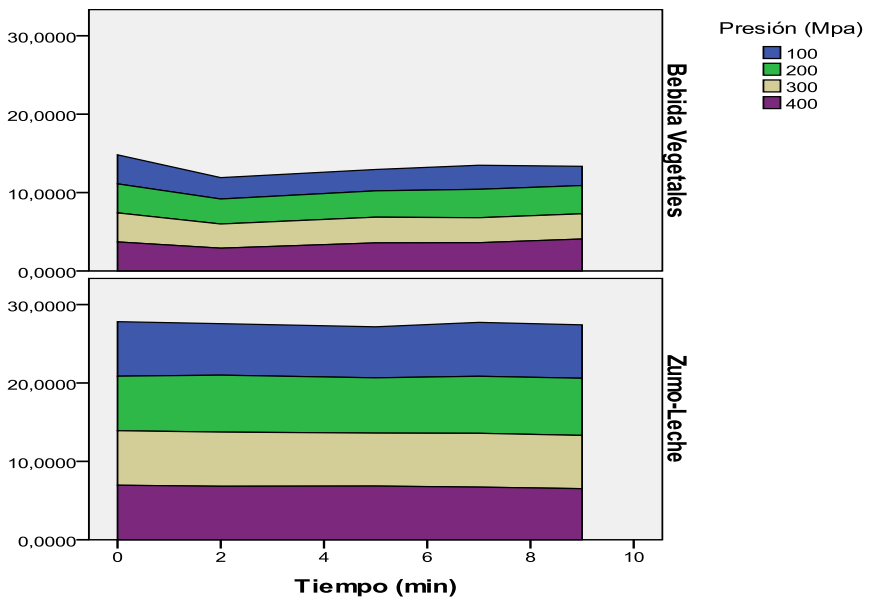


Figura n° 31. Capacidad antioxidante (ORAC): interacciones

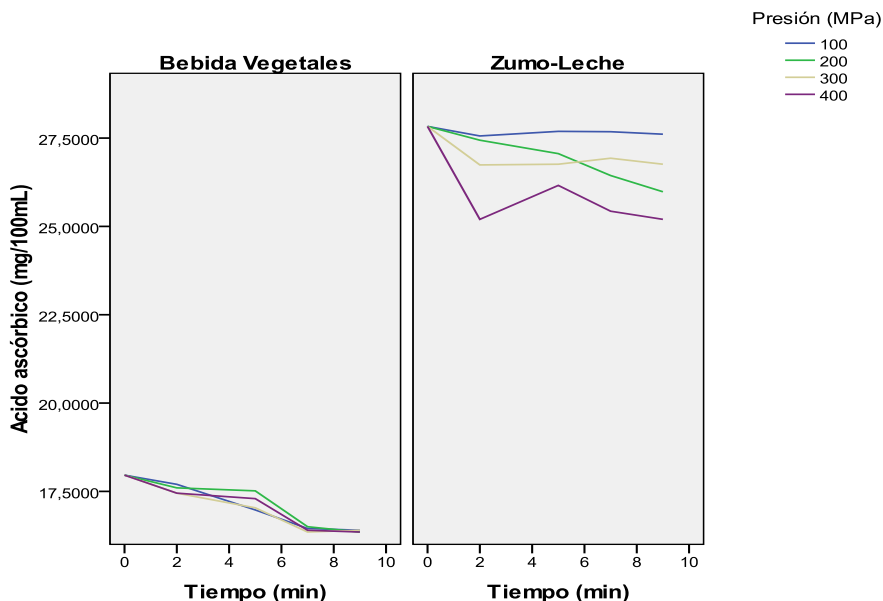


Figura n° 32. Degradación de ácido ascórbico en las bebidas.

En cuanto a los parámetros de color las variaciones encontradas son importantes en  $a^*$  pero sobretodo en  $\Delta E$  tal como puede observarse en las Figuras n° 33 y 34, respectivamente. El  $\Delta E$  a los dos minutos de tratamiento (independientemente de la presión aplicada) aumenta en las dos muestras estudiadas, pero sin embargo puede observarse como en la mezcla de zumo de naranja con leche sigue incrementándose con el tiempo de tratamiento, en mayor o menor grado según la presión aplicada, mientras que en la bebida de vegetales disminuye.

Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de optimizar las condiciones del tratamiento cada vez que se cambia la matriz (alimento) o algún factor del procesado para valorar el impacto del mismo sobre su valor nutricional y especialmente en los parámetros de calidad.



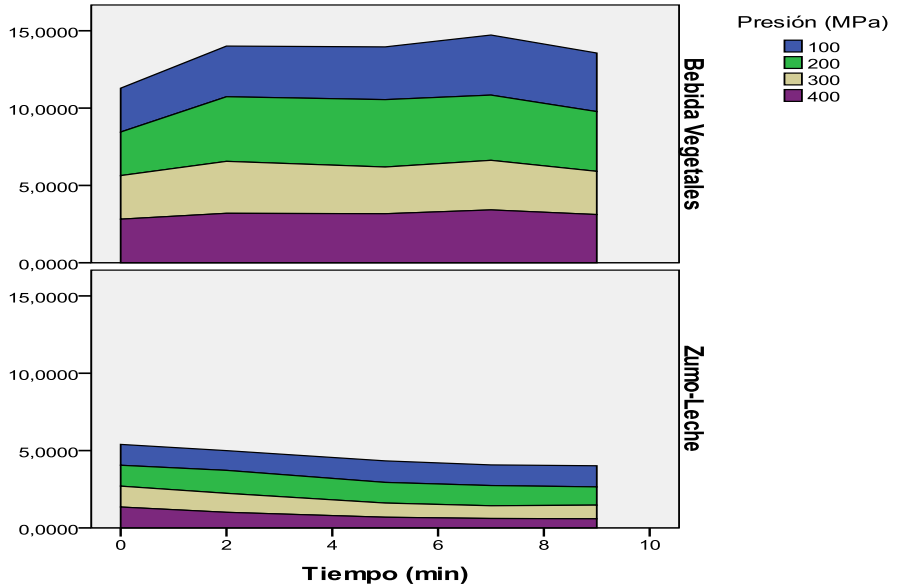


Figura n° 33. Parámetro de color a\*: interacciones

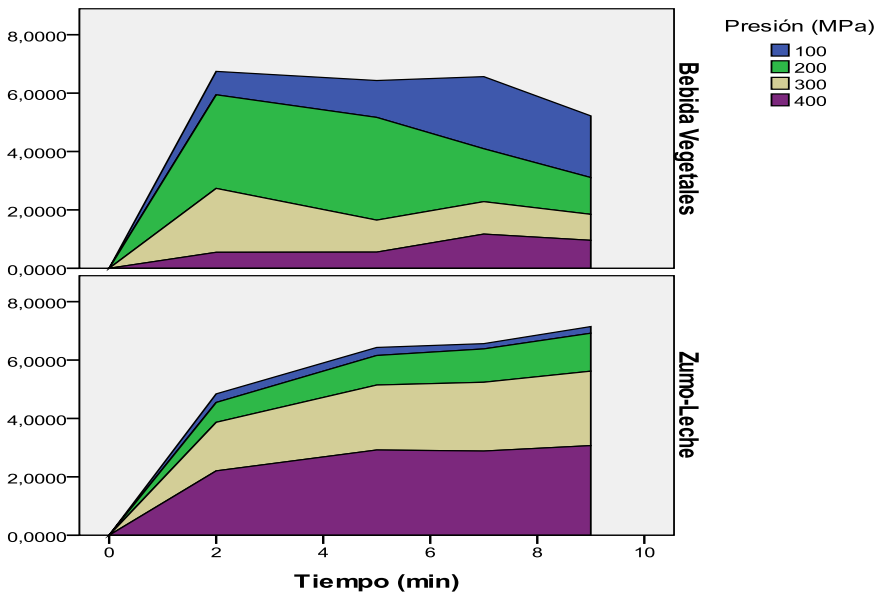


Figura n° 34.  $\Delta E$ : interacciones

## 4.6. ARÁNDANOS

### 4.6.1. Zumo de arándanos

*Efecto de las APH sobre los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del zumo de arándanos.*

Los arándanos presentan en su composición un elevado contenido en compuestos bioactivos como son los compuestos fenólicos, entre los que destacan antocianinas, flavonoles, ácido clorogénico y procianidinas, todos ellos con un alta actividad a nivel biológico y que pueden aportar efectos beneficiosos por la capacidad antioxidante que presentan (Cho et al., 2005).

Para la determinación del efecto del tratamiento por APH sobre las concentraciones de compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante del zumo de arándanos preparado según se ha descrito en el apartado 4.1.3, se aplican presiones de 200, 400 y 600 MPa durante 5, 9 y 15 min. El equipo y modo operatorio se describen en el apartado 4.3.2.2. Para evaluar el efecto de las APH, paralelamente se envasa muestra sin tratar para poder comparar los resultados obtenidos.

Las muestras control presentan un valor de pH de 2.95 y de 7.40 para los °Brix, no observándose variaciones estadísticamente significativas tras la aplicación de los distintos tratamientos por APH.

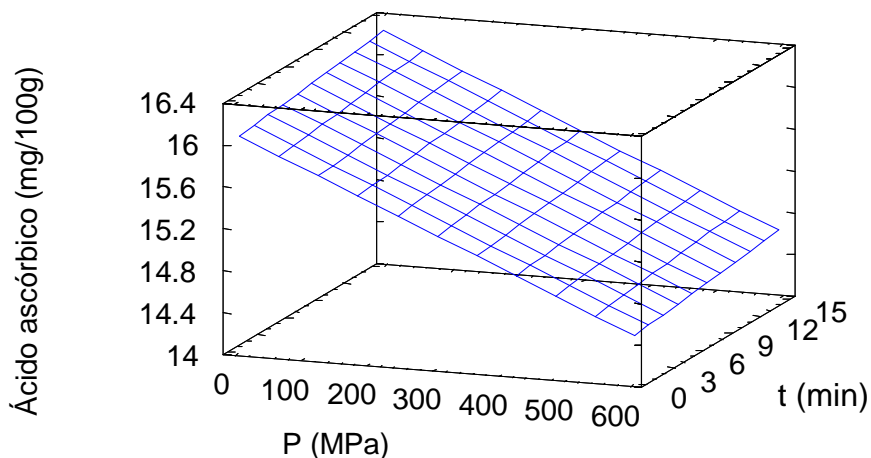
Las concentraciones de ácido ascórbico (mg/100 g) en el zumo de arándanos sin tratar como en el tratado por APH se muestran en el Cuadro n° 52. Todas las muestras tratadas a 200 MPa preservan su contenido en ácido ascórbico, sin embargo en la bebida tratada a 400 MPa y 600 MPa disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ), aunque la retención de ácido ascórbico es superior al 92% en todos los casos estudiados.

**Cuadro n° 52.** Concentraciones de diversos compuestos antioxidantes en zumo de arándanos tratado por APH.

Tratamiento	Tiempo (min)	AA (mg/100g)	FST (mg GAE/g)	AT (mg/g)	TEAC (μmol/g)
Sin tratar	0	15.9±0.1 <sup>a</sup>	2.45±0.13 <sup>a</sup>	2.25±0.03 <sup>a</sup>	32.2±1.4 <sup>ab</sup>
APH	5	15.8±0.2 <sup>a</sup>	3.13±0.05 <sup>b</sup>	2.34±0.23 <sup>a</sup>	32.6±0.2 <sup>a</sup>
200 MPa	9	15.9±0.1 <sup>a</sup>	2.89±0.05 <sup>bcd</sup>	2.34±0.04 <sup>a</sup>	31.9±1.7 <sup>ab</sup>
	15	15.9±0.1 <sup>a</sup>	2.79±0.18 <sup>cde</sup>	2.40±0.18 <sup>ab</sup>	28.4±2.9 <sup>abcd</sup>
APH	5	15.0±0.1 <sup>bc</sup>	2.64±0.05 <sup>ade</sup>	2.30±0.06 <sup>a</sup>	31.6±0.1 <sup>ab</sup>
400MPa	9	15.1±0.4 <sup>b</sup>	2.45±0.08 <sup>a</sup>	2.29±0.04 <sup>a</sup>	32.3±1.3 <sup>a</sup>
	15	14.7±0.1 <sup>bc</sup>	3.03±0.05 <sup>bc</sup>	2.60±0.14 <sup>b</sup>	29.6±3.9 <sup>abcd</sup>
APH	5	14.6±0.2 <sup>c</sup>	2.53±0.12 <sup>ae</sup>	2.45±0.06 <sup>ab</sup>	26.3±0.4 <sup>d</sup>
600MPa	9	14.7±0.2 <sup>bc</sup>	2.57±0.01 <sup>ae</sup>	2.24±0.12 <sup>a</sup>	30.2±0.4 <sup>abc</sup>
	15	14.8±0.1 <sup>bc</sup>	2.59±0.11 <sup>ae</sup>	2.28±0.05 <sup>a</sup>	26.9±0.3 <sup>cd</sup>

<sup>a-e</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado. AA: ácido ascórbico. FST: fenoles solubles totales. AT: antocianinas totales.

En el ANOVA de dos factores (presión y tiempo) realizado (Anexo II), se observa que la presión tiene una significancia estadística ( $p < 0.05$ ) sobre la retención de ácido ascórbico. Con el objeto de poder explicar la evolución del ácido ascórbico cuando se aplica el tratamiento de APH se representa la concentración de ácido ascórbico frente a la presión y el tiempo de tratamiento y se realiza un análisis de regresión múltiple. La ecuación que explicaría el efecto de la presión y el tiempo sobre la concentración de ácido ascórbico es  $y = 16.07 - 0.003 \cdot P + 0.013 \cdot t$ , donde  $y$  es la concentración de ácido ascórbico (mg/100g);  $P$  es la presión expresada en MPa y  $t$  es el tiempo (min) ( $p < 0.05$ ,  $R^2 = 80.4$ , error estándar = 0.27). Véase Figura n° 35.



**Figura n° 35.** Variación de ácido ascórbico en zumo de arándanos en función de la presión y el tiempo de tratamiento aplicados.

Los contenidos de compuestos fenólicos totales hallados tras el tratamiento por APH se muestran en el Cuadro n° 52. Como puede observarse, aumentan con el tratamiento por APH aunque sólo se encuentran diferencias estadísticamente significativas cuando se aplican 200 MPa para todos los tiempos estudiados y 400 MPa durante 15 min, con un incremento de 13-28% respecto al valor inicial. El contenido total de antocianinas también es mayor tras aplicar el tratamiento por APH aunque tan sólo se encuentra un incremento (16%) estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) cuando se aplica un tratamiento a 400 MPa durante 15 min.

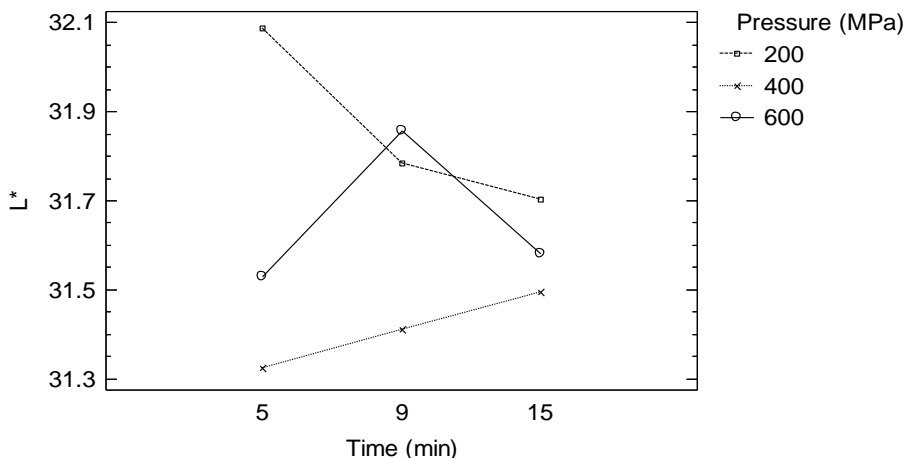
La capacidad antioxidante (TEAC) del zumo de arándanos es de  $32.2 \pm 1.4$   $\mu\text{mol/g}$ . Tras los tratamientos por APH no se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los valores de capacidad antioxidante total con respecto al zumo fresco (véase Cuadro n° 52) excepto cuando se aplican presiones de 600 MPa durante 5 y 15 min, que la capacidad antioxidante disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ).

En el Cuadro n° 53 se muestran los valores de los parámetros de color ( $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$  e  $\Delta E$ ) tras aplicar los diferentes tratamientos por APH y en la muestra no tratada. No se observaron cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en los valores de  $a^*$  ( $0.36 \pm 0.04$ ) tras los distintos tratamientos por APH, excepto para 600MPa y 15 minutos.

**Cuadro n° 53.** Valores de  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L^*$  e  $\Delta E$  en zumo de arándanos tratado por APH.

Tratamiento	Tiempo (min)	$a^*$	$b^*$	$L^*$	$\Delta E$
Sin tratar	0	$0.36 \pm 0.04^{ab}$	$-6.80 \pm 0.03^a$	$32.66 \pm 0.23^a$	$0^a$
APH	5	$0.33 \pm 0.13^a$	$-8.12 \pm 0.05^b$	$32.09 \pm 0.20^b$	$1.44 \pm 0.13^b$
200MPa	9	$0.38 \pm 0.01^{ab}$	$-7.93 \pm 0.16^c$	$31.78 \pm 0.03^{cd}$	$1.43 \pm 0.12^b$
	15	$0.28 \pm 0.06^a$	$-7.57 \pm 0.02^d$	$31.70 \pm 0.05^{cde}$	$1.23 \pm 0.04^{cde}$
APH	5	$0.33 \pm 0.03^a$	$-6.54 \pm 0.11^d$	$31.32 \pm 0.10^f$	$1.37 \pm 0.08^{bc}$
400MPa	9	$0.37 \pm 0.03^{ab}$	$-6.66 \pm 0.00^d$	$31.41 \pm 0.20^{ef}$	$1.26 \pm 0.20^{bcde}$
	15	$0.31 \pm 0.07^a$	$-7.39 \pm 0.02^e$	$31.49 \pm 0.24^{def}$	$1.33 \pm 0.22^{bcd}$
APH	5	$0.36 \pm 0.01^{ab}$	$-6.92 \pm 0.08^a$	$31.53 \pm 0.04^{cdef}$	$1.14 \pm 0.04^{de}$
600MPa	9	$0.34 \pm 0.09^a$	$-6.63 \pm 0.05^d$	$31.86 \pm 0.09^{bc}$	$0.83 \pm 0.09^f$
	15	$0.46 \pm 0.10^b$	$-6.59 \pm 0.05^d$	$31.58 \pm 0.07^{cde}$	$1.11 \pm 0.07^e$

<sup>a-f</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado.



**Figura n° 36.** Influencia de la presión y el tiempo de tratamiento sobre el parámetro L\* en zumo de arándanos.

La luminosidad de la bebida disminuye en todos los casos tras aplicar el tratamiento por APH (Cuadro n° 53) y significativamente pero esta disminución es muy pequeña. El análisis de la varianza multifactorial realizado (Anexo II) muestra la existencia de interacción ( $p < 0.01$ ) entre la presión y el tiempo de tratamiento, cuando se aplican presiones de 200 MPa (Figura n° 36).

Tras los diferentes tratamientos por APH aplicados, no se observan cambios apreciables en el color de las bebidas ( $\Delta E < 1.5$ ) si se tiene en cuenta la clasificación de Cserhalmi et al. (2006) presentando una coloración semejante a la de la bebida fresca.

Se diseña un análisis discriminante, estableciendo como una variable en la clasificación el tratamiento aplicado: no tratado y tratamiento por APH (200, 400 y 600 MPa).

Mediante un análisis discriminante se estudia qué parámetros definen significativamente la presión aplicada en cada caso: no tratado (presión=0), 200, 400 y 600 MPa. Este proceso está diseñado para desarrollar unas funciones discriminantes, las cuales permitan predecir

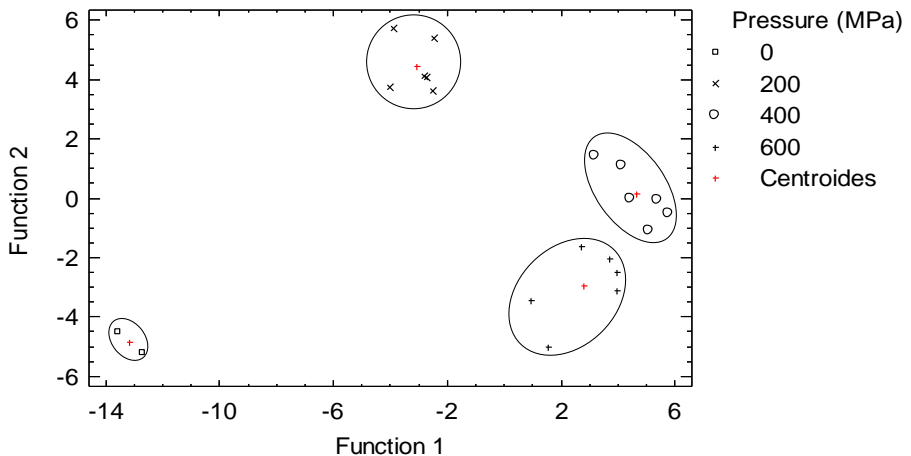
el tipo de tratamiento basándose en el valor de variables cuantitativas, en este caso los diferentes parámetros estudiados.

Los coeficientes de las funciones (estadísticamente significativas) que se utilizan para discriminar el tratamiento aplicado se muestran en el Cuadro n° 54.

**Cuadro n° 54.** Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

	<b>Función 1</b>	<b>Función 2</b>	<b>Función 3</b>
<b>Ácido ascórbico (mg/100mL)</b>	-0.758	0.704	-0.462
<b>Chroma</b>	-1.051	0.405	0.787
<b><math>\Delta E</math></b>	1.063	0.621	-0.182

Para desarrollar el modelo discriminante de 4 niveles de tratamiento, se obtiene que 3 variables son significativamente predictoras del tipo de tratamiento. En la Figura n° 37 se puede observar cómo estas funciones permiten diferenciar el tipo de tratamiento aplicado a la muestra.



**Figura n° 37.** Funciones discriminantes para los diferentes tratamientos aplicados en un zumo de arándanos.

#### *4.6.2. Extracción de compuestos bioactivos en arándanos por diferentes tecnologías.*

Durante el procesado o almacenamiento de los productos alimentarios es importante tener en cuenta el grado de desintegración del tejido celular a causa de su impacto en la calidad del alimento, funcionalidad, deterioro y seguridad. Debido a la heterogeneidad de las células presentes en los tejidos alimentarios, el análisis de las propiedades electrofísicas puede aportar una visión detallada de la naturaleza celular de las muestras que se utilizan (Knorr, 1994; Angersbach, 1999).

En general, los compartimentos celulares se separan del medio externo por una membrana, constituida mayoritariamente por fosfolípidos con estructuras muy complejas. Cuanto más conductivo es el medio en ambos lados de la membrana celular, el tejido celular muestra una mayor conductividad, que a su vez es dependiente de la frecuencia de voltaje aplicado. Para cuantificar el daño celular en una muestra tras el procesado, se ha demostrado efectivo el índice de desintegración celular (CDI) (Angersbach et al., 1999). Este índice permite evaluar el daño en la membrana celular y en base a las propiedades electrofísicas del contenido celular antes y después del tratamiento.

En este estudio se seleccionan los arándanos por su alto contenido en compuestos bioactivos, especialmente antocianinas. La extracción de las antocianinas de los arándanos así como de otros compuestos antioxidantes se describe como un fenómeno de transporte de masa en el cual los compuestos sólidos presentes en las estructuras de la fruta pasan al disolvente utilizado. El fenómeno de transporte de masa se ve aumentado al aplicar calor, al cambiar los gradientes de concentración del disolvente utilizado y también debido a la influencia de tecnologías



no térmicas como las APH, PEAI y/o ultrasonidos. Pinelo et al. (2003) y más recientemente Spigno et al. (2006) reflejan en diferentes artículos las ventajas de la utilización de una mezcla de etanol/agua en la recuperación de antocianinas de la piel de uva. Se puede estimar la efectividad del tratamiento utilizado para la extracción mediante la determinación del contenido en metabolitos secundarios (como los compuestos fenólicos totales) así como por la capacidad antioxidante total en los extractos.

Se han empleado diferentes tecnologías no térmicas como APH, PEAI y ultrasonidos con el objeto de aumentar la extracción de metabolitos secundarios (Ju y Howard, 2003, 2005; Kammerer et al., 2005; Revilla et al., 1998; Zhi y Howard, 2005, Corrales et al., 2008).

Estas tecnologías pueden utilizarse para mejorar diferentes procesos industriales como el prensado, deshidratación, difusión, extracción y conservación (Barsotti y Cheftel 1998; Fincan et al., 2004; Vorobiev et al., 2005; Toepfl et al., 2007).

Durante la extracción por APH, los vacíos de aire que presentan los tejidos celulares se llenan parcialmente con líquido. Cuando se libera la presión el aire ocluido en los poros sale causando el daño de la membrana celular (Fernández García et al., 2001).

Las APH pueden causar la deprotonación de los grupos cargados así como la disrupción o ruptura de los puentes salinos y los enlaces hidrofóbicos, lo que lleva a cambios conformacionales y a la desnaturalización de las proteínas, haciendo que las membranas celulares sean menos selectivas y de esta manera facilitan que los compuestos sean más accesibles para la extracción (Barbosa-Cánovas et al., 1998). Así pues existen estudios que demuestran una mayor tasa de extracción de cafeína a partir de café, un mayor contenido de carotenoides en puré de tomate, así como una mayor extracción de flavanoles de propolis cuando se aplican las extracciones con APH. (Knorr, 1999; Sánchez-Moreno et al., 2004; Shouqin et al., 2005).

También existen estudios sobre los efectos de la aplicación de los PEAI en la desintegración de tejidos celulares blandos (Mañas y Vercet 2006; Mastwijk 2006; Toepfl et al. 2006; Toepfl, 2006; Vorobiev y Lebovka 2006). Así pues, los PEAI, pueden ser utilizados para la inactivación de microorganismos en alimentos cuando se emplean campos eléctricos de elevada intensidad (Góngora-Nieto et al, 2003; Toepfl et al, 2007) mientras que campos eléctricos de baja intensidad pueden utilizarse para mejorar la tasa de extracción (Fincan et al, 2004; Chalermchat y Dejmek, 2005) o aumentar la tasa de deshidratación (Ade-Omowaye et al, 2003; Lebovka et al, 2007). Existen algunos estudios que evalúan el posible aumento de la extracción de zumo mediante la permeabilización de las membranas celulares de las frutas utilizando campos eléctricos altos (Bazhal y Vorobiev, 2000; Flaumenbaum, 1968). Geulen et al. (1994) demuestran como la utilización de los PEAI como pretratamiento de la pulpa aumenta la tasa de extracción de zumo del 62 al 75% en zanahoria. Asimismo, otros autores obtienen que también aumenta el porcentaje de extracción de zumo en uva, manzana y grosella (Esthiaghi y Knorr, 2000) y es posible aumentar la extracción de azúcar en remolacha (Esthiaghi y Knorr, 1999).

El tratamiento por ultrasonidos aumenta la tasa de transferencia de masa por fuerzas de cavitación, en las cuales, las burbujas en el líquido/sólido pueden colapsar y generar presiones localizadas que llevan a la ruptura del tejido del alimento y a una mejora en la liberación de las sustancias intracelulares hacia el disolvente (Knorr et al., 2002). En estos momentos el tratamiento por ultrasonidos es el más utilizado a nivel industrial para aumentar el fenómeno de transferencia de masa y se ha demostrado en muchos estudios su eficacia para aumentar la extracción de metabolitos secundarios de té, menta, camomila, ginseng, etc... (Li et al., 1995; Mason y Zhao, 1994), fresas (Herrera y Luque de

Castro, 2005), coco (Rodrigues y Pinto, 2007), zumos de frutas mezclados con bebidas de soja (Rostagno et al., 2007), frambuesas (Chen et al., 2007), olivas (Jerman et al., 2010), manzana (Virost et al., 2010) y naranjas (Khan et al., 2010) entre otros.

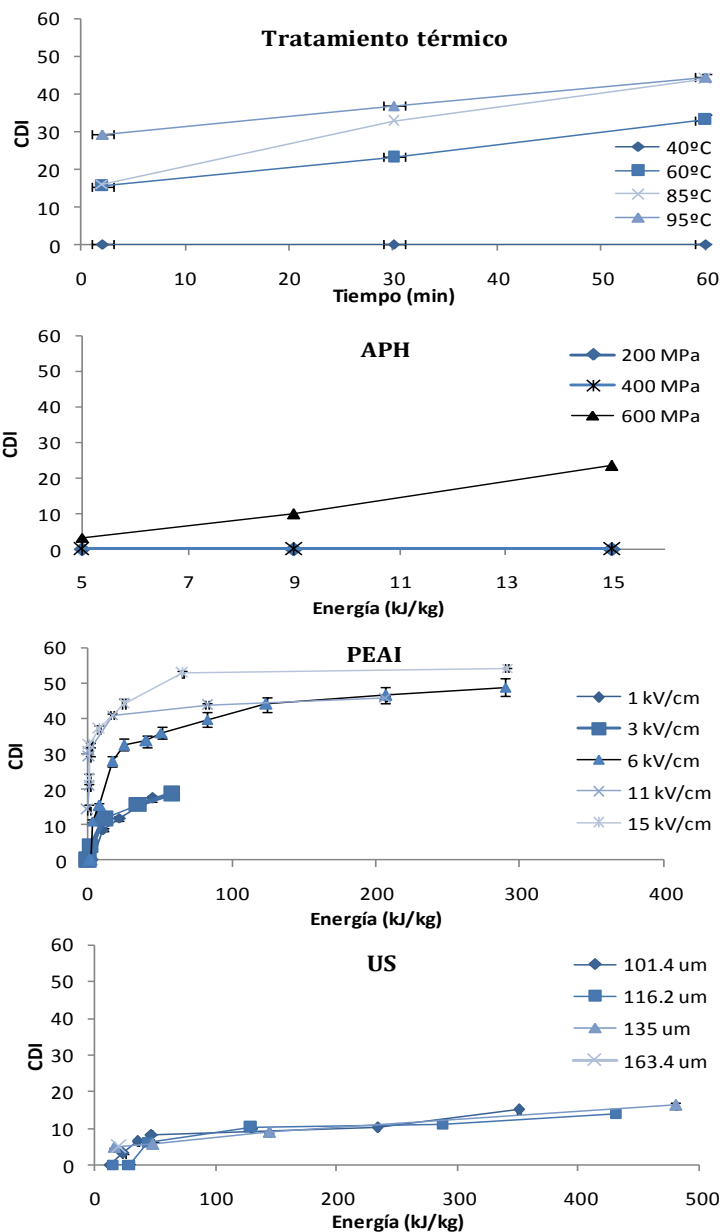
### *5.2.1. Elección del tratamiento*

En este estudio lo que se pretende es optimizar las condiciones de extracción de compuestos con actividad antioxidante al emplear diferentes tecnologías, para ello se utiliza el índice de desintegración celular.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos si observamos la Figura n° 38 se seleccionan tres niveles diferentes de CDI (bajo, medio y alto) para cada tecnología. De esta manera se establecen las condiciones de cada uno de los tratamientos (térmico, APH, PEAI, y US) y se evalúa el contenido de compuestos fenólicos totales, antocianinas totales así como capacidad antioxidante de las muestras sometidas a estas condiciones y tratamiento

En esta figura vemos que los valores más altos de CDI se obtienen tras la aplicación de los tratamientos térmico y de PEAI

## Parte experimental



**Figura n° 38.** Valores de CDI tras aplicar los distintos tratamiento estudiados (calor, APH, PEAI y US).

Las condiciones del tratamiento térmico seleccionadas son 85°C durante 2, 30 y 60 min, que corresponden a un CDI de 16, 32 y 44, respectivamente.

En el tratamiento por APH se elige la presión de 600 MPa durante 5, 9 y 15 min, en estas condiciones se alcanza un CDI de 5, 8 y 15, respectivamente.

En el caso del tratamiento por PEAI se selecciona un campo eléctrico de 6 kV/cm con 3 niveles de energía (10, 20 y 30 kJ/kg) y se alcanza un CDI de 20, 30 y 40, respectivamente.

Cuando se utiliza el tratamiento por ultrasonidos se selecciona el nivel de amplitud más bajo (101.4  $\mu\text{m}$ ) con niveles de energía de 23, 47 y 350 kJ/kg y valores de CDI de 3, 8 y 15.

Tras cada uno de los pretratamientos aplicados con las diferentes tecnologías se procede a la extracción de los compuestos bioactivos mediante mezclas de etanol/agua que son las más utilizadas en la industria. A partir de estos disolventes se formulan dos mezclas cuyas proporciones son:

(A) Etanol: agua (20:80, v/v).

(B) Etanol: agua (80:20, v/v).

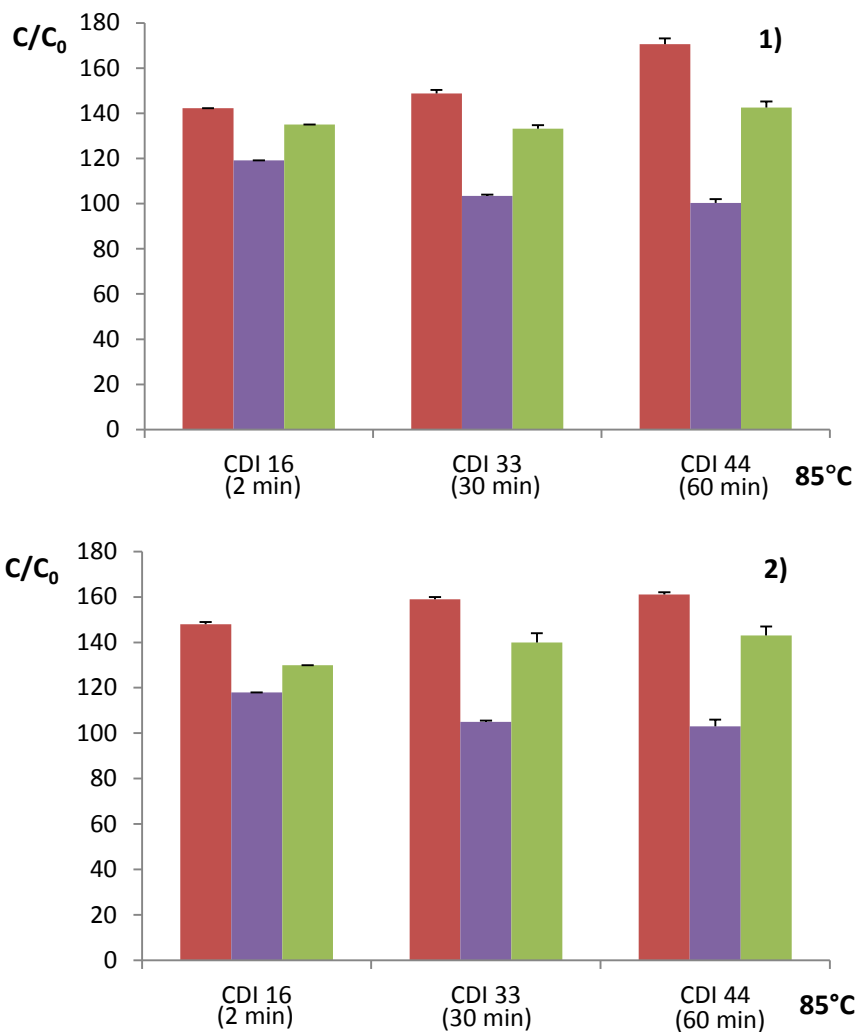
Se mezcla la pulpa de arándanos con el líquido extractante (1:5, p/v) y se mantiene en agitación durante 2 horas y posteriormente se centrifuga a 3800 rpm durante 10 min a 20°C. Se recoge el sobrenadante y se procede a su análisis.

### *5.2.2. Efecto de los diferentes tratamientos sobre la extracción de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante total*

En la Figura n° 39 se puede observar como al aplicar los diferentes tratamientos por calor aumenta significativamente el contenido de compuestos fenólicos así como la capacidad antioxidante total de los arándanos, sin embargo puede observarse como en el tratamiento más

## Parte experimental

suave aumenta la concentración de antocianinas totales, sin embargo al aumentar la intensidad del tratamiento los cambios no son significativos y se ve que van disminuyendo las antocianinas totales.

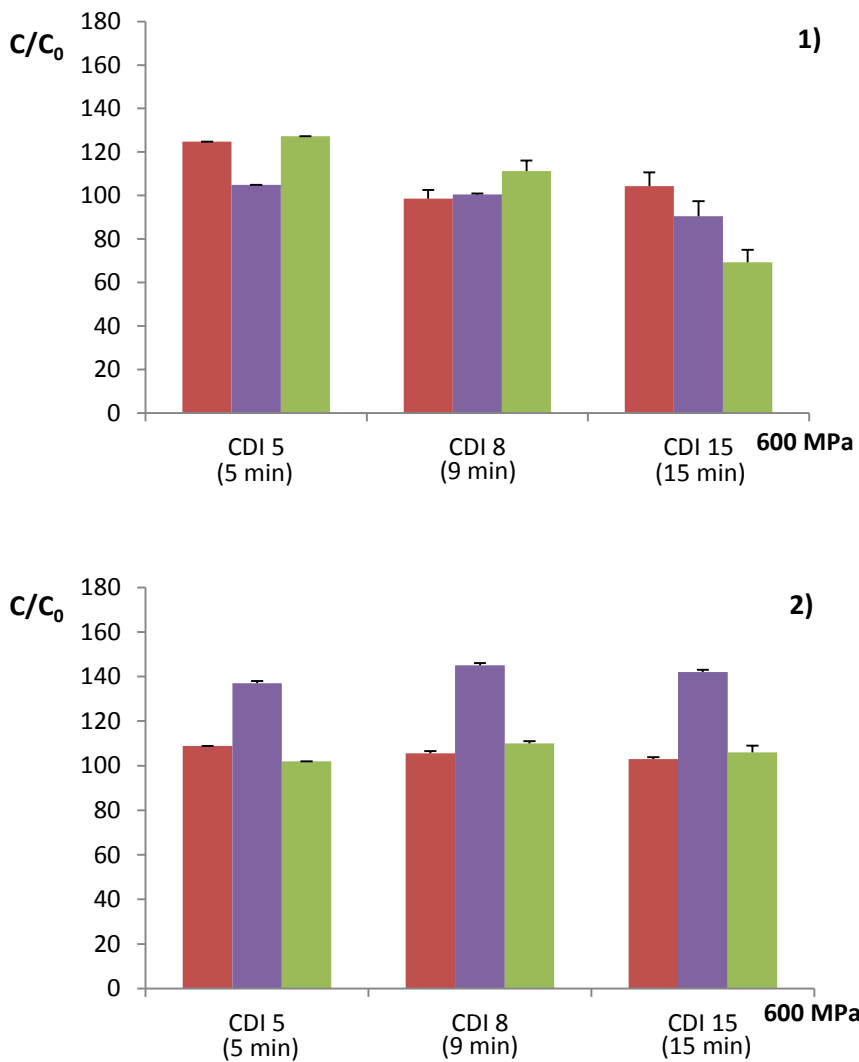


**Figura n° 39.** Extracción de compuestos antioxidantes tras aplicar tratamiento térmico: con 1) mezcla A, 2) mezcla B. (■ FST, ■ Antocianinas totales, ■ TEAC,)

En la Figura n° 40 se observa como tras aplicar los tratamientos por APH seleccionados en base al CDI y comentados anteriormente se observa como los valores más altos de compuestos fenólicos se obtienen cuando se aplica el tratamiento a 600 MPa/5min (CDI 5) cuando se utiliza la mezcla A. Cuando se utiliza la mezcla B con un mayor porcentaje en etanol, se obtienen valores más altos para las antocianinas totales en todos los tiempos no influyendo este último parámetro. Se alcanzan los valores más altos, con un aumento de hasta el 40% para el CDI 5, 8 y 15. Para la capacidad antioxidante total sería de elección el tratamiento por 600 MPa, 5 y 9 minutos con la mezcla A.

Las APH pueden aumentar la liberación y posterior extracción de los compuestos fenólicos debido a la capacidad que tienen para desprotonar grupos cargados y provocar la disrupción de los puentes salinos y enlaces hidrofóbicos en las membranas celulares lo que puede llevar a un aumento en la permeabilidad (Barbosa-Cánovas et al., 1998). Además, la disminución en la constante dieléctrica del agua provocada por el tratamiento por APH combinado con un ligero aumento en la temperatura puede llevar a una disminución en la polaridad del medio que puede permitir aumentar la extracción de compuestos fenólicos y otros compuestos con capacidad antioxidante (Fernández et al., 1997).

## Parte experimental

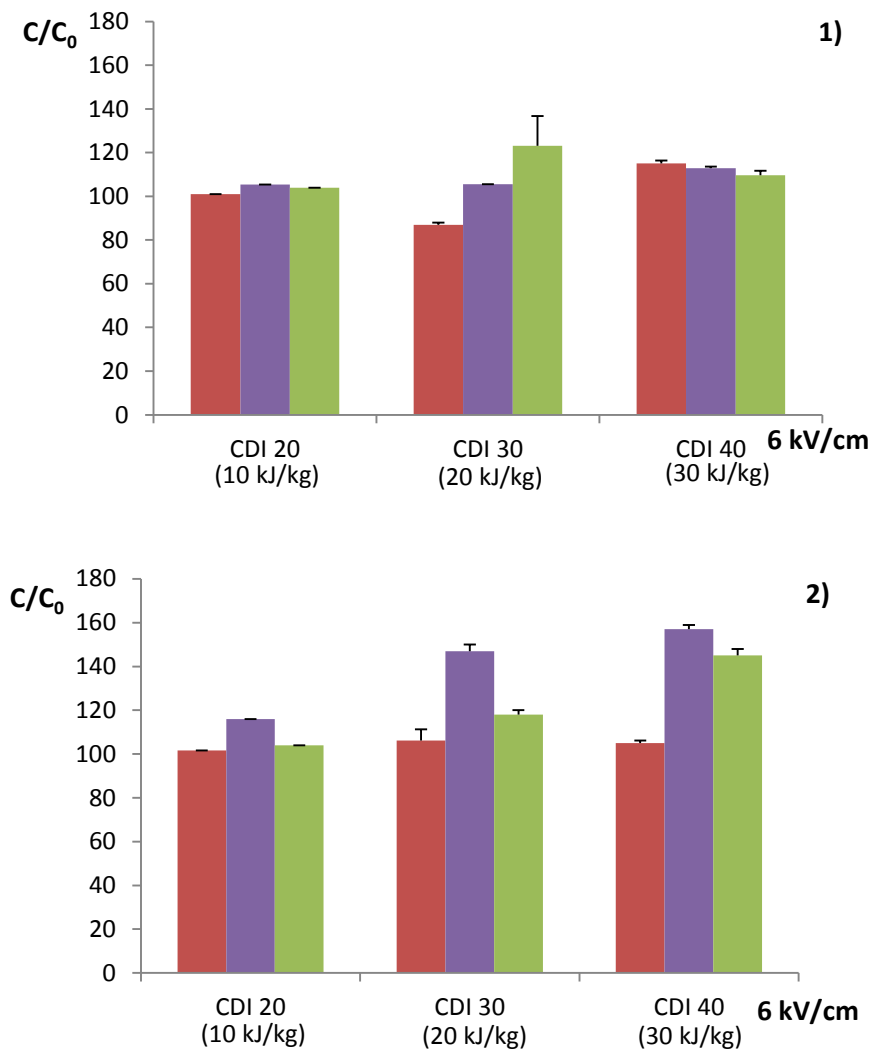


**Figura n° 40.** Extracción compuestos antioxidantes tras aplicar APH: con 1) mezcla A, 2) mezcla B. (■ FST, ■ Antocianinas totales, ■ TEAC).



Tras aplicar el tratamiento por PEAI, se obtiene un aumento en compuestos fenólicos, antocianinas totales y capacidad antioxidante cuando se alcanza un CDI de 40 en el caso de utilizar la mezcla B. En la Figura n° 41 se observa como la extracción de las antocianinas es dependiente del CDI, obteniéndose hasta un aumento del 40% en la extracción en comparación con la muestra sin tratar cuando el CDI es 40. En este mismo sentido, Corrales et al. (2008) obtienen resultados similares en derivados de uva cuando se aplican pulsos eléctricos de 3 kV/cm. Tras aplicar pulsos eléctricos en un rango de campo eléctrico suficiente para que se produzca la permeabilización celular, algunos poros nunca se sellarían. Sin embargo, muchos de estos poros celulares sí que vuelven a cerrarse pero de igual manera existe un daño celular irreparable en la permeabilidad de la membrana plásmática, con la consiguiente liberación del contenido celular y la muerte de la célula, lo que conlleva a un aumento en la extractabilidad de los componentes celulares. La membrana celular, que actúa como barrera para la transferencia de masa se ve dañada y de esta manera se ve facilitada la extracción. Respecto a la capacidad antioxidante total se observa el mismo comportamiento anteriormente descrito. Sin embargo, con los fenoles solubles totales la tendencia no está bien definida. Según Revilla et al. (1998) y Pinelo et al. (2005), los flavonoles y las antocianinas son más solubles en un medio orgánico que en agua y obtienen que los compuestos fenólicos presentan una mayor actividad cuando están disueltos en etanol>metanol>agua; ordenados de menor a mayor polaridad. En esta misma línea, Van der Berg et al. (1999) obtienen que la actividad antioxidante de la quercitina en una solución de etanol es casi el doble que la observada en un disolvente orgánico Triton X-100.

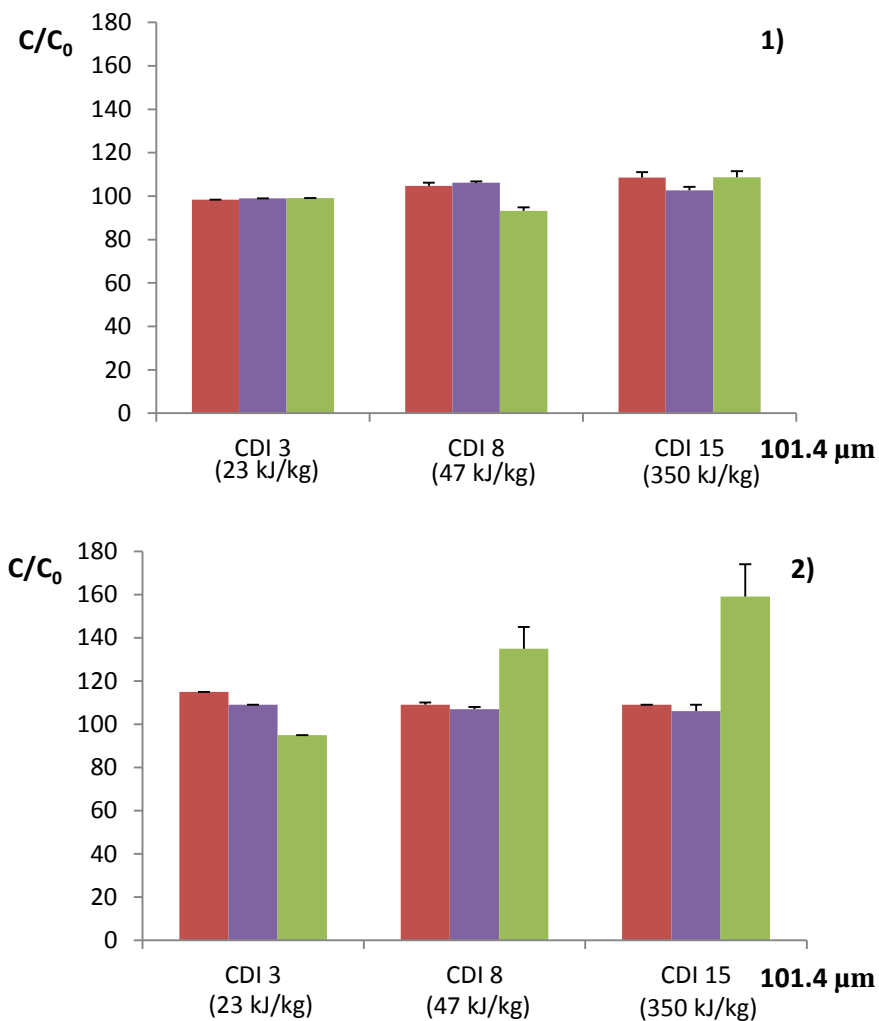
## Parte experimental



**Figura n° 41.** Extracción compuestos antioxidantes tras aplicar PEAI: con 1) mezcla A, 2) mezcla B. (■ FST, ■ Antocianinas totales, ■ TEAC).

El efecto de los ultrasonidos sobre los compuestos fenólicos, antocianinas totales y capacidad antioxidante es menos pronunciada, si se evalúan todos los parámetros en conjunto, que para el tratamiento térmico, APH y PEAI en las dos mezclas utilizadas (Figura n° 42). El tratamiento térmico, así como APH y PEAI pueden inactivar algunas enzimas que degraden los compuestos fenólicos, este hecho puede explicar la más alta capacidad antioxidante. En esta línea, Estiaghi y Knorr (2000) obtienen que el contenido nutricional de los zumos de frutas así como el número de compuestos intracelulares de las uvas se ven aumentados tras la aplicación de un tratamiento externo con campos eléctricos en un rango de 1-3 kV/cm.

## Parte experimental



**Figura n° 42.** Extracción compuestos antioxidantes tras aplicar ultrasonidos: con 1) mezcla A, 2) mezcla B. (■ FST, ■ Antocianinas totales, ■ TEAC).

## **4.7. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS Y SITUACIÓN ACTUAL DEL TEMA**

Se realiza una revisión bibliográfica para evaluar la situación actual del tema y comparar los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, no hemos encontrado estudios con muestras similares a las formuladas en el presente trabajo, por ello se realiza una revisión bibliográfica considerando los alimentos utilizados en la formulación de las mismas: zumo de frutas, zumos/sopas de vegetales y leche tras la aplicación de las diferentes tecnologías: APH, PEA y US.

### **Altas presiones hidrostáticas (APH)**

En el presente trabajo tras la aplicación de los distintos tratamientos por APH el pH y °Brix no se ven modificados en ninguna de las muestras estudiadas (zumo de naranja-leche, bebida de vegetales, zumo de arándanos). En la bebida de vegetales hay un aumento significativo del índice de pardeamiento al aplicar los diferentes tratamientos por APH, sin embargo, en el zumo de naranja-leche el aumento es significativo únicamente en las condiciones más intensas (400 MPa/42°C/540s).

Bull et al. (2004) tras comparar la calidad del zumo de naranja procesado por APH (600MPa/20°C/60s) con el fresco no encuentran cambios significativos en el pH, °Brix, viscosidad, acidez, sólidos insolubles e índice de pardeamiento. Los resultados coinciden con los observados por Fernández-García et al. (2001) en zumo mezcla de naranja, limón y zanahoria (500-800 MPa/temperatura ambiente/5min) y Patrignani et al. (2009) cuando aplican APH (100 MPa/40°C) en bebidas a base de zanahoria, sin embargo en el zumo de albaricoque obtienen un aumento en la viscosidad. Porretta et al. (1995) al estudiar zumo de tomate tratado por APH (500-900 MPa/3-9min) observan que

el contenido total de pectina así como la viscosidad aumentan con la presión pero no dependen del tiempo del tratamiento.

En cuanto al color, después de aplicar los distintos tratamientos por APH en la bebida de zumo de naranja y leche objeto de estudio en este trabajo los valores de  $a^*$  y  $b^*$  disminuyen cuando se aplican presiones superiores a 300 MPa/32°C/300s. En el zumo de arándanos también se observa una disminución significativa en los valores de  $b^*$ . Sin embargo para la bebida de vegetales, se obtiene un aumento significativo de estos valores en todas las muestras tratadas por APH. Respecto a la luminosidad ( $L^*$ ), ésta disminuye en la bebida de zumo de naranja y leche y zumo de arándanos cuando se aplican presiones de 200-400 MPa y 200-600 MPa, respectivamente para todos los tiempos estudiados. En cuanto a las diferencias totales de color, éstas aumentan a medida que se aplican presiones y tiempos mayores de tratamiento en la bebida de zumo de naranja y leche, aunque sólo son ligeramente superiores a 3 a 400 MPa/42°C/540s. Mientras que en el caso de la bebida de vegetales y en el zumo de arándanos no se observa relación presión y tiempo en el aumento de  $\Delta E$ . Así pues en la bebida a base de vegetales no se obtienen cambios notables en el color ( $\Delta E < 3$ ), excepto en dos casos y en el zumo de arándanos no se obtienen diferencias en las muestras tratadas por APH en comparación con la muestra sin tratar y en ningún caso se supera el valor de 1.4.

Bull et al. (2004) no obtienen cambios significativos en el color del zumo de naranja tratado por APH (600MPa/20°C/60s). Del mismo modo Hsu et al. (2008) tampoco observan cambios en color del zumo de tomate tras APH cuando se utilizan presiones iguales o inferiores a 200 MPa a 4 y 25°C mientras que a 500 MPa (4 y 25°C) se obtiene un mayor índice  $a^*/b^*$ , parámetro de calidad en zumo de tomate, presentando así una mayor calidad el zumo tratado por APH con respecto al fresco. Similares resultados se observan por Porretta et al. (1995) tras aplicar APH (500-900 MPa/3-9min) a zumo de tomate y Rodrigo et al. (2007)

después de tratar con APH (300-700 MPa/65°C/60min) un zumo de fresas. En ambos casos obtienen un aumento en el valor de  $a^*$  conforme aumenta la presión del tratamiento. Perera et al. (2010) observan un aumento en el índice de pardeamiento y cambios totales de color en zumo de piña tras aplicar APH (600 MPa/22°C/1-5min) con respecto al zumo fresco.

En el estudio realizado en la presente tesis se observa como el índice de turbidez disminuye significativamente ( $p < 0.05$ ) con respecto a la bebida no tratada cuando se aplican presiones mayores de 200 MPa en la bebida zumo de naranja mezclado con leche, mientras que en la bebida de vegetales no se observan cambios significativos ( $p < 0.05$ ). Otros autores como Goodner et al. (1999) and Parish (1998) aplican tratamientos de 500-900 MPa/60°C/1s-600s con el fin de estabilizar la turbidez de los zumos, obteniendo que cuando se aplican presiones más altas durante tiempos más largos se mantiene la turbidez del zumo.

Tras realizar un análisis sensorial Parish (1998) concluye que el sabor del zumo de naranja tratado por APH (500-900 MPa/60°C/1s-600s) es mejor que el tratado térmicamente. Fernández-García et al. (2001) también observan diferencias entre el aroma del zumo tratado por APH (500-800 MPa/temperatura ambiente/5min) y el fresco y Porretta et al. (1995) tras aplicar APH (500-900 MPa/3-9min) a zumo de tomate observan un aumento en n-hexanal dependiente del tiempo y la presión del tratamiento. En otro estudio, Sampredo et al. (2009) al estudiar una bebida mezcla de zumo de naranja mezclado con leche observan que el porcentaje de pérdidas de compuestos volátiles tras aplicar APH (450-650 MPa/30-50°C/15min) oscila entre 7.5-14.4% a 30°C y 22.9-42.3% a 50°C, mientras que Baxter et al. (2005) no encuentran diferencias en los compuestos volátiles responsables del aroma en los zumos de naranja tratados por APH (600 MPa/18-20°C/60s) y calor (85°C/25s). En este sentido, Takahashi et al. (1993) en zumo de mandarina y Yen and Lin (1999) en zumo de guayaba, tras

aplicar APH 400MPa (temperatura ambiente/10min) y 600MPa (25°C/15min), respectivamente, tampoco observan modificaciones en el aroma con respecto al zumo fresco ni tampoco los sabores desagradables del zumo tratado térmicamente. En esta misma línea, Daoudi et al. (2002) en zumo de uva, no observan modificaciones en el aroma ni en el color entre el zumo fresco y el tratado por APH (400-500 MPa/40°C/10min y 400 MPa/40°C/10min).

El efecto de las altas presiones sobre la estabilidad de las vitaminas es uno de los estudios que más interés suscita entre los diferentes autores que evalúan este proceso.

En las muestras estudiadas en la presente tesis doctoral (zumo de naranja-leche, bebida de vegetales, zumo de arándanos), la retención de ácido ascórbico es superior al 90% en todos los casos tras aplicar APH (100-400 MPa/20-42°C/120-540s).

Fernández-García et al. (2001) en una mezcla de zumo de naranja-limón-zanahoria no obtienen pérdidas significativas en el contenido de ácido ascórbico en los zumos tratados por APH (500-800 MPa/temperatura ambiente/5min). Tampoco obtienen cambios significativos Sánchez-Moreno et al. (2003), Bull et al. (2004) y Esteve y Frígola (2008) tras aplicar tras aplicar APH (350 MPa/30°C/2.5min; 600 MPa/20°C/60s y 400 MPa/42°C/5min, respectivamente) a zumo de naranja. Sin embargo, Polydera et al. (2003) observan pérdidas entre el 20-31% en el contenido de vitamina C después del tratamiento por APH (500 MPa/35°C/5min) y Sánchez-Moreno et al. (2003b) tras aplicar 100 MPa/60°C/5min y 400 MPa/40°C/1min y Sánchez-Moreno et al. (2005) tras aplicar APH (100-400 MPa/30-60°C/1-5min) observan una disminución del 9% en el contenido de ácido ascórbico y vitamina C total en zumo de naranja.

Taoukis et al. (1998) en un estudio sobre el efecto de la combinación de las altas presiones con calor (600 MPa/40-75°C/40min) en la vitamina C de zumos de piña, pomelo y uva, observan pérdidas desde



20-26% hasta 60-70% conforme aumenta la temperatura del tratamiento. Los resultados obtenidos en el caso del zumo de uva son similares a los que obtienen Del Pozo-Insfran et al. (2007), los cuales observan unas pérdidas de ácido ascórbico del 18% y 84% a 550 y 400 MPa respectivamente. Estos autores atribuyen la mayor degradación de ácido ascórbico en este tipo de matrices a una activación enzimática, que se produce a presiones inferiores a 550 MPa.

Donsi et al. (1996) observan que no se producen cambios en las concentraciones iniciales de ácido ascórbico ni en el contenido de vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> y niacina tras aplicar APH (200-500 MPa/30°C/1min) en diferentes zumos de cítricos. Sancho et al. (1999) al evaluar el efecto de las APH (200, 400 y 600 MPa/20°C/30min) sobre vitaminas hidrosolubles (C, B<sub>1</sub> y B<sub>6</sub>) en 'coulis' de fresas observan una retención de aproximadamente el 88% y 89% de ácido ascórbico tras los tratamientos a 200 y 600 MPa respectivamente.

Por otra parte, Indrawati et al. (2004) evalúan el efecto del tratamiento combinado de APH con calor (100-800 MPa/30-100°C/0-90min) sobre el ácido fólico en zumos de naranja y zanahoria obteniendo que el orden de estabilidad a la presión y a la temperatura de los folatos en zumo de naranja era la siguiente: ácido5-metiltetrahidrofólico>ácido5-formil-tetrahidrofólico>ácido5-tetrahidrofólico. Asimismo observan que en zumo de naranja la presión induce la degradación térmica del ácido fólico ya que a elevadas temperaturas (80°C), la presión favorece la conversión de 5-formil-tetrahidrofólico a ácido 5,10 meteniltetrahidrofólico, mientras que el ácido 5-metiltetrahidrofólico es bastante resistente a presiones superiores a 500 MPa/60°C. Sin embargo, en zumo de zanahoria el ácido 5-metiltetrahidrofólico, es bastante inestable a presiones superiores a 500 MPa/60°C.

## Parte experimental

---

En lo que respecta a las vitaminas liposolubles, existen pocos estudios que evalúen el efecto de las altas presiones sobre este tipo de vitaminas.

Fundamentalmente las investigaciones se han centrado en el efecto que pueden tener las APH en la extractabilidad de los carotenoides algunos de los cuales presentan actividad provitaminínica A.

En la presente tesis doctoral no se obtienen cambios estadísticamente significativos en el contenido de vitamina D2 y D3 tras aplicar los distintos tratamientos por APH (100-400MPa/20-42°C/300s) en las bebida a base de zumo de naranja con leche y en la bebida de vegetales objeto de estudio. Respecto a los tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ) y la actividad vitamínica E, en la bebida de zumo de naranja con leche se observa un aumento en la actividad vitamínica E debido fundamentalmente a un aumento en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol, que es máximo a 300 MPa (68%). Este aumento es significativo en todos los tocoferoles a partir de 200 MPa. Sin embargo, en la bebida de vegetales se obtiene una disminución del 19% en la actividad vitamínica E cuando se aplican presiones de 100 MPa mientras que cuando se aplican presiones de 200, 300 y 400 MPa se observa un aumento significativo de la misma que oscila entre 15% y 20%.

En lo que se refiere al contenido de carotenoides, se obtiene un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de éstos en todas las muestras de zumo de naranja y leche tratadas por APH (100-400 MPa) durante 420 y 540s respecto a la bebida no procesada, mientras que en la bebida de vegetales se ven particularmente afectados tras el tratamiento por APH, obteniendo resultados inferiores en comparación con la muestra no tratada.

Bignon (1996) evalúa el efecto de las APH sobre vitamina A y E sin encontrar cambios tras el tratamiento.

Bull et al. (2004), Esteve y Frígola (2008) y Esteve et al. (2009) tras aplicar APH (600 MPa/20°C/60s; 400 MPa/42°C/5min; 400

MPa/30°C/5min, respectivamente) en zumo de naranja no encuentran diferencias en el contenido carotenoides, así como De Ancos et al. (2002) tampoco observan cambios significativos en el perfil de carotenoides tras aplicar presiones entre 50-200 MPa. Por otra parte, numerosos estudios avalan la utilización de las APH como un tratamiento adecuado para aumentar la extracción de carotenos desde la matriz, lo cual estaría asociado a un aumento del valor nutricional. En esta línea, De Ancos et al. (2002) observan un aumento significativo en el contenido total de carotenos tras aplicar un tratamiento de 350 MPa/30°C/5 min observando un incremento del 50% para el  $\beta$ -caroteno, 60% del  $\alpha$ -caroteno, 42% de la  $\beta$ -criptoxantina y 63% de la  $\alpha$ -criptoxantina, respecto al zumo fresco.

El tratamiento a 350 MPa aumenta el contenido de carotenos después de la desnaturalización de los enlaces caroteno-proteína inducidos por la presión (De Ancos et al., 2002). Sánchez-Moreno et al. (2003b, 2005) observan un aumento en el contenido total de carotenoides y carotenoides provitamina A en zumo de naranja después de todos los tratamiento por APH (100-400 MPa/30-60°C/1-5min). De Ancos et al. (2000) observan un aumento superior al 40% en el contenido de carotenoides en un homogeneizado de zanahoria tras tratamiento por APH (600 MPa/25°C/10min), si bien es cierto que la temperatura y tiempo de tratamiento son mayores en el primer caso. Sin embargo, Tauscher (1998) obtiene pérdidas poco considerables de carotenos (máximo 5%) en zumo de zanahoria tras aplicar APH (600 MPa/75°C/40min). Hsu et al. (2008) observan que niveles de APH iguales o inferiores a 200 MPa (4 y 25°C) preservan los carotenoides y el licopeno en zumo de tomate y a 500 MPa (4 y 25°C) incluso se ven aumentados con respecto al fresco. Por otra parte, Plaza et al. (2006) tras realizar un estudio en una sopa fría de vegetales a la que aplican APH (150-350 MPa/60°C/15 min) observan como a medida que

aumenta la presión de tratamiento, aumentan las pérdidas en el contenido de carotenos.

En lo que respecta al contenido en compuestos fenólicos, en este trabajo se obtiene que éstos son resistentes y no se observan modificaciones dependientes de la presión o del tiempo de aplicación del tratamiento en las muestras estudiadas (zumo de naranja-leche, bebida de vegetales y zumo de arándanos). Tampoco Esteve y Frígola (2008) y Fernández-García et al. (2000) observan cambios en el contenido de compuestos fenólicos totales tras aplicar APH a zumo de naranja (400 MPa/42°C/5min) y zumo de manzana (600 MPa/60°C/30min), respectivamente. Por otra parte, Sánchez-Moreno et al. (2003b) también investigan el comportamiento de los compuestos fenólicos en zumo de naranja tras el tratamiento por APH (100-400 MPa/30-60°C/1-5min) observando que al aumentar la presión de tratamiento no se produce un aumento en la extracción de flavanonas, mientras que el contenido de hesperidina aumenta un 34 y un 22% tras el tratamiento por APH a 350 MPa/30°C/2.5min y 400 MPa/40°C/1min, respectivamente. Por otra parte, Sánchez-Moreno et al. (2005) observan un aumento en el contenido de naringenina y de hesperitina del 20 y 40% respectivamente tras la hidrólisis del extracto de zumo de naranja presurizado a 400 MPa/40°C/1min. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Baron et al. (2006) tras la aplicación de APH (200-600 MPa/15-65°C) en zumos de manzana, en los cuales se observan cambios en el perfil de compuestos fenólicos, ya que aumentan significativamente los ácidos hidroxicinámicos y procianidinas tras 400 MPa/10min en comparación con el zumo fresco, las catequinas fueron los compuestos que mayores variaciones experimentan en su contenido, mientras que las dihidrochalconas no se ven modificadas.

Del Pozo-Insfran (2007) al estudiar el efecto de las APH en el zumo de uva observan mayores pérdidas en el contenido de antocianinas a 400 MPa (70%) que a 550 MPa (46%). Ferrari et al. (2010) observan

resultados similares en zumos de granada tras aplicar APH (400-600 MPa/25-50°C/5-10min) obteniendo que el contenido de antocianinas se ve influenciado principalmente por los niveles de presión y temperatura. A temperatura ambiente, los niveles más altos de presión y los tiempos más largos de procesamiento llevan a una disminución del contenido de antocianinas. Cuando la temperatura es igual o mayor a 45°C, el tiempo de procesamiento no influye en el contenido de antocianinas. A 45°C hay una disminución en el contenido total de antocianinas mientras que a temperatura >45°C es similar o superior al zumo de granada fresco.

En el presente trabajo se obtiene un aumento para los valores medios de capacidad antioxidante para TEAC y ORAC de las muestras de zumo de naranja mezclado con leche tratadas a 200 MPa durante 120 y 420s. Este aumento en la capacidad antioxidante puede ser debido a una mejor extractabilidad de los compuestos antioxidantes tras el tratamiento por APH (Corrales et al., 2008), mientras que en la bebida a base de vegetales y en el zumo de arándanos se observa una disminución en la capacidad antioxidante tras aplicar los distintos tratamientos por APH.

Fernández-García et al. (2001) no obtienen cambios en la capacidad antioxidante (DPPH) después de tratar un zumo mezcla de naranja-limón-zanahoria con APH (500-800 MPa/temperatura ambiente/5min). En este mismo sentido Esteve y Frígola (2008) no observan cambios significativos en la capacidad antioxidante (TEAC) en zumo de naranja tras el tratamiento por APH (400 MPa/42°C/5min). Hsu et al. (2008) observan que niveles de APH iguales o inferiores a 200 MPa (4 y 25°C) preservan la capacidad antioxidante (DPPH) del zumo de tomate y aumenta cuando aplican 100 MPa (4 y 25°C). Sin embargo, Indrawati et al. (2004) al estudiar el efecto combinado presión, temperatura, tiempo (100-800 MPa/30-100°C/0-90min) en zumo de naranja observan que la capacidad antioxidante total (TEAC) disminuye después del tratamiento

por APH (100-800 MPa) combinado con temperaturas de 30-65°C en función del tiempo de tratamiento (hasta 90 min). Del Pozo Insfran et al. (2007) también observan mayores pérdidas en la capacidad antioxidante (ORAC) al aumentar la presión de tratamiento y estas pérdidas se correlacionan con las pérdidas en el contenido de antocianinas. Plaza et al. (2006) en una bebida de vegetales también observan como a medida que aumenta la presión de tratamiento, aumentan las pérdidas de capacidad antioxidante (DPPH).

A pesar de que la leche fue el primer producto tratado con altas presiones (Hite, 1899) y se han realizado numerosos estudios acerca de los cambios que pueden inducir las altas presiones sobre este alimento, en la actualidad no existe leche tratada por APH comercializada (Huppertz et al., 2006).

Kim et al. (2008) no observan cambios en el pH ni en la viscosidad de la leche tras el tratamiento por APH (200 MPa/-4°C/10, 20 y 30min), sin embargo otros autores obtienen un aumento del pH dependiente de la presión y el tiempo de tratamiento (Schrader et al., 1997; Schrader & Bucheim, 1998; Huppertz et al., 2004, Zobrist et al., 2005). En lo que respecta a las propiedades sensoriales, García-Risco et al. (2000) sugieren que la aplicación de APH (400 MPa/40-60°C/15min) mantiene o mejora la calidad organoléptica de la leche.

En algunos estudios se observa como la aplicación del tratamiento por APH desestabiliza las micelas de caseína y además aumenta la viscosidad dinámica de la leche mientras que disminuye la turbidez y la luminosidad en leche desnatada, normalmente en intervalos de 200-400 MPa (Shibauchi et al., 1992; Desobry-Banon et al., 1994; Regnault et al., 2004). La disminución de la turbidez de la leche se relaciona con un aumento en la transmitancia de la luz en la leche desnatada presurizada, así pues la leche desnatada tratada llega a ser casi transparente, este efecto se ve aumentado a medida que aumenta la presión aplicada y el

tiempo de tratamiento. Sin embargo la leche entera no muestra cambios en la turbidez, probablemente a causa de los glóbulos de grasa (Shibauchi et al., 1992).

Gervilla et al. (2001) tras aplicar APH (100-500 MPa/4, 25 y 50°C/10min) observan una disminución de  $L^*$  y un aumento de  $a^*$  y  $b^*$  a medida que aumenta la presión. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kim et al. (2008).

Con respecto a las vitaminas de la leche, Sierra et al. (2000) no observan pérdidas significativas de vitaminas  $B_1$  y  $B_6$  tras aplicar APH (400MPa/25°C/30min) mientras que Kim et al. (2008) observan una disminución significativa en los valores de L-ascórbico, niacina y riboflavina a medida que aumenta el tiempo de tratamiento en las muestras tratadas por APH en comparación con la leche fresca. Sin embargo Molto-Puigmartí et al. (2011) no encuentran diferencias significativas en los niveles de vitamina C y tocoferoles en las muestras de leche humana tratadas por APH (400-600MPa/22-27°C/5min) y frescas.

En nuestro estudio, se observa una disminución en el contenido graso en todas las muestras de zumo de naranja con leche tratadas por APH (100-400MPa/20-42°C/300s) sin embargo, en la bebida de vegetales no se obtienen cambios significativos en el contenido graso.

Respecto al perfil lipídico, en la bebida de zumo de naranja con leche se obtiene un aumento significativo en el porcentaje de SFA a 100 y 200MPa debido principalmente a un incremento en los niveles de C16:0 y C18:0 mientras que a medida que aumenta la presión de tratamiento (300 y 400MPa) se disminuye el porcentaje de SFA. En lo que respecta a los MUFA se observa un pequeño aumento, aunque significativo en el porcentaje de ácido oleico (C18:1) en todas las bebidas respecto a la bebida sin tratar. En la bebida de vegetales no se obtienen cambios estadísticamente significativos con los diferentes tratamientos por APH cuando agrupamos los ácidos grasos en SFA, MUFA y PUFA. Sin

embargo, sí que se observa un aumento del 5% en el porcentaje de MUFA tras aplicar el tratamiento a 400MPa destacando el aumento en el porcentaje de ácido oleico.

Por otra parte, también existen estudios sobre la porción grasa de la leche, de este modo, algunos autores han observado que el tamaño del glóbulo de grasa no se ve afectado significativamente por el tratamiento por APH (Buffa et al., 2001; Huppertz et al., 2003; Ye et al., 2004), sin embargo algunas proteínas del suero son desnaturalizadas tras el tratamiento por APH de la leche entera. Esto contrasta con otras investigaciones, que sugieren que presiones superiores a 500 MPa producen algunas modificaciones en el tamaño y distribución del glóbulo de grasa de la leche (Gervilla et al., 2006; García-Amezquita et al., 2009).

Con respecto al perfil de ácidos grasos, Gervilla et al. (2001) observan niveles de ácidos grasos libres inferiores a los de la leche no tratada, sin embargo Pereda et al. (2008) obtienen aumentos en los niveles de algunos ácidos grasos libres ( $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$  y  $C_{18:1}$ ) tras el tratamiento por APH (200 Y 300MPa/30 y 40°C). Probablemente debido a que no se produce la total inactivación de algunas lipasas, éstas pueden favorecer la lipólisis en la leche ya que la lipoprotein lipasa hidroliza principalmente las posiciones 1 y 3 de los triglicéridos de cadena larga (Deeth et al., 2006), y puede aumentar los niveles de los ácidos grasos libres ( $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$  y  $C_{18:1}$ ). En esta línea Hayes y Kelly (2003) obtienen que tras aplicar presiones entre 50-200 MPa no se inactiva la lipoprotein lipasa. Recientemente Rodríguez-Alcalá et al. (2009) tras aplicar APH (50-350 MPa/10°C) en leche de oveja, cabra y vaca y Molto-Puigmartí et al. (2011) tras APH (400, 500 y 600 MPa/22, 24.5 y 27°C/5min) en leche humana no encuentran modificaciones significativas en los ácidos grasos entre leche tratada por APH y fresca. Por otra parte, Kim et al. (2008) tampoco observan cambios en el contenido de ácidos grasos libres de cadena corta tras aplicar un



tratamiento por APH cuando el tiempo de tratamiento fue inferior a 20 min, sin embargo sí que aumentan a los 20 y 30 min, lo que justifican por la posible activación de la lipólisis.

Lopez-Fandiño et al. (1996) estudian el efecto de las APH sobre la lactosa de la leche de vaca. Observan que tras la presurización (100-400MPa/25°C/10-60min) no hay cambios en el contenido de lactosa, lo que sugiere que posiblemente no se produce reacción de Maillard o isomerización de la lactosa tras APH.

En lo que respecta a los minerales, como consecuencia del tratamiento por APH, se observan dos modificaciones fundamentales del balance mineral de la leche: el nivel de minerales ionizados, particularmente calcio y la distribución de minerales. Varios estudios demuestran que el tratamiento por APH aumenta la concentración de calcio iónico en leche (Schrader et al., 1997; Lopez-Fandiño et al., 1998; Schrader & Buccheim, 1998; Zobrist et al., 2005).

### **Pulsos eléctricos de alta intensidad**

Previamente, en trabajos anteriores realizados en el laboratorio del área de Nutrición y Bromatología se estudió el efecto de los PEAI en continuo en una bebida de zumo de naranja mezclado con leche obteniendo que pH, sólidos solubles y acidez total no se ven afectados tras aplicar PEAI (15-40 kV/cm, 40-700  $\mu$ s). En estos trabajos también se obtienen retenciones de ácido ascórbico superiores al 90% tras aplicar PEAI (Zulueta et al. 2010a) y un aumento en la concentración de carotenoides cuando se aplica un campo de 15 kV/cm, esto contrasta con la disminución que se produce a 40 kV/cm (Zulueta et al. 2010b). Zulueta et al. (2007) obtienen una disminución del tamaño del glóbulo de grasa cuando se aplican los tratamientos por PEAI aunque no encuentran diferencias significativas en el contenido de ácidos grasos saturados, monosaturados y poliinsaturados de zumo de naranja-leche procesados por PEAI (35-40 kV/cm, 40-180  $\mu$ s).

En este trabajo se realiza un estudio del efecto de los PEAI en tratamiento discontinuo, de esta manera se evita el aumento de temperatura que se produce en el tratamiento continuo y es posible evaluar de forma aislada el efecto de los PEAI. Así pues en la bebida de zumo de naranja y leche la retención de ácido ascórbico es superior al 90% en todos los casos tras aplicar PEAI (16-40 kV/cm, 80-240 kJ/kg) mientras que no se observan cambios significativos en el contenido de los fenoles solubles totales y la capacidad antioxidante total disminuye significativamente al aplicar campos de 27 y 40 kV/cm con una energía de 240 kJ/kg con pérdidas comprendidas en el intervalo del 2% al 17%.

Otros autores también evalúan la aplicación de los PEAI en este tipo de bebidas (mezcla de zumo de naranja y leche) utilizando la modalidad de tratamiento en continuo. De esta manera Sampetro et al. (2009) obtienen que el porcentaje de pérdidas de compuestos volátiles en zumo de naranja mezclado con leche tras aplicar PEAI (15-30 kV/cm, 50  $\mu$ s,

25-50°C) oscila entre 8.3-13.7% a 25°C, 5.8-21.0% a 45°C y 22.9-42.3% a 50°C.

Rivas et al. (2007) observan como las vitaminas hidrosolubles (biotina, ácido fólico, ácido pantoténico y riboflavina) se ven afectadas de forma similar tras la aplicación de PEAI (15-40 kV/cm, 40-700  $\mu$ s) como tras el tratamiento térmico a 84°C, pero no tanto como a 95°C (45s).

Morales-de la Peña et al. (2010) tras aplicar PEAI (35 kV/cm, 800 y 1400  $\mu$ s) a un zumo de frutas mezclado con bebidas a base de soja no obtienen cambios en pH, sólidos solubles y acidez total mientras que la viscosidad de la bebida aumenta a medida que aumenta el tiempo de tratamiento.

Otros autores han estudiado el efecto de los PEAI sobre diferentes parámetros fisicoquímicos y nutricionales en distintas matrices alimentarias, de este modo Qiu et al. (1998), Yeom et al. (2000) y Min et al. (2003a) tras aplicar el tratamiento por pulsos eléctricos de alta intensidad no obtienen diferencias significativas al comparar el sabor del zumo de naranja procesado mediante PEAI y el fresco. Por otra parte, Elez-Martínez et al. (2006) no obtienen cambios en pH, acidez ni en los °Brix del zumo de naranja procesado por PEAI (35 kV/cm, 1000  $\mu$ s) mientras que Cserhalmi et al. (2006) observan ligeras disminuciones en pH, °Brix y pardeamiento no enzimático en el zumo de naranja tras PEAI (28 kV/cm, 100  $\mu$ s). Min et al. (2003b) sí que obtienen diferencias significativas al comparar el sabor del zumo de tomate procesado mediante PEAI (40 kV/cm, 57  $\mu$ s) y sin tratar, siendo el primero de ellos el que obtiene mejor calificación mientras que tampoco observan cambios en el pH, °Brix y viscosidad del zumo de tomate. Aguiló-Aguayo et al. (2008) por el contrario, observan un aumento en la viscosidad del zumo de tomate tratado por PEAI (35 kV/cm, 1700  $\mu$ s). Por otra parte, Qin et al. (1995a) obtienen diferencias significativas al comparar el

sabor del zumo de manzana procesado mediante PEAI y sin tratar, siendo el primero de ellos el que obtiene mejor calificación. En zumo de manzana no se ven modificados los valores de sólidos solubles, pH y acidez observándose un ligero pardeamiento después del tratamiento con PEAI como observan Ortega-Rivas et al. (1998) tras aplicar tratamiento de 50, 58 y 66 kV/cm utilizando desde 2 hasta 16 pulsos y Walkling-Ribeiro et al. (2008) tras aplicar un tratamiento de 40 kV/cm durante 100 $\mu$ s. Cortés et al. (2005) después de estudiar el efecto de los PEAI en una bebida refrescante a base de chufa (horchata) no observan cambios en pH ni en la grasa total de la misma tras aplicar un tratamiento por PEAI (20, 25 y 35 kV/cm, 100-475  $\mu$ s) así como Rivas et al. (2006) tras estudiar el efecto del tratamiento por PEAI (25-40 kV/cm, 30-340  $\mu$ s) tampoco observan modificaciones en el pH, °Brix o hidroximetilfurfural (HMF) de una bebida mezcla de naranja-zanahoria después del tratamiento por PEAI. En la misma línea, Gardé-Cerdán et al. (2007) tampoco observan cambios significativos en el pH, contenido de azúcares reductores ni acidez total en el zumo de uva tras el tratamiento por PEAI con altas intensidades de campo y largos tiempos de tratamiento (35 kV/cm, 1 ms).

Jia et al. (1999) estudian el efecto del tratamiento por PEAI en zumo de naranja tras aplicar un campo eléctrico de 30 kV/cm durante 240 y 480  $\mu$ s sobre compuestos responsables del aroma y observan pérdidas de éstos del 3 y 9%, respectivamente tras aplicar los PEAI. Aguiló-Aguayo et al. (2009b; 2010a; b) tras aplicar tratamientos por PEAI (35 kV/cm, 1000-1727  $\mu$ s) en fresas y sandía, observan que el tratamiento por PEAI produce un aumento del 20% en la concentración de hexanal, (E)-2-nonenal, nonanal, 6-metil-5-hepten-2-ona y geranilacetona.

En lo que respecta a los cambios de color, Walkling-Ribeiro et al. (2008) no observan modificaciones en los parámetros CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) tras la aplicación de PEAI en zumo de manzana, mientras que Aguiló-

Aguayo et al. (2009a, 2009b) observan un mayor valor de luminosidad ( $L^*$ ) en el zumo de fresas tratado por PEAI (35 kV/cm, 1700  $\mu$ s) que en

el tratado térmicamente, pero en cualquier caso tanto las diferencias totales de color como el contenido de HMF del zumo tratado por PEAI (35 kV/cm, 1000  $\mu$ s) fueron inferiores al tratado térmicamente. Además en este mismo estudio no se observan cambios en el índice de pardeamiento Sin embargo, Xiang et al. (2007) observan cambios en los parámetros CIELAB que definen el color en una bebida a base de soja, observando un aumento del valor de  $a^*$  tras PEAI (18-22 kV/cm).

En cuanto al contenido de ácido ascórbico, dependiendo de los estudios se obtienen diferentes resultados. Así pues Evrendilek et al. (2000) tras aplicar PEAI (22-35 kV/cm, 94-166  $\mu$ s) y Walkling-Ribeiro et al. (2008) obtienen que este tipo de procesamiento no afecta significativamente al contenido en vitamina C en zumos de manzana y sidra, de forma similar Wu et al. (2005) observan pérdidas bajas o muy bajas de vitamina C tras la aplicación de PEAI (65 y 80 kV/cm utilizando 40-60 pulsos) en zumo de uva. Sin embargo, Sharma et al. (1998) observaron pérdidas en el contenido de vitamina C en zumo de naranja tras aplicar PEAI (28 kV/cm, 100-300  $\mu$ s), siendo mayores (4-13%) conforme aumenta el tiempo de tratamiento. Qiu et al. (1998) y Min et al. (2003a) observan que en zumo de naranja pasteurizado por calor el contenido en vitamina C disminuye 2 o 3 veces más que cuando el zumo se trata por PEAI. En zumo de naranja, Hodgins et al. (2002) obtienen pérdidas de vitamina C comprendidas entre 1.8-12.5% tras PEAI (15-35 kV/cm, 100-1000  $\mu$ s). Cserhalmi et al. (2006), Elez-Martínez et al. (2006) y Plaza et al. (2006) observan que el tratamiento PEAI provoca una disminución alrededor del 8% en el contenido de ácido ascórbico, mientras que tratamientos de pasteurización térmica destruyen hasta en un 17.2%. Min et al. (2003b) observan que el zumo de tomate tratado por PEAI retiene más ácido ascórbico que el tratado térmicamente, estos

resultados coinciden por los obtenidos por Odriozola-Serrano et al. (2008) también en zumo de tomate tras aplicar PEAI (20-35 kV/cm, 2000  $\mu$ s) usando pulsos bipolares a 250 Hz. Odriozola-Serrano et al. (2009) tras estudiar el efecto de la aplicación de pulsos en forma monopolar y bipolar (35 kV, 1000  $\mu$ s, 50-250 Hz) en zumo de tomate observan que los tratamientos PEAI en modo bipolar provocan una disminución en el contenido de vitamina C en comparación con PEAI en modo monopolar. Torregrosa et al. (2006) al estudiar el efecto de los PEAI sobre zumo de naranja-zanahoria demuestran que el contenido en vitamina C disminuye con el tiempo de tratamiento y la intensidad de campo eléctrico aplicada (25-40 kV/cm, 30-340  $\mu$ s). Además, estos autores proponen un modelo de primer orden para describir los cambios cinéticos del contenido en vitamina C durante los tratamientos a distintas intensidades de campo eléctrico.

Existen algunos estudios del efecto de las distintas variables de procesado mediante PEAI en el contenido de la vitamina C. Elez-Martínez y Martín-Belloso (2007) obtienen mayores pérdidas de vitamina C (2.9-15.7%) en zumo de naranja y 'gazpacho' cuando los tratamientos se aplican con elevadas intensidades de campo, frecuencias, anchuras de pulso y tiempos de tratamiento (15-35 kV/cm, 100-1000  $\mu$ s) en modo bipolar. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cortés et al. (2008) en zumo de naranja, quienes demuestran que el contenido en vitamina C disminuye con el tiempo de tratamiento y la intensidad de campo eléctrico aplicada. Además, estos autores proponen un modelo de primer orden para describir los cambios cinéticos del contenido en vitamina C durante los tratamientos a distintas intensidades de campo eléctrico. Por otra parte, Odriozola-Serrano et al. (2009) tras estudiar el efecto de la aplicación de pulsos en forma monopolar y bipolar (35 kV, 1000  $\mu$ s) en zumo de fresas, observan que los tratamientos PEAI en modo bipolar provocan una disminución en el contenido de vitamina C en comparación con PEAI en

modo monopolar, excepto para el tratamiento de 1  $\mu$ s en que no observan diferencias significativas entre las dos modalidades y del mismo modo Oms-Oliu et al. (2009) en zumo de sandía, obtienen después de aplicar tratamientos PEAI (30-35 kV/cm, 50-2050  $\mu$ s) en

modalidad mono y bipolar una menor concentración de vitamina C a medida que se aumentó la severidad del tratamiento de PEAI

En lo que respecta al contenido de carotenoides, Sánchez-Moreno et al. (2005) no observan diferencias significativas ni en el contenido en carotenoides individuales ( $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina, luteína,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno) ni en el contenido en vitamina A en el tratamiento por PEAI (35 kV/cm, 750  $\mu$ s) en comparación con el zumo tratado térmicamente. En cambio, Cortés et al. (2006) obtienen que las concentraciones de carotenos individuales se ven ligeramente aumentadas después de llevar a cabo tratamientos a 35 kV/cm en zumo de naranja, en la misma línea, Torregrosa et al. (2006) observan un aumento en el contenido de carotenoides en zumo de naranja-zanahoria al aumentar el tiempo de tratamiento, así pues obtienen un aumento de los compuestos con actividad provitamínica A a 25 y 30 kV/cm en comparación con el tratamiento térmico, mientras que Esteve et al. (2009) obtienen menores pérdidas de carotenoides totales en zumo de naranja tras el tratamiento por PEAI (30 kV/cm, 100  $\mu$ s) que tras pasteurización térmica. Min et al. (2003b) también observan que las concentraciones de licopeno en zumo de tomate no varían al someter el zumo a un tratamiento con PEAI. Por otra parte Odriozola-Serrano et al. (2009) observan un aumento en el contenido de algunos carotenoides (licopeno,  $\beta$ -caroteno y fitoflueno) en zumo de tomate tras tratamiento por PEAI (35 kV/cm, 1500  $\mu$ s) con pulsos bipolares de 4  $\mu$ s a 100 Hz, mientras que Odriozola-Serrano et al. (2008) y Oms-Oliu et al. (2009)

obtienen también un aumento en la concentración de licopeno en zumos de tomate y sandías respectivamente tras PEAI.

Sánchez-Moreno et al. (2005) estudian el efecto de los tratamientos por PEAI (35 kV/cm, 750  $\mu$ s) en el contenido en flavononas en zumo de naranja. Estos autores no observaron cambios en el contenido de flavononas totales, así como en el de agliconas hesperitina y naringenina después del tratamiento. Por otra parte Jia and Zhang (1999) tras aplicar PEAI (20 y 40 kV/cm, 50 y 150  $\mu$ s) a un zumo de arándanos no observan cambios estadísticamente significativos entre el contenido total de antocianinas entre las muestras tratadas por PEAI y el zumo fresco. Sin embargo, Odriozola-Serrano et al. (2009) observaron una mayor retención de antocianinas en zumo de fresas, tras aplicar PEAI en modo bipolar que en modo monopolar, en ambos casos la retención tras PEAI fue mayor que tras tratamiento térmico. En otro estudio, Aguilar-Rosas et al. (2007) estudian el efecto del tratamiento por PEAI (35 kV/cm) utilizando pulsos bipolares de 4  $\mu$ s (1.2 pulsos por segundo) y demuestran que el tratamiento por PEAI no causa una pérdida considerable de fenoles (14.5%) en comparación con el tratamiento térmico, en la línea de estos autores, Schilling et al. (2007) no observan cambios ni en el contenido individual ni en el contenido de compuestos fenólicos en zumo de manzana tras tratamiento por PEAI (30 Kv/cm) con diferentes energías de entrada (100, 121 y 130 kJ/kg) y Walkling-Ribeiro et al. (2008) también en zumo de manzana así como Odriozola-Serrano et al. (2009) en zumo de tomate tampoco observan cambios significativos en los compuestos fenólicos.

En lo que se refiere a la capacidad antioxidante, Elez-Martínez et al. (2006) y Plaza et al. (2006) no observan cambios en la capacidad antioxidante (DPPH) del zumo de naranja tras aplicar tratamientos por PEAI, del mismo modo Elez-Martínez y Martín-Belloso. (2007) en zumo de naranja y "gazpacho" así como Odriozola-Serrano et al. (2009) en zumo de tomate tampoco observan cambios significativos en la



capacidad antioxidante tras PEAI. Sin embargo, Oms-Oliu et al. (2009) y Odriozola-Serrano et al. (2009) observan una mayor retención de capacidad antioxidante total (DPPH) en zumos de sandía y fresas respectivamente tras aplicar tratamiento por PEAI con campos eléctricos más altos, y mayores frecuencias y amplitud de pulso.

Gardé-Cerdán et al. (2007) observan que el tratamiento por PEAI no modifica el contenido inicial en ácidos grasos de zumo de uva, a excepción del ácido láurico que disminuye considerablemente después del procesado. Además observan un aumento en el contenido de algunos aminoácidos (histidina, triptófano, asparagina, fenilalanina y ornitina) tras PEAI en comparación con el zumo fresco.

En otro trabajo, Li et al. (2003) estudian el efecto de los PEAI sobre la estabilidad de la Inmunoglobulina G en una bebida a base de soja enriquecida, sin encontrar modificaciones tras aplicar PEAI.

Qin et al. (1995b) no observan cambios en los parámetros fisicoquímicos o sensoriales en leche desnatada (2% de grasa) tras PEAI (40 kV/cm, 12-14  $\mu$ s), en comparación con leche desnatada no tratada. Otros autores como Michalac et al. (1999, 2003) tampoco observan variaciones en color, pH, humedad y tamaño de partícula en leche desnatada tras aplicar PEAI (35 kV/cm, 90  $\mu$ s y 188  $\mu$ s) respectivamente. Resultados similares obtienen Li et al. (2003) que no observan cambios en el pH ni en el color tras aplicar PEAI (35-40 kV/cm, 73  $\mu$ s) aunque Flourey et al. (2006) no observan cambios tras el tratamiento por PEAI (45 kV/cm, 500  $\mu$ s y 55 kV/cm, 250  $\mu$ s) en el pH, la viscosidad disminuye y aumentan las propiedades de coagulación para los campos más altos.

Bendicho et al. (2002) estudian la variación en el contenido vitamínico de la leche después de haber sido tratada con PEAI (22.6 Kv/cm, 400  $\mu$ s). Los resultados obtenidos muestran que no hay cambios ni en las vitaminas liposolubles estudiadas (colecalfiferol y tocoferol) ni en el contenido en riboflavina y tiamina, sólo un descenso en la vitamina C, aunque por debajo del valor obtenido tras los tratamientos térmicos. En la misma línea, Riener et al. (2009) tampoco observan cambios en el contenido de tiamina, riboflavina, retinol y  $\alpha$ -tocoferol tras el tratamiento por PEAI (15-35 kV/cm, 12.5-75  $\mu$ s).

Odriozola-Serrano et al. (2006) observan que el contenido en ácidos grasos de la leche tratada mediante PEAI (35 kV/cm, 300 y 1000  $\mu$ s) no varía con respecto a la muestra fresca. En este mismo estudio los autores demuestran que los tratamientos mediante PEAI aplicando altas intensidades de campo y tiempos cortos de tratamiento no afectan significativamente al contenido en  $\alpha$ -lactoalbumina y  $\beta$ -lactoglobulina. Tampoco hay cambios en la estructura de la inmunoglobulina G (Li et al., 2003). Sin embargo, Flourey et al. (2006) observan una modificación en los componentes proteicos de la leche así como de las micelas de caseína tras aplicar PEAI.

Evrendilek et al. (2000, 2001) no observan cambios en el color de una bebida de chocolate con leche tratada por PEAI (35 Kv/cm, 45  $\mu$ s).

## Ultrasonidos

En este trabajo se aplican tratamientos por ultrasonidos a una bebida de zumo de naranja mezclado con leche para ver el comportamiento de compuestos bioactivos tras los diferentes tratamientos. En las condiciones utilizadas (20kHz, 25-100%, 101.4-163.4 $\mu$ m, 20-45°C, 10-56s, 100-600kJ/kg) se observan pérdidas de ácido ascórbico comprendidas en el intervalo del 2-27%. Se obtiene un aumento en el contenido de compuestos fenólicos después del tratamiento por ultrasonidos (1-51%) excepto para las amplitudes 116.2 $\mu$ m (300-600kJ/kg) y 135.0 $\mu$ m (100kJ/kg) en las que se observan pérdidas, aunque nunca superiores al 5%. Además se obtiene una disminución significativa de la capacidad antioxidante total (1-26%) tras el tratamiento por ultrasonidos excepto cuando se utilizan las amplitudes 101.4 $\mu$ m (300kJ/kg) y 116.2 $\mu$ m (300 kJ/kg).

Otros autores han evaluado el efecto del tratamiento por ultrasonidos sobre diferentes parámetros fisicoquímicos y nutricionales en diferentes matrices alimentarias, así pues Valero et al. (2007) no observan cambios tras el tratamiento por ultrasonidos (23kHz y 500kHz, 120-600W, 0-180min) en diferentes atributos que definen la calidad del zumo de naranja como el contenido en limonina, índice de pardeamiento y color. Cheng et al. (2007) no obtienen cambios en pH, °Brix o acidez tras aplicar un tratamiento por ultrasonidos (35kHz, 20°C, 30min) en zumo de guayaba. Tampoco Adekunle et al. (2010) observan cambios en estos parámetros en el zumo de tomate procesado por ultrasonidos (20kHz, 24.4-61 $\mu$ m, 25°C, 2-10min), así como Tiwari et al. (2008a; 2008b; 2009; 2010) que estudian el comportamiento de zumo de naranja, arándanos y uva tratado por ultrasonidos (20kHz, 40-100%, 24.4-61 $\mu$ m, 25°C-39.9°C, 8.61-22.79W/cm<sup>2</sup>, 2-10min). Sin embargo, Tiwari et al. (2008c) utilizando las mismas condiciones de tratamiento por ultrasonidos en zumo de fresas sí que observan que estos

## Parte experimental

---

parámetros se ven influenciados tanto por la amplitud como por el tiempo de tratamiento.

Tiwari et al. (2008a; 2008b; 2008c; 2009; 2010) obtienen comportamientos diferentes con respecto al color en zumo de naranja, fresas, uva y arándanos, así pues en zumo de naranja y zumo de fresas, al aumentar el nivel de amplitud y tiempo de tratamiento disminuyen  $a^*$  y  $b^*$  mientras que  $L^*$ , diferencias totales de color, índice de pardeamiento y turbidez aumentan. Sin embargo en zumo de uva se observa un aumento del valor de  $a^*$  y  $L^*$  tras la sonicación mientras que  $b^*$  disminuye con respecto al zumo de uva fresco. En el caso del zumo de arándanos el valor de  $a^*$  aumenta significativamente con el tiempo de tratamiento mientras que no se ve influenciado por los distintos niveles de amplitud, comportamiento similar al de las diferencias totales de color, mientras que el valor de  $L^*$  no se ve influenciado por el tiempo de tratamiento pero sí se obtiene una disminución en los niveles más altos de amplitud. Cheng et al. (2007) en zumo de guayaba, encuentran diferencias significativas en todos los atributos de color, el valor de  $L^*$  se ve disminuido mientras que  $a^*$  y  $b^*$  aumentan tras el tratamiento por ultrasonidos (35kHz, 20°C, 30min). Rawson et al. (2010) estudian el efecto de los ultrasonidos (20kHz, 24.1-60 $\mu$ m, 25-45°C, 2-10min) sobre el color del zumo de sandía. Durante los tratamientos de termosonicación, los valores de  $L^*$  son menores a 25°C y en los niveles más bajos de amplitud, obteniendo el mayor aumento de  $L^*$  en el tiempo más largo de tratamiento y con la amplitud más alta (10min, 60 $\mu$ m). A mayores temperaturas y niveles de amplitud observan un aumento de  $L^*$  y  $a^*$ . Las diferencias totales de color para la mayor amplitud y duración fueron visibles ( $\Delta E > 3$ ). Adekunle et al. (2010) observan cambios en el color dependientes del nivel de amplitud y duración del tratamiento. Los ultrasonidos producen una disminución de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , mientras que las diferencias totales de color aumentan desde 0 hasta 6. Bosiljkov et al. (2009) obtienen un aumento en el pH en una bebida a

base de soja a medida que aumentó el tiempo de tratamiento, sin embargo no se observan modificaciones al aumentar la potencia del tratamiento cuando aplican tratamientos de ultrasonidos de 24kHz, 20-100W, 2-15min. En este mismo estudio también obtienen un aumento en la viscosidad de la bebida a base de soja tras aumentar la potencia y el tiempo de tratamiento. Por otra parte, la densidad aumenta con la potencia mientras que no se ve modificada con el tiempo de tratamiento. Respecto a la grasa, disminuye el tamaño de los glóbulos de grasa, siendo mayor la homogeneización tras la aplicación del tratamiento por ultrasonidos.

En lo que se refiere al ácido ascórbico, Tiwari et al. (2008a; 2008c) y Valdramidis et al. (2010) después de utilizar ultrasonidos (20kHz, 5-30°C, 0-10min) obtienen una disminución en el contenido de ácido ascórbico en zumo de fresas (11%) y zumo de naranja (15%) tras aplicar los tratamientos máximos. Rawson et al. (2010) tras aplicar ultrasonidos (20kHz, 24.1-60µm, 25-45°C, 2-10min) observan que la mayor retención de ácido ascórbico (94%) en zumo de sandía se obtiene en las condiciones de tratamiento más bajas mientras que en el nivel más alto de amplitud y mayor duración de tratamiento la retención es del 74%. Adekunle et al. (2010) obtienen una disminución en el contenido de ácido ascórbico tras aplicar los tratamientos por ultrasonidos (20kHz, 24.4-60µm, 32-45°C, 2-10min) que es máxima (32%) a 60µm, 45°C, 10min. Sin embargo, Cheng et al. (2007) observan un aumento (8%) en el contenido de ácido ascórbico en zumo de guayaba tras aplicar ultrasonidos (35kHz, 20°C, 30min).

Tiwari et al. (2008c) observan un ligero aumento (1-2%) en el contenido total de antocianinas en zumo de fresas y en particular de pelargonidina-3-glucósido en los niveles más bajos de amplitud y tiempo de tratamiento (20kHz, 40%, 2min, 30.6°C), sin embargo al nivel más alto de amplitud y mayor duración del tratamiento (20kHz, 100%,

10min, 39.9°C) se obtiene una disminución máxima del 3.2% en el contenido de antocianinas. En otro estudio, Tiwari et al. (2009) en zumo de arándanos obtienen más de un 94% de retención en el contenido de antocianinas después de usar las máximas condiciones de tratamiento (100% amplitud, 10min), lo que indica una gran estabilidad de las antocianinas al tratamiento de sonicación en el zumo de arándanos. Tiwari et al. (2010) obtienen diferencias significativas en los contenidos de antocianinas en zumo de uva tras el tratamiento por ultrasonidos en comparación con el zumo fresco, así pues la retención de cianidin-3-O-glúcosidos, malvanidin-3-O-glúcosidos y delphinidin-3-O-glúcosidos es de 97.5%, 48.2% y 80.9% respectivamente. Rawson et al. (2010) observan que la mayor retención de compuestos fenólicos y de licopeno se obtiene en las condiciones de tratamiento más bajas (20kHz, 24.1µm, 25°C, 2min), mientras que niveles más altos de amplitud y mayor duración de tratamiento disminuyen significativamente el contenido de los mismos y de licopeno, obteniendo pérdidas del 58% en el contenido de compuestos fenólicos y del 54% en el caso del licopeno cuando se aplica un tratamiento de 20kHz, 61µm, 45°C, 10min.

Tras aplicar el tratamiento por ultrasonidos (20kHz, 90-450W, 1-10min), Wu et al. (2000) observan una disminución en el pH de la leche a medida que aumenta la potencia y el tiempo de tratamiento, sin embargo las variaciones en la viscosidad son totalmente diferentes, ya que ésta aumenta cuando se aplican mayores niveles de potencia. En otro estudio realizado por Bermúdez-Aguirre et al. (2008) la leche sonicada (24kHz, 120µm, 400W, 63°C) presenta un color más blanco y generalmente un mejor grado de luminosidad y homogeneización en comparación a la leche tratada térmicamente y la leche fresca.

Durante décadas se ha considerado el tratamiento por ultrasonidos como un método efectivo para la reducción del tamaño del glóbulo de grasa (Chambers, 1937; Schmidt, 1985; Martínez et al., 1987). Así pues,

Villamiel and De Jong (2000) obtienen una reducción del 81.5% en el tamaño de los glóbulos de grasa en leche durante el procesamiento por

ultrasonidos de alta intensidad (20kHz, 120µm, 150W, 40.2-102.3s). En la misma línea, Wu et al. (2000) obtienen que los ultrasonidos disminuyen el tamaño del glóbulo de grasa medida que aumenta el tiempo de tratamiento y concluyen que los ultrasonidos pueden ser utilizados para homogeneizar muestras de leche a altos niveles de amplitud en comparación con la homogeneización tradicional. Esto coincide por lo observado por otros autores como Ertugay et al. (2004) tras aplicar 20kHz, 90-450W, 5-10min y recientemente Bermúdez-Aguirre et al. (2008) que observan que el tratamiento por ultrasonidos causa la desintegración de la membrana del glóbulo de grasa, dando lugar a glóbulos más pequeños con una superficie granular debido a su interacción con algunas micelas de caseína.

En lo que respecta al efecto de los ultrasonidos sobre las proteínas de la leche, Villamiel and de Jong (2000) observan que el tratamiento por ultrasonidos es capaz de desnaturalizar las proteínas séricas, siendo mayor este efecto en leche entera que en leche desnatada. Esta desnaturalización es mayor cuando se acompaña el tratamiento por ultrasonidos con calor, siendo este efecto sinérgico y más pronunciado en la leche entera, sin embargo, las caseínas no se ven afectadas. Del mismo modo Taylor and Richardson (1980) observan que la sonicación puede modificar la estructura cuaternaria y/o terciaria de las proteínas, pero no causa la disrupción total de la micela de caseína





## 5. CONCLUSIONS

---

## CONCLUSIONES

## 5. CONCLUSIONES

Del estudio realizado se pueden establecer las siguientes conclusiones:

1. El método cromatográfico puesto a punto, permite la separación y cuantificación de  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol así como de ergocalciferol y colecalciferol en alimentos líquidos. Los parámetros analíticos indican que es un método sensible, fiable, exacto y reproducible.
2. Los métodos TEAC, ORAC, DPPH, y fotoquiminoluminiscencia utilizados para cuantificar la capacidad antioxidante en las bebidas comerciales zumo-leche y mezcla de vegetales indican que son iguales en cuanto a precisión. Para las bebidas de vegetales sólo se observan correlaciones entre algunos métodos.
3. Existe una gran variabilidad en el contenido de compuestos bioactivos y capacidad antioxidante según la composición de las muestras comerciales analizadas y el fabricante. Hay que resaltar que en ninguna de las bebidas de vegetales comercializadas se detecta ácido ascórbico.
4. Al evaluar el efecto de los tratamientos por APH, PEAI y US sobre las bebidas de zumo de naranja y leche se comprueba que:
  - Al aplicar los diferentes tratamientos por APH el índice de pardeamiento presenta un aumento significativo en las condiciones más intensas (400 MPa/540s) y el índice de turbidez disminuye significativamente a presiones mayores de 200 MPa.
  - En cuanto al color, al aplicar APH los valores de  $a^*$  y  $b^*$  disminuyen a presiones superiores a 300 MPa/300s. La luminosidad ( $L^*$ ) disminuye con presiones de 200-400 MPa para todos los tiempos estudiados. Las diferencias totales de color

aumentan a medida que se aplican presiones y tiempos más intensos, pero son ligeramente superiores a 3 a 400 MPa/540s.

- La retención de ácido ascórbico es superior al 90% en todos los tratamientos por APH y PEAI. Al aplicar los US las pérdidas de ácido ascórbico están comprendidas entre el 2 y el 27%.
  - Se obtiene un aumento significativo en el contenido de carotenoides tras APH (100-400 MPa) durante 420 y 540s.
  - No se observan cambios en el contenido de compuestos fenólicos al aplicar APH ni PEAI. Se obtiene un aumento de compuestos fenólicos después del tratamiento por ultrasonidos hasta un 51% excepto para las amplitudes 116.2 $\mu\text{m}$  (300-600kJ/kg) y 135.0 $\mu\text{m}$  (100kJ/kg) en las que se observan pérdidas inferiores al 5%.
  - Se obtiene un aumento para los valores medios de capacidad antioxidante para TEAC y ORAC en las muestras tratadas a 200 MPa durante 120 y 420s y una disminución significativa al aplicar campos de 27 y 40 kV/cm con pérdidas del 2% al 17% y por ultrasonidos éstas pueden llegar al 26%.
  - Los cambios no son estadísticamente significativos en el contenido de vitamina D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> tras aplicar APH. Aumenta la actividad vitamínica E por un incremento en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol.
  - El contenido graso disminuye en todas las muestras tratadas por APH con un aumento significativo en el porcentaje de SFA a 100 y 200MPa. Se observa un pequeño aumento en el porcentaje de ácido oleico.
5. Al evaluar el efecto de los tratamientos por APH sobre las bebidas a base de vegetales obtiene que:

- Hay un aumento significativo del índice de pardeamiento, también de los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  aunque no se obtienen cambios notables en el color ( $\Delta E < 3$ ), excepto en dos tratamientos.
  - La disminución de la concentración del ácido ascórbico es inferior al 10% en todos los casos. Además hay un descenso en el contenido de carotenoides totales, compuestos fenólicos y en la capacidad antioxidante al aplicar los distintos tratamientos.
  - No existen cambios significativos en el contenido de vitamina  $D_2$  y  $D_3$ . Se obtiene una disminución del 19% en la actividad vitamínica E a presiones de 100 MPa y a presiones mayores un aumento que oscila entre 15% y 20%.
  - No se obtienen cambios significativos en el contenido graso aunque se observa un aumento en el porcentaje de MUFA a 400MPa debido al incremento en el porcentaje de ácido oleico.
6. Al evaluar el efecto de los tratamientos por APH en el zumo de arándanos has que destacar que:
- Se observa una disminución significativa en los valores de  $b^*$ . La luminosidad ( $L^*$ ) disminuye a presiones de 200-600MPa, para todos los tiempos estudiados. No se obtienen cambios visibles de color ( $\Delta E < 1.4$ ).
  - Los compuestos fenólicos no se modifican con la presión o el tiempo de tratamiento observándose una disminución del ácido ascórbico y de la capacidad antioxidante.
7. Se evalúa el efecto de las APH sobre los diferentes parámetros estudiados para analizar la posible influencia de la matriz (alimento) y sus características, destacando que en todos los casos los cambios encontrados en los parámetros fisicoquímicos, nutricionales y compuestos bioactivos dependen de la matriz alimentaria para cada

presión y tiempo de tratamiento. Los resultados ponen de manifiesto la necesidad de optimizar las condiciones del tratamiento cuando se cambia la matriz (alimento) o algún factor del procesado para valorar el impacto del mismo sobre su valor nutricional y especialmente en los parámetros de calidad.

8. Al estudiar la extracción de compuestos bioactivos en arándanos por diferentes tecnologías convencionales o emergentes se obtiene que el efecto de los ultrasonidos sobre los compuestos fenólicos, antocianinas totales y capacidad antioxidante es menos pronunciada si se evalúan todos los parámetros en conjunto, que para el tratamiento térmico, APH y PEAI.

## 5. CONCLUSIONS

The results obtained made possible to establish the following conclusions:

1. The chromatographic method allows the separation and quantification of  $\alpha$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ -tocopherol as well as cholecalciferol, ergocalciferol in liquid foods. Analytical parameters indicate that it is a sensitive, reliable, accurate and reproducible method.
2. TEAC, ORAC, DPPH, and photoquiminoluminescent methods used to quantify the antioxidant capacity of commercial beverages fruit juice-milk and vegetable mixture indicate that they are equal precision. For vegetable drinks are only observed correlations for some methods.
3. There is a great variability in bioactive compounds content and antioxidant capacity according to the composition of commercial samples and the manufacturer. It must be denoted that any marketed vegetables drinks detects ascorbic acid.
4. To assess the effect of HPP, PEF and US treatments on the orange juice and milk drinks verifies that:
  - After applying different HPP treatments browning index presents a significant increase in the most intensive conditions (400 MPa/540s) and turbidity index decreases significantly with pressures higher than 200 MPa.
  - Regarding to color,  $a^*$  and  $b^*$  values diminish with pressures higher than 300 MPa/300s. Lightness ( $L^*$ ) decreases with 200-400 MPa for all studied time pressures. Total color differences increase as apply pressure and times more intense, but they are slightly higher than 3 to 400 MPa/540s.

- Ascorbic acid retention is higher than 90% in all treatments by HPP and PEF. To implement the US losses of ascorbic acid fall from 2 to 27%.
  - A significant increase in carotenoid content after is obtained after HPP (100-400 MPa) 420 and 540s.
  - No changes in the content of phenolic compounds are noted to implement HPP or PEF. It is observed an increase in phenolic compounds after applying ultrasonics up 51% except for the amplitudes 116. 2 $\mu$ m (300-600kJ/kg) and 135.0 $\mu$ m (100kJ/kg) with less than 5% loss.
  - It is obtained an increase for the mean values of antioxidant capacity (TEAC and ORAC) in treated samples to 200 MPa for 120 and 420s and a significant decrease in applying fields from 27 to 40 kV/cm with loss of 2% to 17% and ultrasonic they can reach 26% losses.
  - The changes are not statistically significant content of vitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> after applying HPP. Increases the vitamin activity and an increase in  $\alpha$ -tocopherol content.
  - The fat content decreased in all samples with a significant increase in the percentage of SFA to 100 and 200MPa treated by HPP. It was observed a small increase in the percentage of oleic acid.
5. To assess the effect of treatments by HPP on vegetable drinks obtained that:
- There is a significant increase in the rate of browning index of the parameters to a\* and b\* but do not get noticeable changes in the color ( $\Delta < 3$ ), except in two treatments.

- The decrease in ascorbic acid concentration less than 10% in all cases. In addition there is a higher content of total carotenoids, phenolic compounds and antioxidant ability to apply different treatments.
  - There are no significant changes in the content of vitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>. It was observed a 19% decrease in the vitamin activity and 100 MPa pressure and higher pressures increased ranging from 15% to 20%.
  - There are no significant changes in the fat content while increasing the percentage of MUFA 400MPa due to an increase in the percentage of oleic acid.
6. To assess the effect of treatments by APH cranberry juice have to note that:
- There is a significant decrease in the values of b\*. The lightness (L\*) decreases to 200-600MPa pressures for ever studied. Do not get visible color changes ( $\Delta E < 1.4$ ).
  - Phenolic compounds are not modified with pressure or time treatment noting a drop, noting a reduction of ascorbic acid and antioxidant capacity.
7. After evaluating the effect of the HPP on different parameters studied to analyze the possible influence of the matrix (food) and their characteristics, emphasizing that in all cases the changes found in the parameters physicochemical, nutritional and bioactive compounds depending on food matrix for each pressure and treatment time. The results demonstrate the need to optimize treatment conditions when changing matrix (food) or some processing to assess the impact of it on their nutritional value and factor especially in quality.



8. After studying the extraction of bioactive compounds in blueberries for different conventional or emerging technologies it was obtained that the effects of ultrasound on phenolic, total anthocyanins and antioxidant capacity compounds is less pronounced than for heat treatment, HPP and PEF. When all parameters were evaluated together



## 6. BIBLIOGRAFÍA

---

### REFERENCES

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abram, F., Smelt, J.P.P.M., Bos, R., Wouters, P.C. (2003). Modelling and optimization of inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric field treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 571-579.
- Adekunte, A. O., Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Scannell, A. G. M., & O'Donnell, C. P. (2010). Effect of sonication on colour, ascorbic acid and yeast inactivation in tomato juice. *Food Chemistry*, 122(3), 500-507.
- Ade-Omowaye, BIO., Angersbach, A., Taiwo, K.A. and Knorr, D. (2001). Use of pulsed electric field pre-treatment to improve dehydration characteristics of plant based foods. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 285-295.
- Ade-Omowaye BIO, Rastogi N.K., Angersbach A. and Knorr D. (2003). Combined effects of pulsed electric field pre-treatment and partial osmotic dehydration on air drying behaviour of red bell pepper. *Journal of Food Engineering*, 60, 89-98.
- Aguilar-rosas, S.F., Ballinas-Casarrubias, M.L., Nevarez-Moorillon, G.V., Martín-Belloso, O., Ortega-Rivas, E. (2007). Thermal and pulsed electric fields pasteurization of apple juice: Effects on physicochemical properties and flavor compounds. *Journal of Food Engineering*, 83, 41-46.
- Aguiló-Aguayo, I., Odriozola-Serrano, I., Quintão-Teixeira, L. J., & Martín-Belloso, O. (2008a). Inactivation of tomato juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as affected by process conditions. *Food Chemistry*, 107(2), 949-955.
- Aguiló-Aguayo, I., Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Flavour retention and related enzyme activities during storage of strawberry juices processed by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Food Chemistry*, 116(1), 59-65.
- Aguiló-Aguayo, I., Montero-Calderón, M., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2010a). Changes on flavor compounds throughout cold storage of watermelon juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 43-49.
- Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2010b). Color and viscosity of watermelon juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 299-305.
- Andary, C y Mondolot-Cosson, L. (1997). Histolocalization of plant polyphenols in tissues and cell walls. Some applications. En: Polyphenols in foods. Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop, 1997 Aberdeen, Scotland. 41-44.

- Angersbach, A and Knorr, D. (1997). High intensity electric field pulses as pre-treatment for affecting dehydration characteristics and rehydration properties of potato cubes. *Nahrung*, 41, 194–200.
- Angersbach, A., Heinz, V., & Knorr, D. (1999). Electrophysical model of intact and processed plant tissues: cell disintegration criteria. *Biotechnology Progress* 15, 753-762.
- Angersbach, A., Heinz, V., Knorr, D. (2002). Evaluation of process-induced dimensional changes in the membrane structure of biological cells using impedance measurements. *Biotechnology Progress*, 18, 597–603.
- A.O.A.C. (1997) Official methods of analysis (17<sup>th</sup> edition) Association of Official Analytical Chemists, Washington.
- Aparicio, P., Farre, P. R., & Frigola, A. (1992). Determinación del ácido ascórbico en vegetales por polarografía diferencial de impulsos. *Anales de bromatología*, 44(4), 257-261.
- Ardia. (2004). *Process Considerations on the Application of High Pressure Treatment at Elevated Temperature Levels for Food Preservation*; Department of Food Biotechnology and Food Process Engineering, Berlin University of Technology, Berlin.
- 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.
- Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73, 239-244.
- 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.
- Ball G.F.M. (1996). Determination of the fat-soluble vitamins in foods by high performance liquid chromatography. In: Nollet M.L. and Dekker M. (eds), *Handbook of Food Analysis*. New York: Leo Pub. pp. 601-647.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frigola, A. (2010). Ascorbic Acid Is the Only Bioactive That Is Better Preserved by High Hydrostatic Pressure than by Thermal Treatment of a Vegetable Beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10070-10075.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Pothakamury, U.R., Palou, E., Swanson, B.G. (1998). En: *Nonthermal preservation of foods*. Marcel Dekker, Inc.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Gongora-Nieto, M. M., Pothakamury, U. R., Swanson, B. G. (1999). Preservation of foods with pulsed electric fields. 1-9, 76-107, 108-155. Academic Press Ltd. London.

## Bibliografía

---

- Barbosa-Cánovas, G.V., Sepúlveda, D. (2005). Present status and the future of PEF technology. En: Barbosa-Cánovas, G.V., Tapia, M.S., Cano, M.C. *Novel Food Processing Technologies*. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp. 1-44.
- Barbosa-Cánovas, G.V. and P. Juliano. (2008). Food Sterilization by combining High Pressure and Thermal Energy. In: *Food Engineering: Integrated Approaches*, G.F. Gutiérrez-López, G.V. Barbosa-Cánovas, J. Welti-Chanes, E. Parada Arias, pp. 9-46. New York: Springer.
- Baron, A., Dénes, J., & Durier, C. (2006). High-pressure treatment of cloudy apple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 39(9), 1005-1013.
- Barsotti, L., & Cheftel, J. C. (1998). Traitement des aliments par champs électriques pulses. *Science des Aliments*, 18, 584-601.
- Baxter, I. A., Easton, K., Schneebeli, K., & Whitfield, F. B. (2005). High pressure processing of Australian navel orange juices: Sensory analysis and volatile flavor profiling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 372-387.
- Bazhal, M., & Vorobiev, E. (2000). Electrical treatment of apple cosettes for intensifying juice pressing. *Journal of Science and Food Agriculture*, 80, 1668-1674.
- Belitz y Grosch. *Química de los alimentos*. Ed. Acribia España: Zaragoza., 1988.
- 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.
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson, R., and Barbosa-Canovas, G.V. (2008). Microstructure of fat globules in whole milk after thermosonication treatment. *Journal of Food Science*, 73, 325-332.
- Besco, E., Braccioli, E., Vertuani, S., Ziosi, P., Brazzo, F., Bruni, R., Sacchetti, G., Manfredini, S. (2007). The use of photochemiluminescence for the measurement of the integral antioxidant capacity of baobab products. *Food Chemistry*, 102, 1352-1356.
- Bignon, J. (1996). Cold pasteurizers hyperbar for the stabilization of fresh fruit juices. *Fruit Processing*, 2, 46-48.
- Bosiljkov, T., Brnčić, M., Tripalo, B., Karlović, S., Ukrainczyk, M., Ježek, D., Rimac-Brnčić, S. (2009). Impact of ultrasound-enhanced homogenization on physical properties of soybean milk. In: *Chemical Engineering Transactions - volume 17, Proceedings of the 9th International Conference on Chemical and Process Engineering*. Rim, Italia.
- Braddock, R.J. (1999). Single strength orange juices and concentrate. In R. J. Braddock, *Handbook of Citrus By-Products and Processing Technology* (pp. 53-83). New York: Wiley.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E. Berset C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 28, 25-30.
- Bravo, L. (1998). Polyphenol: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, 56 (11), 317-333.
- Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G.V. and Martín, O. (2003). Reduction of protease activity in milk by continuous flow high-intensity pulsed electric field treatments. *Journal of Dairy Science*, 86, 697-703.
- Brandolini, V., Menziani, E., Zanotti, F., Bader, S., and Guarneri, M. (1998). Capillary electrophoresis as analytical method for active ingredient determination in cosmetic matrices. *International Journal of Cosmetic Science* 20, 69-72.
- Buffa, M., Guamis, B., Pavia, M., & Trujillo, A. J. (2001). Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *International Dairy Journal*, 11(3), 175-179.
- 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.
- 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.
- Bushnell, A.H., Dunn, J.E., Clark, R.W and Pearlman, J.S. (1993). High Pulsed Voltage Systems for Extending the Shelf Life of Pumpable Food Products. US Patent 5, 235, 905.
- Butler, L.G. (1992). Protein polyphenol interactions: nutritional aspects. En: Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenol, Volume 16, Part 11, 11-18.
- Butterfield D., Castegna A., Pocernich C., Drake J., Scapagnini G. and Calabrese V. (2002). Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 13, 444-461.
- Butz, P., Koller, W.D., Tauscher, B. & Wolf, S. (1994). Ultra-High Pressure Processing of Onions: Chemical and Sensory Changes. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 27(5), 463-467.
- Butz, P. and Tauscher, B. (2002). Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International*, 35, 279-284.

## Bibliografía

---

- Canadean Wisdom Annual Series. (2008). Available at [http:// www.aijn.org](http://www.aijn.org). Accessed October 21, 2008.
- Cantuti-Castelvetri, I., Shukitt-Hale, B., & Joseph, J. A. (2000). Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(4-5), 367-381.
- 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.
- Carr, A. C., Frei, B. (1999). Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69, 1086-1107.
- CFSAN-FDA (Center for FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION) *Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies*; Food and Drug Administration, U.S.; 2000.
- Chalermchat, Y., and Dejmek, P. (2005). Effect of pulsed electric field pretreatment on solid-liquid expression from potato tissue, *Journal of Food Engineering*, 71, 164-169.
- Chambers, L.A. (1937). Sonic homogenization of milk and ice cream mixes. *Journal of Dairy Science*, 20, 450-451.
- Chen, F., Sun, Y., Zhao, G., Liao, X., Hu, X., Wu, J., & Wang, Z. (2007). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanins in extract using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Ultrasonics sonochemistry*, 14(6), 767-778.
- Cheng, L. H., Soh, C. Y., Liew, S. C., & Teh, F. F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, 104(4), 1396-1401.
- Cho, M.J., Howard, L.R., Prior, R.L., and Clark, J.R. (2005). Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry, *Journal of the Science Food and Agriculture*, 85, 2149-2158.
- Clifford, M.N. Sensory and dietary properties of phenols. En: Proceedings of the 16th International Conference of Grape Polyphenols, Volume 16, Part 11, 18-23.
- Cook, R. Globalization and fresh produce marketing; challenges and opportunities. University of California, Davis. July, 2003. Mintel. Beverages, Vol. II, The Marketplace – US– July, 2002.



- Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 85-91.
- Cortes, C., Esteve, M. J., Frigola, A., & Torregrosa, F. (2005). Quality characteristics of horchata (a Spanish vegetable beverage) treated with pulsed electric fields during shelf-life. *Food Chemistry*, 91(2), 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*, 44(11), 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.
- Cserhalmi, Z., Sass-Kiss, Á., Tóth-Markus, M., & Lechner, N. (2006). Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 7(1-2), 49-54.
- Dai, Q., Borenstein, A. R., Wu, Y., Jackson, J. C., Larson, E. B. (2006). Fruit and vegetable juices and Alzheimer's disease: the Kame project. *American Journal of Medicine*, 119, 751-759.
- Daoudi, L., Quevedo, J. M., Trujillo, A. J., Capdevila, F., Bartra, E., Mínguez, S., & Guamis, B. (2002). Effects of High-Pressure Treatment on the Sensory Quality of White Grape Juice. *High Pressure Research: An International Journal*, 22(3), 705.
- Daoudi, L. (2004). Efecto de las altas presiones hidrostáticas sobre el gazpacho y el zumo de uva. Tesis doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.
- Davey, M.W., van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M., Kanellis, A., Smirnoff, N. (2000). Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science Food and Agriculture*, 80, 825-860.
- De Ancos, B., González, E. & Cano, M.P. (2000). Effect of High-Pressure Treatment on the Carotenoid Composition and the Radical Scavenging Activity of Persimmon Fruit Purees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3542-3548.
- De Ancos, B., Sgroppo, S., Plaza, L., & Cano, M. P. (2002). Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. *Journal of the Science and Food and Agriculture*, 82(8), 790-796.
- Deeth, H. C.; Fitz-Gerald, C. H. (2006). Lipolytic Enzymes and Hydrolytic Rancidity. In *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2: Lipids*, 3rd ed.; Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Eds.; Springer: New York, pp 481-554.

## Bibliografía

---

- Deliza, R., Rosenthal, A., Abadio, F. B. D., Silva, C. H. O., & Castillo, C. (2005). Application of high pressure technology in the fruit juice processing: benefits perceived by consumers. *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 241-246.
- Del Pozo-Insfran, D., Del Follo-Martínez, A., Talcott, S.T., Brenes, C.H. 2007. Stability of copigmented anthocyanins and ascorbic acid in muscadine grape juice processed by high hydrostatic pressure. *Journal of Food Science*, 72, 247-253.
- Desobry-Banon, S., Richard, F., Hardy, J. (1994). Study of acid and rennet coagulation of high pressurized milk. *Journal of Dairy Science*, 77, 3267-3274.
- Dillon, S.A., Burmi, R.S., Lowe, G.M., Billington, D., Rahman, K. (2003). Antioxidant properties of aged garlic extracts: an in vitro study incorporating human low density lipoprotein. *Life Science*, 72, 1583-1594.
- Donsì, G., Ferrari, G., & Di Matteo, M. (1996). High pressure stabilization of orange juice: Evaluation of the effects of process conditions. *Italian Journal of Food Science*, 8(2), 99-106.
- Dr Lange (1999) Fundamentals of colorimetry – Application Report No. 10e.
- Dunn, J. E. and Pearlman, J. S. (1987). Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. Maxwell Laboratories, Inc. U. S. Patent 4, 695, 472.
- Elez-Martínez, P., Escolà-Hernández, J., Espachs-Barroso, A., Barbosa-Cánovas, G. V., Martín-Belloso, O. (2005). Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high intensity pulsed electric fields. *Food Microbiology*, 22 (4) 311-319.
- Elez-Martínez, P., Soliva-Fortuny, R. C., & Martín-Belloso, O. (2006). Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatments. *European Food Research and Technology*, 222(3-4), 321-329.
- Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O. (2007). Effects of high intensity pulsed electric fields processing conditions on Vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chemistry*, 102, 201-209.
- Ertugay, M.F., Sengul, M and Sengul, M. (2004). Effect of ultrasound treatment on milk homogenisation and particle size distribution of fat, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(2), 303-308.
- Escrivá, A., Esteve, M.J., Farré, R., Frígola, A. (2002). Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 947, 313-318.
- Esteve, M.J., & Frígola, A. (2008). The Effects of Thermal and Non-thermal Processing on Vitamin C, Carotenoids, Phenolic Compounds and Total Antioxidant Capacity in Orange Juice. In N. Benkeblia & P. Tennant (Eds.), *Citrus I. Tree and Foresting Science and Biotechnology*, 2 (Special Issue 1), 128-134.

- Esteve, M.J., Palop, S., Barba, F.J., & Frígola, A. (2009). The Effects of Non-thermal Processing on Carotenoids in Orange Juice. *Czech Journal of Food Science*, 27, 304-306.
- Eshtiaghi, M. N., & Knorr, D. (1999). Method for treating sugar beet. International Patent. Patent Nr. WO 99/6434.
- Eshtiaghi, M. N., & Knorr, D. (2000b). Anwendung elektrischer Hochspannungsimpulse zum Zellaufschluß bei der Saftgewinnung am Beispiel von Apfel. *Lebensmittel- und Verpackungstechnik*.
- Evrendilek, G.A., Jin, Z.T., Ruhlman, K.T., Qiu, X., Zhang, Q.H., Richter, E.R. (2000). Microbial safety and shelf-life of an apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 77-86.
- Evrendilek, G.A., Dantzer, W.R., Streaker, C.B., Ratanatriwong, P., and Zhang, Q.H. (2001). Shelf-life evaluations of liquid foods treated by pilot plant pulsed electric field system, *Journal of Food Processing and Preservation*, 25, 283-297.
- Federal Register. (1997). Part V, Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, vol. 62, No 96, p.27463.
- Fernández-García, A., Butz, P., & Tauscher, B. (2000). Does the antioxidant potential of high pressure treated apple juice change during storage. *High Pressure Research*, 19, 543-550.
- Fernández García, A., Butz, P., Bognàr, A., & Tauscher, B. (2001). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research and Technology*, 213(4), 290-296.
- Fernandez, D. P., Goodwin, A. R. H., Lemmon, E.W., Levelt-Sengers, J. M. H., & Williams, R. C. (1997). A formulation for the static permittivity of water and steam at temperature from 238K to 873 K at pressures up to 1200 MPa, including derivatives and Debye-Hückel coefficients. *Journal of Physical Chemistry*, 26(4), 1125-1166.
- Ferrari, G., Maresca, P., Ciccarone, R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: Pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100, 245-253.
- Fincan, M., De Vito, F., and Dejmek, P. (2004) Pulsed electric field treatment for solid-liquid extraction of red beetroot pigment *Journal of Food Engineering*, 64, 381-388.
- Flaumenbaum, B. L. (1968). Anwendung von Elektropasmolyse bei der Herstellung von Fruchtsäfte. *Flüss.Obst*, 35, 19-20.
- 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.

## Bibliografía

---

- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497–509.
- Frankel, E. N., & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of Science Food and Agriculture*, 80, 1925–1941.
- García-Amezquita, L. E., Primo-Mora, A. R., Barbosa-Cánovas, G. V., & Sepúlveda, D.R. (2009). Effect of nonthermal technologies on the native size distribution of fat globules in bovine cheese-making milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 491–494.
- García-Risco, M.R., Olano, A., Ramos, M., Lopez-Fadino, R. (2000). Micellar changes induced by high pressure. Influence in the proteolytic activity and organoleptic properties of milk. *Journal of Dairy Science*, 83, 2184–2189.
- 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.
- Gaziano, J.M., Glynn, R.J., Christen, W.G., Kurth, T., Belanger, C., MacFadyen, J., Bubes, V., Manson, J.E., Sesso, H.D., Buring, J.E. (2009). Vitamins E and C in the prevention of prostate and total cancer in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*, 301(1)-52-62.
- Gervilla, R., Felipe, X., Ferragut, V., Guamis, B. (1997). Effect of High Hydrostatic Pressure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* Strains in Ovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 80, 2297-2303.
- Gervilla, R., Ferragut, V., & Guamis, B. (2001). High Hydrostatic Pressure Effects on Color and Milk-Fat Globule of Ewe's Milk. *Journal of Food Science*, 66(6), 880-885.
- Gervilla, R., Ferragut, V., & Guamis, B. (2006). High hydrostatic pressure effects on color and milk-fat globule of ewe's milk. *Journal of Food Science*, 66(6), 880-885.
- Geulen, M., Teichgreber, P., & Knorr, D. (1994). Zellaufschluß durch elektrische Hochspannungsimpulse. *ZFL*, 45(7/8), 24–27.
- Gongora-Nieto M.M., Pedrow P.D., Swanson B.G., Barbosa-Canovas G.V. (2003). Energy analysis of liquid whole egg pasteurised by pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 57, 209-216.
- Goodner, J. K., Braddock, R. J., Parish, M. E., & Sims, C. A. (1999). Cloud Stabilization of Orange Juice by High Pressure Processing. *Journal of Food Science*, 64(4), 699-700.

- 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.
- Guderjan, M., Elez-Martinez, P., and Knorr, D. (2007). Application of pulsed electric fields at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 55-62.
- Guil-Guerrero, J. L., & Reboloso-Fuentes, M. M. (2009). Nutrient composition and antioxidant activity of eight tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2), 123-129.
- Han, X., Shen, T., & Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9), 950-988.
- Hamrick, I., Counts, S.H. (2008). Vitamin and mineral supplements. *Wellness and Prevention*. 35(4)-729-747.
- Heinz, V., Buckow, R. (2009). Food preservation by high pressure. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 5, 73-81.
- Hemeda, H.M and Klein, B.P. (1990). Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *Journal of Food Science*, 55(1), 184-186.
- Harrison, K. and Were, L.M. (2007). Effect of gamma irradiation on total phenolic content yield and antioxidant capacity of almond skin extracts. *Food Chemistry*, 102, 932-937.
- Hayes M. G., Kelly A. L. (2003). High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globule size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70, 297.
- Heremans K. (2002). High pressure bioscience and biotechnology: A century and a decade perspective. In: Hayashi R, editor. *Trend in high pressure bioscience and biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science. p 1-6.
- Herrera, M. C., & Luque de Castro, M. D. (2005). Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection. *Journal of Chromatography A*, 1100(1), 1-7.
- Herrero, A.M., Romero de Avila, M.D. (2006). Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Revista de Medicina Universidad de Navarra*, 50(4), 71-74.
- Hite, B. (1899). The effect of pressure in the preservation of milk, *Bulletin-W. Va. Univ., Agric. Exp. Stn.* 58, 15-35.
- Ho, S.I., Mittal, G.H., Cross, J.D., Griffiths, M.W. (1995). Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by high voltage electric pulses. *Journal of Food Science*, 60, 1337-1343.

## Bibliografía

---

- Hoffer, L.J., Levine, M., Assouline, S., Melnychuk, D., Padayatty, S.J., Rosadiuk, K., Rousseau, C., Robitaille, L., and Miller Jr, W.H. (2008). Phase I clinical trial of i.v ascorbic acid in advanced malignancy. *Ann Oncol*, 19(11)-1969-74.
- Hodgins, A., Mittal, G., & Griffiths, M. (2002). Pasteurization of fresh orange juice using low-energy pulsed electrical field. *Journal of Food Science*, 67, 2294-2299.
- Hsu, K. (2008). Evaluation of processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 450-459.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2003). High pressure-induced changes in the creaming properties of bovine milk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 4(4), 349-359.
- Huppertz, T., Fox, P. F., & Kelly, A. L. (2004). High pressure treatment of bovine milk: effects on casein micelles and whey proteins. *Journal of Dairy Research*, 71(01), 97.
- Huppertz, T., Fox, P. F., de Kruif, K. G., & Kelly, A. L. (2006). High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1764(3), 593-598.
- Indrawati, Arroqui, C., Messagie, I., Nguyen, M. T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2004). Comparative study on pressure and temperature stability of 5-methyltetrahydrofolic acid in model systems and in food products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 485-492.
- Institute of Medicine Food and Nutrition Board, (2000). "Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc". The National Academies Press. Washington D. C.
- Irwe S & Olson I (1994) Reduction of pectinase activity in orange juice by high-pressure treatment. In R. P. Sing & F. A. R. Oliveira, *Minimal processing of foods and process optimization*, (pp. 35-42). Florida, USA: CRC Press.
- Jeffery, E.H., Brown, A.F., Kurilich, A.C., Keck, A.S., Matusheski, N., Klein, B.P., Juvik, J.A. (2003). Variation in content of bioactive components in broccoli. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 323-330.
- Jerman, T., Trebše, P., & Mozetič Vodopivec, B. (2010). Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry*, 123(1), 175-182.
- Jeyamkondan, S., Jayas, D. S. and Holley, R. A. (1999). Pulsed electric field processing of foods: a review. *Journal of Food Protection*, 62(9), 1088-1096.

- Jia, M., Zhang, Q. H., & Min, D. B. (1999). Pulsed electric field processing effects on flavor compounds and microorganisms of orange juice. *Food Chemistry*, 65, 445-451.
- Ju, Z.Y., and Howard, L.R. (2003). Effects of solvent a temperature on pressurized liquid extraction of anthocyanins and total phenolics from dried red grape skin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51(18), 5207-5213.
- Ju, Z.Y., and Howard, L.R. (2005). Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin. *Journal of Food Science*, 70(4), 270-276.
- Kader, A. (2001). Importance of fruits, nuts, and vegetables in human nutrition and health. *Persishable handling quarterly*, issue No 106, 4-6.
- Kammerer, D., Kljusuric, J.G., Carle, R., and Schieber, A. (2005). Recovery of anthocyanins from grape pomace extracts (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Mitos) using a polymeric adsorber resin, *European Food Research*, 220(3-4), 431-437.
- Khan, M. K., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A., Dangles, O., & Chemat, F. (2010). Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Food Chemistry*, 119(2), 851-858.
- Kim, H. Y., Kim, S. H., Choi, M. J., Min, S. G., & Kwak, H. S. (2008). The Effect of High Pressure-Low Temperature Treatment on Physicochemical Properties in Milk. *Journal of dairy science*, 91(11), 4176-4182.
- Kim, J., Kim, D. N., Lee, S. H., Yoo, S., & Lee, S. (2010). Correlation of fatty acid composition of vegetable oils with rheological behaviour and oil uptake. *Food Chemistry*, 118(2), 398-402.
- Knorr, D. (1994). Plant cell and tissue cultures as model systems for monitoring the impact of unit operations on plant foods. *Trends in Food Science & Technology*, 5(10), 328-331.
- Knorr, D. (1999). Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(5), 485-491.
- Knorr, D., Ade-Omowaye, B.I.O., and Heinz, V. (2002). Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing, *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(22), 311-318.
- Knorr, D. (2003). Impact of non-thermal processing on plant metabolites. *Journal of Food Engineering*, 56(2-3), 131-134.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V., & Lee, D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5), 261-266.
- Knorr, D., Heinz, V., Buckow, R. (2006). High pressure application for food biopolymers. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1764, 619-631.

## Bibliografía

---

- Körmendy I, Körmendy L, Ferenczy A (1998) Thermal inactivation kinetics of mixed microbial populations. A hypothesis paper. *Journal of Food Engineering*, 38, 439–453
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonamone, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, 113, 71-88.
- Krop, J.J.P. y Pilnik, W. (1974). Effect of pectic acid and bivalent cations on cloud loss of citrus juices. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 7, 62-63.
- Lebovka, N. I., Shynkaryk, M. V., El-Belghiti, K., Benjelloun, H., & Vorobiev, E. (2007) Plasmolysis of sugarbeet: Pulsed electric fields and thermal treatment. *Journal of Food Engineering*, 80 (2), 639–644.
- Lee, H. S. y Castle, W. S. (2001). Seasonal changes of carotenoid pigments and color in Hamlin, Earlygold, and Budd blood orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 877–882.
- Lee S.K. y Kader, A.A. (2000). Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. Postharvest. *Biology Technology*, 20-207-220.
- Li, H., Ohdaira, E., and Ide, M. (1995). Enhancement in diffusion of electrolyte through membrane using ultrasonic dialysis equipment with plane membrane, *Japanese Journal of Applied Physics*, 34, 2725–2729.
- Li, S.Q., Zhang, Q.H., Lee, Y.Z., Pham, T.V. (2003). Effects of pulsed electric fields and thermal processing on the stability of bovine immunoglobulin G (IgG) in enriched soymilk. *Journal of Food Science*, 68, 1201-1207.
- López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Ríos-Vázquez, N.J. (2006). *Journal of Chromatogr A*, 1105, 135-139.
- Lopez-Fandino, R., Carrascosa, A.V., Olano, A. (1996). The effects of high pressure on whey protein denaturation and cheese-making properties of raw milk. *Journal of Dairy Science*, 79, 929–936.
- Lopez-Fandino, R., Olano, A. (1998). Effects of high pressures combined with moderate temperatures on the rennet coagulation properties of milk. *International Dairy Journal*, 8, 623–627.
- MacEvily A.J., Iyenger, R. y Gross, A.T. (1992). Inhibition of polyphenols oxidase by phenolics compounds. En: *Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I: Analysis, Occurrence and Chemistry*, Ho, C.T., Lee, C.T. y Huang, M.T. Eds., ACS Symposium Series 506. American Chemical Society, Washington, DC, 318-321.
- Manglano, P. (1999). Estudio de la fracción lipídica de fórmulas para lactantes: compuestos e indicadores de oxidación. *Tesis de Licenciatura*. Valencia.



- Mañas, P., & Vercet, A. (2006). Effect of Pulsed Electric Fields on Enzymes and Food Constituents. In J. Raso & H. Heinz (Eds.), Pulsed electric field technology for the food industry. Fundamentals and applications (pp. 131–153). New York, USA: Springer.
- Martín, O., Zhang, Q., Castro, A.J., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. (1994). Revisión: Empleo de pulsos eléctricos de alto voltaje para la conservación de alimentos. Microbiología e ingeniería de proceso. *Revista de Ciencia y Tecnología de los Alimentos*, 1, 34, 1-34.
- Martínez, F.E., Desai, I.D., Davidson, A.G.F., Nakai, S and Radcliffe, A. (1987). Ultrasonic homogenization of expressed human milk to prevent fat loss during tube feeding. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 6, 593–597.
- Mason, T.J., and Zhao, Y. (1994). Enhancement of ultrasonic cavitation yield by multi-frequency sonication, *Ultrasonics Sonochemistry*, 29(5), 567–582.
- Mason, T.J., Riera, E., Vercet, A., Lopez-Bueza, P. (2005). Application of ultrasound, in: Da-Wen Sun (Ed.), Emerging Technologies for Food Processing, Elsevier Ltd., Cambridge, MA, pp. 323–351.
- Mason, J.B. (2007). Vitamins, trace minerals, and other micronutrients. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; chap 237.
- Mastwijk, H. (2006). Pulsed power systems for application of pulsed electric fields in the food industry. In J. Raso & H. Heinz (Eds.), Pulsed electric field technology for the food industry. Fundamentals and applications (pp. 223–239). New York, USA: Springer.
- Matsumoto, Y., Satake, T., Shioji, N. and Sakuma, A. (1991). Inactivation of microorganisms by pulsed high voltage applications. Conference Record of IEEE Industrial Applications Society Annual Meeting. 652-659.
- Mazza, G., Fukumoto, L., Delaquis, P., Girard, B., & Ewert, B. (1999). Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(10), 4009-4017.
- McClements, D.J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 293- 299.
- McRae, M.P. (2008). Vitamin C supplementation lowers serum low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides: a meta-analysis of 13 randomized controlled trials. *Journal of Chiropractic Medicine*, 7, 48-58.
- Meydav, S., Saguy, I. y Kopelman, I.J. (1977). Browning determination in citrus products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25, 602-604.
- Michalac, S. L., V. B. Álvarez, and Q. H. Zhang. (1999). Microbial reduction in skim milk using PEAC technology. Page 209 in IFT Annual Meeting, Book of Abstracts, Institute of Food Technologists, Chicago, Illinois, USA.

## Bibliografía

---

- 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.
- Min, S., Jin, Z.T., Min, S.K., Yeom, H., Zhang, Q.H. (2003a). Commercial-scale pulsed electric field processing on orange juice. *Journal of Food Science*, 68, 1265-1271.
- Min, S., Zhang, Q.H. (2003b). Effects of commercial-scale pulsed electric fields processing on flavor and color of tomato juice. *Journal of Food Science*, 68, 1600-1606.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM). (2008). Análisis de consumo alimentario.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), Secretaría General Técnica (2003) Spain total citric transformation, 2002–2003 campaign.
- Ministerio de Agricultural, Pesca y Alimentación (MAPA). (2007). Análisis de consumo alimentario.
- Mizuno, A. and Hori, Y. (1991). Destruction of living cells by pulsed high-voltage application. *IEEE Trans Ind Appl*. 24(3):387-394.
- Moltó-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2011). Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chemistry*, 124(3), 697-702.
- Morales-de la Peña, M., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2010). Impact of high intensity pulsed electric field on antioxidant properties and quality parameters of a fruit juice–soymilk beverage in chilled storage. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 872-881.
- Mullen, W., Marks, S.C., and Crozier, A. (2007). Evaluation of Phenolic Compounds in Commercial Fruit Juices and Fruit Drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3148-3157.
- Norton, T., & Sun, D. (2008). Recent Advances in the Use of High Pressure as an Effective Processing Technique in the Food Industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), 2-34.
- 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 treatments. *Journal of Dairy Science*, 89, 905-911.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Gimeno-Añó, V., & Martín-Belloso, O. (2008). Modeling changes in health-related compounds of tomato juice treated by high-intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 210-216.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Hernández-Jover, T., & Martín-Belloso, O. (2009). Carotenoid and phenolic profile of tomato juices processed by high

- intensity pulsed electric fields compared with conventional thermal treatments. *Food Chemistry*, 112(1), 258-266.
- Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Impact of high-intensity pulsed electric fields variables on vitamin C, anthocyanins and antioxidant capacity of strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 42(1), 93-100.
- Oey, I., Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 300-308.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Effects of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene, vitamin C and antioxidant capacity of watermelon juice. *Food Chemistry*, 115(4), 1312-1319.
- Ortega-Rivas, E., Zárate-Rodríguez, E., & Barbosa-Cánovas, G. V. (1998). Apple Juice Pasteurization Using Ultrafiltration and Pulsed Electric Fields. *Food and Bioprocess Processing*, 76(4), 193-198.
- Ou B., Hampsch-Woodill M., Prior RL. (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(10), 4619-26.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122-3128.
- Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q., Singal, P.K. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radical Biological Medicine*, 26:746-61.
- Parish, M.E. (1998). High pressure inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*, endogenous microflora and pectinmethylesterase in orange juice. *Journal of Food Safety*, 18(1), 57-65.
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S. L. S., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (2009). Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International journal of food microbiology*, 136(1), 26-31.
- Pereda J., Ferragut V., Quevedo J. M., Guamis B., Trujillo A. J. (2008). Effects of Ultra-High-Pressure Homogenization Treatment on the Lipolysis and Lipid Oxidation of Milk during Refrigerated Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7125-7130.
- Pereira, R. N., & Vicente, A. A. (2010). Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. *Food Research International*, 43(7), 1936-1943.

## Bibliografía

---

- Perera, N., Gamage, T. V., Wakeling, L., Gamlath, G. G. S., & Versteeg, C. (2010). Colour and texture of apples high pressure processed in pineapple juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 39-46.
- 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.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., and Nunez, M. (2003). Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ration on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(6), 2111-2117.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. (2005). A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol, and grape extract cases. *European Food Research*, 221(3-4), 284-290.
- Pinilla, M.J., Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., & Cano, P. (2005). Hydrophilic and lipophilic antioxidant capacities of comercial mediterranean vegetable soups (Gazpachos). *Journal of Food Science*, 70, 61-65.
- Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., Elez-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(1), 21-29.
- Ponce, A.G., del Valle, C.E., Roura, S.I. (2004). Natural essentials oils as reduction agents of peroxidase activity of leafy vegetables extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 37, 199-204.
- Popov I., Lewin G. (1999). Oxidants and Antioxidants Part B – Antioxidative homeostasis: characterization by means of chemiluminescent technique. *Methods in Enzymology*, 300, 437-456.
- Porretta, S., Birzi, A., Ghizzoni, C., & Vicini, E. (1995). Effects of ultra-high hydrostatic pressure treatments on the quality of tomato juice. *Food Chemistry*, 52(1), 35-41.
- Prior, L. P., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements. *Agricultural Food Chemistry*, 76,245-256.
- 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.

- Pszczola, D.E. (2005). Ingredients. Making fortification functional. *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.
- Qin, B. L., Chang, F. J., Barbosa-Cánovas, G. V., Swanson, B. G. (1995a). Non thermal inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in apple juice using pulsed electric fields. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 564-568.
- Qin, B., Pothakamury, U. R., Vega, H., Martin, O., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. (1995b). Food pasteurization using high intensity pulsed electric fields. *Journal of Food Technology*, 49(12):55-60.
- Qin, B., Pothakamury, U., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B. (1996). Nonthermal pasteurization of liquid foods using high-intensity pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 36(6), 603–627.
- Qiu, X., Sharma, S., Tuhela, L., Jia, M., Zhang, Q. (1998). An integrated PEAC pilot plant for continuous nonthermal pasteurization of fresh orange juice. *Agricultural Engineering*, 41, 1069-1074.
- Ramaswamy, H.S. and Chen, C.R. (2002). Maximising the quality of thermally processed fruits and vegetables in “Fruit and vegetable: Processing-Improving quality”, pp. 188-214. Ed. Jongen, W., Woodhead Publishing, London, UK.
- 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.
- Rao, A.V., Honglei, S. (2002). Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 22(10), 1125-1131.
- Raso, J., Álvarez, I., Condón, S. and Sala-Trepat, F.J. (2000). Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, 21-29.
- Raso, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2003). Nonthermal Preservation of Foods Using Combined Processing Techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(3), 265-285.
- Rastogi, N.K., Eshtiaghi, M.N., Knorr, D. (1999). Accelerated mass transfer during osmotic dehydration of high intensity electrical field pulse pretreated carrots. *Journal of Food Science*, 64(6), 1020–1023.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and Challenges in High Pressure Processing of Foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, 47(1), 69.

## Bibliografía

---

- Rawson, A., Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Brennan, C., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. *Food Research International*, In Press, Corrected Proof.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Regnault, S., Thiebaud, M., Dumay, E., & Cheftel, J. C. (2004). Pressurisation of raw skim milk and of a dispersion of phosphocaseinate at 9°C or 20°C: effects on casein micelle size distribution. *International Dairy Journal*, 14(1), 55-68.
- Revilla, E., Ryan, J.M., and Martin-Ortega, G. (1998). Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46(11), 4592-4597.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. (1996). Antioxidant activities of flavonoids as bioactive food components. *Biochemical Society Transactions*, 24, 790-800.
- Riener, J., Noci, F., - Cronin, D. A., Morgan, D. J., & Lyng, J. G. (2009). Effect of high intensity pulsed electric fields on enzymes and vitamins in bovine raw milk. - *International Journal of Dairy Technology*, 62(1), 1-6.
- Ritter, E. D.; Purcell, A. E. (1981). Carotenoid analytical methods. In *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*; Bauernfeind, J. C., Ed.; Academic Press: New York, pp. 815-923.
- 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(10), 1163-1170.
- Rivas, A., Rodrigo, D., Company, B., Sampedro, F., & Rodrigo, M. (2007). Effects of pulsed electric fields on water-soluble vitamins and ACE inhibitory peptides added to a mixed orange juice and milk beverage. *Food Chemistry*, 104(4), 1550-1559.
- Rizvi, A.F., Tong, C.H. (1997). Fractional conversion for determining texture degradation kinetics of vegetables. *Journal of Food Science*, 62, 1-7.
- Rodrigo, D., Ruíz, P., Barbosa-Cánovas, G.V., Martínez, A., Rodrigo, M. (2003). Kinetic model for the inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 223-229.
- Rodrigo, D., van Loey, A., & Hendrickx, M. (2007). Combined thermal and high pressure colour degradation of tomato puree and strawberry juice. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 553-560.
- Rodrigues, S., & Pinto, G. A. S. (2007). Ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 869-872.

- Rodríguez-Alcalá L. M., Harte F., Fontecha J. (2009). Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high pressure homogenization *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10, 32-36.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A.I., López-Sabater, M.C. (2006). Determination of  $\gamma$ - and  $\alpha$ -tocopherols in human milk by a direct high performance liquid chromatographic method with UV-vis detection and comparison with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1114, 132-137.
- Ross, A. I. V., Griffiths, M. W., Mittal, G. S., & Deeth, H. C. (2003). Combining non-thermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 89(2-3), 125-138.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2007). Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 265-272.
- Rückemann, H. (1980). Methoden zur Bestimmung Vonl-Ascorbinsäure mittels Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC). *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*, 171, 357-359.
- Ruxton, C. H. S., Gardner, E. J., Walker, D. (2006). Can pure fruit and vegetable juices protect against cancer and cardiovascular disease too? A review of the evidence. *Int. Journal of Food Science and Nutrition*, 57, 249-272.
- Salleh-Mack, S.Z., and Roberts, J.S. (2007). Ultrasound pasteurization: the effects of temperature, soluble solids, organic acids and pH on the inactivation of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Ultrasonics Sonochemistry*, 14, 323-329.
- 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. *Analytica Chimica Acta*, 593, 103-107.
- Sampedro F, Rodrigo M, Martínez A, Rodrigo D, Barbosa-Cánovas G.V. (2005). Quality and safety aspects of PEF application in milk and milk products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 25-47.
- 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 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 beverage: Effect of process parameters. *Journal of Food Engineering*, 80, 931-938.
- Sampedro, F., Geveke, D. J., Fan, X., & Zhang, H. Q. (2009). Effect of PEF, HHP and thermal treatment on PME inactivation and volatile compounds concentration of an orange juice-milk based beverage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(4), 463-469.

## Bibliografía

---

- 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). Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in highpressurized orange juice during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 647-653.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M.P. (2003c). Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis* L.) during chilled storage. *European Food Research Technology*, 216, 18-22.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., Cano, M. P. (2004). Effect of combined treatments of high-pressure and natural additives on carotenoid extractability and antioxidant activity of tomato puree (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *European Food Research Technology*, 219, 151-160.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martinez, 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 Agricultural and Food Chemistry*, 53(11), 4403-4409.
- 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.
- 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.
- Saucedo, D. (2009). Impacto de la tecnología emergente altas presiones hidrostáticas y tratamientos por calor sobre la inactivación y evaluación de riesgo de *Listeria innocua* CECT 910 y *Escherichia coli* CECT 433 inoculadas en una bebida mezcla de vegetales. Tesis doctoral. Universitat de València. Valencia, 2009.
- Schilling, S., Alber, T., Toepfl, S., Neidhart, S., Knorr, D., Schieber, A., & Carle, R. (2007). Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 127-134.
- Schrader, K., Buchheim, W., Morr, C.V. (1997). High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk. Part 1. High pressure dissolution of colloidal calcium phosphate in heated milk systems. *Nahrung*, 41, 133-138.



- Schrader, K., Buchheim, W. (1998). High pressure effects on the colloidal calcium phosphate and the structural integrity of micellar casein in milk II. Kinetics of the casein micelle disintegration and protein interactions in milk. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber*, 50, 79–88.
- Schmidt, H.W. (1985). Untersuchungen zur ultraschall-homogenisierung von milchproben. *Lebensmittelindustrie*, 32, 173–175.
- Selma, M. V., Fernández, P. S., Valero, M., & Salmerón, M. C. (2003). Control of Enterobacter aerogenes by high-intensity, pulsed electric fields in horchata, a Spanish low-acid vegetable beverage. *Food Microbiology*, 20(1), 105-110.
- Señorans, F. J., Ibáñez, E., Cifuentes, A. (2003). New trends in food processing. *Critical reviews in food science and nutrition*, 43, 507-526.
- 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.
- Shahidi, F y Naczk, M. Foods phenolics. (1995). Sources, Chemistry, Effects, Application. Tecnnomic, Publishing CO., INC eds. Lancaster, Pennsylvania, USA.
- Sharma, S. K.; Zhang, Q. H.; Chism, G. W. (1998). Development of a protein fortified fruit beverage and its quality when processed with pulsed electric field treatment. *Journal of Food Quality*, 21, 459-473.
- Shibauchi, Y., Yamamoto, H. and Sagara, Y. (1992). Conformational change of casein micelles by high pressure treatment. In: Balny, C., Hayashi, R., Heremans, K. and Masson, P., Editors. *High pressure and biotechnology*, John Libbey Eurotext, Paris, pp. 239–241.
- Shouqin, Z., Jun, X., and Changzheng, W. (2005). Changzheng, High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80(1), 50–54.
- Sierra, I, Vidal Valverde, C., and López Fandiño, R. (2000). Effect of high pressure on the vitamin B<sub>1</sub> and B<sub>6</sub> content in milk. *Milchwissenschaft*, 55(7), 365–367.
- 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.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A., Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdc-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Soliva-Fortuny, R., Balasa, A., Knorr, D., & Martín-Belloso, O. (2009). Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(11-12), 544-556.

## Bibliografía

---

- Spigno, G., Tramelli, L., and Marco de Faveri, D. (2006). Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering* 81, 200–208.
- Spilimbergo, S., Elvassore, N., Bertucco, A. (2002). Microbial inactivation by high-pressure. *Journal of Supercritical Fluids*, 22 (1), 55–63.
- Spilimbergo, S., Dehghani, F., Bertucco, A., & Foster, N. R. (2003). Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO<sub>2</sub> at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering*, 82(1), 118-125.
- 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.
- Sualdea, B. (2004). Importancia de los antioxidantes en la prevención de enfermedades crónicas. *Revista de Nutrición Práctica*, Dietecom. Abril. 4 p.
- 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.
- Takahashi, Y., Ohta, H., Yonei, H., & Ifuku, Y. (1993). Microbicidal effect of hydrostatic pressure on satsuma mandarin juice. *International Journal of Food Science & Technology*, 28(1), 95-102.
- Taoukis, P.S., Panagiotidis, P., Stoforos, N.G., Butz, P., Fister, H., and Tauscher, B. (1998). Kinetics of vitamin C degradation under high pressure-moderate temperature processing in model systems and fruit juices. In: N.S Isaacs, Editor, *High pressure food science, bioscience and chemistry*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, pp. 310–316.
- Tauscher, B. (1998). Effect of high pressure treatment to nutritive substances and natural pigments. In Autio, K. (Ed.), *Fresh novel foods by high pressure* (pp. 83-95), Espoo (Finland): Technical Research Centre of Finland, VTT Symposium 186.
- Taylor, M. J., Richardson, T. (1980). Antioxidant activity of skim milk: effect of sonication. *Journal of Dairy Science*, 63, 1938-1942.
- Thakur, B.R., Nelson, P.E. (1998). High pressure processing and preservation of foods. *Food Reviews International*, 14, 427-447.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2008a). Effects of Sonication on the Kinetics of Orange Juice Quality Parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2423-2428.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2008b). Colour degradation and quality parameters of sonicated orange juice using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1876-1883.

- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Patras, A., & Cullen, P. J. (2008c). Anthocyanin and Ascorbic Acid Degradation in Sonicated Strawberry Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(21), 10071-10077.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2009a). Effect of sonication on retention of anthocyanins in blackberry juice. *Journal of Food Engineering*, 93(2), 166-171.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2009b). Effect of non thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3-4), 137-145.
- Tiwari, B. K., Patras, A., Brunton, N., Cullen, P. J., & O'Donnell, C. P. (2010). Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice. *Ultrasonics sonochemistry*, 17(3), 598-604.
- Toepfl, S. (2006). Pulsed electric fields (PEF) for permeabilization of cell membranes in food- and bioprocessing — applications, process and equipment design and costs analysis. Dissertation. (pp. 68–69). Berlin.
- 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(4), 405.
- Toepfl, S., Heinz, V., & Knorr, D. (2007). High intensity pulsed electric fields applied for food preservation. *Chemical Engineering and Processing*, 46(6), 537–546.
- Torregrosa, F., Esteve, M. J., Frígola, A., & Cortés, C. (2006). Ascorbic acid stability during refrigerated storage of orange–carrot juice treated by high pulsed electric field and comparison with pasteurized juice. *Journal of Food Engineering*, 73(4), 339-345.
- Torregrosa, F., Cortes, 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 Agricultural of Food Chemistry*, 53, 9519-9525.
- Tsimidou, M. (1998). Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Italian Journal of Food Science*, 2(10), 99-116.
- Urrutia-Benet, G., Schlüter, O., & Knorr, D. (2004). High pressure-low temperature processing. Suggested definitions and terminology. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(4), 413–427.
- Valdramidis, V. P., Cullen, P. J., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2010). Quantitative modelling approaches for ascorbic acid degradation and non-enzymatic browning of orange juice during ultrasound processing. *Journal of Food Engineering*, 96(3), 449-454.

## Bibliografía

---

- Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Muñoz, N., Martí, N., & Lizama, V. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80(2), 509-516.
- Van der Berg, R., Haenen, G. R. R. M., Van der Berg, M., & Bast, A. (1999). Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511-517.
- Verrax, J., Calderón, P.B. (2008). The controversial place of vitamin C in cancer treatment. *Biochem Pharmacol*, 76(12):1644-52.
- Vertuani, S., Braccioli, E., Buzzoni, V., Manfredini, S. (2002). Antioxidant capacity of *Adansonia digitata* fruit pulp and leaves. *Acta Phytotherapeutica*, 26, 654-666
- Vertuani, S., Bosca, E., Braccioli, E., Manfredini, S. (2004). Water soluble antioxidant capacity of different teas. *Nutra Foods*, 3 (2), 05-11.
- Villamiel, M and de Jong, P. (2000). Influence of high-intensity ultrasound and heat treatment in continuous flow on fat, proteins, and native enzymes of milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 472-478.
- Virost, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. C. G., & Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 17(6), 1066-1074.
- Vorobiev, E., Jemai, A. B., Bouzrara, H., Lebovka, N. I., & Bazhal, M. I. (2005). Pulsed electric field assisted extraction of juice from food plants. In G. Barbosa-Canovas, M. S. Tapia & M. P. Cano (Eds.), *Novel food processing technologies* (pp. 105-130). New York, USA: CRC.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. I. (2006). Extraction of intercellular components by pulsed electric fields. In J. Raso & H. Heinz (Eds.), *Pulsed electric field technology for the food industry. Fundamentals and applications* (pp. 153-194). New York, USA: Springer.
- Walkling-Ribeiro, M., Noci, F., Cronin, D. A., Riener, J., Lyng, J. G., & Morgan, D. J. (2008). Reduction of *Staphylococcus aureus* and quality changes in apple juice processed by ultraviolet irradiation, pre-heating and pulsed electric fields. *Journal of Food Engineering*, 89(3), 267-273.
- World Health Organization (WHO). (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*; World Health Organization: Geneva (Switzerland), WHO technical report series 916, 1-148.
- Wouters, P.C., Smelt, J.P.P.M. (1997). Inactivation of microorganisms with pulsed electric fields: Potential for food preservation. *Food Biotechnology*, 11, 193.

- 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, H., Hulbert, G. J., & Mount, J. R. (2000). Effects of ultrasound on milk homogenization and fermentation with yogurt starter. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 1(3), 211-218.
- Wu, Y., Mittal, G. S., & Griffiths, M. W. (2005). Effect of Pulsed Electric Field on the Inactivation of Microorganisms in Grape Juices with and without Antimicrobials. *Biosystems Engineering*, 90(1), 1-7.
- Xiang, B.Y., O Ngadi, M., Gachovska, T., Simpson, B.K. (2007). Pulse electric field treatment effects on rheological properties and color of soy milk. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*.
- Yamaguchi, M., Uchiyama, S. (2003). Effect of carotenoid on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues in vitro: The unique anabolic effect of b-cryptoxanthin. *Biological and Pharmaceutical Bolletin*, 26, 1188-1191.
- Ye, A., Anema, S. G., & Singh, H. (2004). High-Pressure-Induced Interactions Between Milk Fat Globule Membrane Proteins and Skim Milk Proteins in Whole Milk. *Journal of dairy science*, 87(12), 4013-4022.
- Yen, G. C., & Lin, H. T. (1996). Comparison of high pressure treatment and thermal pasteurisation on the quality and shelf life of guava purée. *International Journal of Food Science & Technology*, 31, 205-213.
- 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(10), 4597-4605.
- Yin, Y., Zhang, Q. H. and Sastry, S. K. (1997). High voltage pulsed electric field treatment chambers for the preservation of liquid food products. Ohio State University. US Patent 5, 690, 978.
- 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.
- Zhang, Q., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B. (1995). Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization. *Journal of Food Engineering*, 25(2), 261-281.
- Zhi, Y.J and Howard, L.R. (2005). Subcritical water and sulfured water extraction of anthocyanins and other phenolics from dried red grape skin, *Journal of Food Science*, 70(4), 270-276.
- Zielinska, D., Szawara-Nowak, D., Ornatowska, A., & Wiczkowski, W. (2007). Use of Cyclic Voltammetry, Photochemiluminescence, and Spectrophotometric methods for the measurement of the antioxidant capacity of buckwheat sprouts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9891-9898.

## Bibliografía

---

Zobrist, M.R., Huppertz, T., Uniacke, T., Fox, P.F., Kelly, A.L. (2005). High pressure-induced changes in rennet-coagulation properties of bovine milk. *International Dairy Journal*, 15, 655–662.

Zulueta, A., Esteve, M.J., Frásquet, 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, 1365–1374.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310-316.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2010a). Ascorbic acid in orange juice-milk beverage treated by high intensity pulsed electric fields and its stability during storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(1), 84-90.

Zulueta, A., Barba, F., Esteve, M., & Frígola, A. (2010b). Effects on the carotenoid pattern and vitamin A of a pulsed electric field-treated orange juice-milk beverage and behavior during storage. *European Food Research and Technology*, 231(4), 525-534







**PUBLICACIONES Y CONGRESOS**  

---

**ARTICLES AND CONGRESS**

## PUBLICACIONES Y CONGRESOS.

### *PUBLICACIONES EN REVISTAS*

- **Barba F.J.**, González, R., Esteve M.J., Frigola A. 2008. Cambios de color en una bebida a base de zumo de naranja-leche tratada por altas presiones hidrostáticas. *Alimentaria*, 395, 79-80. ISSN: 0300-5755. Depósito legal: M 611-1964.
- González, R., **Barba, F.J.**, Esteve M.J., Frigola A. 2008. Capacidad antioxidante total de una bebida a base de zumo de naranja-leche tratada por altas presiones hidrostáticas. *Alimentaria*, 395, 89. ISSN: 0300-5755. Depósito legal: M 611-1964.
- Esteve M.J., **Barba, F.J.**, Palop, S. Frigola A. 2009. The effects of non-thermal processing on carotenoids in orange juice milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 304-306.
- Zulueta, A., **Barba, F.J.**, Esteve M.J., Frigola A. 2010. Effects on the carotenoid pattern and vitamin A of a pulsed electric field-treated orange juice-milk beverage and behavior during storage. *European Food Research Technology*, 231, 525-534.
- **Barba F.J.**, Esteve M.J., Frigola A. 2010. Ascorbic acid is the only bioactive that is better preserved by high hydrostatic pressure than by thermal treatment of a vegetable beverage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 10070-10075.
- **Barba F.J.**, Esteve M.J., Frigola A. 2011. Determination of vitamins E ( $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. *European Food Research Technology*. In Press. doi:10.1007/s00217-011-1450-8.
- **Barba F.J.**, Esteve M.J., Frigola A. 2011. Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing. *Food Research International*. In Press. doi:10.1016/j.foodres.2011.02.038.
- **Barba F.J.**, Cortés, C., Esteve M.J., Frigola A. 2011. Study of antioxidant capacity and quality parameters in an orange juice-milk beverage after high

pressure processing treatment. *Food and Bioprocess Technology*. Accepted manuscript.

## The Effects of Non-thermal Processing on Carotenoids in Orange Juice

M. J. ESTEVE, F. J. BARBA, S. PALOP and A. FRÍGOLA\*

*Nutrition and Food Chemistry, University of Valencia, 46100 Burjassot, Spain*

\*E-mail: ana.frigola@uv.es

**Abstract:** New non-thermal technologies are emerging, such as pulsed electric fields (PEF) and high hydrostatic pressure (HHP), in order to provide a response to the need for greater nutritional and sensory quality in some manufactured foods in which the characteristics of freshness are especially affected by thermal treatments. The effect of non-thermal processing (PEF, 30 kV/cm, 100  $\mu$ s and HHP, 4000 bars, 5 min) and pasteurisation (90°C, 20 s) on carotenoids of orange juice was studied. The total carotenoid concentration in the pasteurised juice ( $1195.4 \pm 31.6$   $\mu$ g/100 ml) decreased significantly in comparison with the fresh juice ( $1367.2 \pm 64.7$   $\mu$ g/100 ml), and the decrease was less in the juice treated by PEF ( $1275.2 \pm 56.3$   $\mu$ g/100 ml). The decrease in the juice treated by HHP ( $1309.2 \pm 46.7$   $\mu$ g/100 ml) was no significant in the conditions selected. Only the differences between the untreated orange juice and the pasteurised orange juice were significant. Thus, in refrigerated orange juice, the concentration of carotenoids is affected less by non-thermal treatments (PEF and HHP) than by conventional thermal treatments.

**Keywords:** carotenoids; pulsed electric field; high hydrostatic pressure; pasteurisation; orange juice

### INTRODUCTION

The abundance of fresh drinks based on fruit juices, especially citrus juices, and minimally processed products allow consumers to ingest a wide variety of antioxidants in the diet orange juice is an important source of carotenoids and ascorbic acid, a nutrient that, apart from its vitamin action, is valuable for its antioxidant effect, stimulation of the immune system and other health benefits that are being actively investigated and reported (MIQUEL *et al.* 2006; LAKO *et al.* 2007). During heat treatment, in addition to inactivation of microorganisms, varying percentages of desirable constituents such as nutrients, colour, aroma and texture are destroyed (ALWAZEER *et al.* 2002; BLASCO *et al.* 2004). Recent studies on the effect that heat has on the quality of various kinds of fruit and vegetables, including orange juice, have indicated a relative loss of total vitamin A content resulting from the loss of certain carotenes present in orange juice (LEE & COATES 2003; CORTÉS *et al.* 2006). Pulsed electric fields

(PEF) and high hydrostatic pressure (HHP) are emerging technologies in the field of food preservation, have the potential to pasteurise various foods non-thermally, and it has been verified that these new technologies guarantee the safety (microorganisms) and stability (enzymes) of juices, with less quality loss in the final product.

The aim of this work, was studied the effect of non-thermal processing (PEF and HHP) and pasteurisation on carotenoids of orange juice and their evolution during storage of orange juice treated by pasteurisation, PEF and HHP.

### MATERIAL AND METHODS

**Samples.** Oranges (*Citrus sinensis* L., Navel variety) were purchased in a supermarket in Valencia (Spain). Juice was obtained by squeezing (FMC juice extractor, 2 mm perforated plate) and passed through a filter (pore diameter = 0.23 mm). It was divided into four aliquots: one to be treated by heat, one by PEF, one by HHP and one that was not

## Effects on the carotenoid pattern and vitamin A of a pulsed electric field-treated orange juice–milk beverage and behavior during storage

Ana Zulueta · Francisco J. Barba · María J. Esteve · Ana Frígola

Received: 1 March 2010 / Revised: 29 April 2010 / Accepted: 4 June 2010 / Published online: 18 June 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** The effect of pulsed electric fields (PEF; electric field intensities 15, 25, 35, and 40 kV/cm, and treatments times from 40 to 700  $\mu$ s) on the carotenoid and vitamin A profile of an orange juice–milk beverage was evaluated and compared with a pasteurization treatment (90 °C, 20 s). Subsequently, the evolution of these parameters during storage of the beverage at 4 and 10 °C was studied. The results obtained indicate that the application of the electric field influenced the concentration of the extracted carotenoids producing a slight increase at 15 kV/cm and a slight decrease at 40 kV/cm. On the other hand, when pasteurization was applied, it was found a reduction in total carotenoid concentration. The reductions in carotenoids with provitamin A activity were very small after pasteurization, the decreases in lutein and zeaxanthin must be taken into account. The degradation kinetics of the carotenoids during storage were similar for the pasteurized and PEF-treated beverages. However, they were less affected initially in the beverages treated by the new technology and were therefore maintained in greater quantities throughout the storage period.

**Keywords** Pulsed electric fields · Pasteurization · Carotenoids · Vitamin A · Orange juice–milk beverages

### Introduction

Adapting to new trends and consumer demands is one of the main objectives of fruit juice producers. Current developments in new ready-to-drink beverages are based on drinks containing combinations of dairy and fruit juices with added bioactive components, which are becoming common in Japan, US, and EU markets and have been receiving considerable attention as their market potential grows [1]. Fruit and milk is one such mixture in which the antioxidant capacity of fruit constituents can be delivered in combination with the health benefits of milk [2]. These products may be particularly useful in places where there is inadequate nutrition, because milk-based beverages are proving to be ideal vehicles for newly discovered bioactive food ingredients [3].

Nutritionally, orange juice is a rich source of carotenoids that are one of the main types of natural pigments [4], color being one of the principal criteria that govern selection of food products by consumers [5]. Carotenoids have diverse biological functions and actions, such as antioxidant capacity, provitamin A activity ( $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -cryptoxanthin, and  $\beta$ -cryptoxanthin), and protection against macular degeneration (lutein and zeaxanthin) [6, 7].

When isolated from vegetable tissues, carotenoids are unstable in the presence of light, heat, acids, and oxygen. Depending on the severity of the thermal treatments used in the processing of foods, isomerization and oxidative degradation of carotenoids may be induced [8].

To prolong shelf life of juices, pasteurization is the commonest method for inactivating microorganism and enzymes. However, loss of representative flavor compounds, color, and vitamins has been reported [9, 10]. Alternatively, PEF is a non-thermal, waste-free technology,

A. Zulueta · F. J. Barba · M. J. Esteve · A. Frígola (✉)  
Área de Nutrición y Bromatología,  
Facultat de Farmàcia, Universitat de València,  
Avenida Vicent Andrés Estellés s/n,  
46100 Burjassot, Valencia, Spain  
e-mail: ana.frigola@uv.es

## Ascorbic Acid Is the Only Bioactive That Is Better Preserved by High Hydrostatic Pressure than by Thermal Treatment of a Vegetable Beverage

FRANCISCO J. BARBA, MARIA J. ESTEVE, AND ANA FRIGOLA\*

Nutrition and Food Chemistry, University of Valencia, Avenida Vicent Andrés Estellés s/n,  
46100 Burjassot, Spain

Variations in levels of antioxidant compounds (ascorbic acid, total phenolics, and total carotenoids), total antioxidant capacity, and color changes in a vegetable (tomato, green pepper, green celery, onion, carrot, lemon, and olive oil) beverage treated by high hydrostatic pressure (HHP) were evaluated in this work. The effects of HHP treatment, four different pressures (100, 200, 300, and 400 MPa) and four treatment times for each pressure (from 120 to 540 s) were compared with those of thermal treatment (90–98 °C for 15 and 21 s). High pressure treatment retained significantly more ascorbic acid in the vegetable beverage than thermal treatment. However, no significant changes in total phenolics were observed between HHP treated and thermally processed vegetable beverage and unprocessed beverage. Color changes ( $a^*$ ,  $b^*$ ,  $L$ , chroma,  $h^*$ , and  $\Delta E$ ) were less for pressurized beverage than thermally treated samples compared with unprocessed beverage.

**KEYWORDS:** HHP; vegetable beverage; bioactive compounds; ascorbic acid; total antioxidant capacity and color

### INTRODUCTION

Currently there is a growing tendency for the consumption of minimally processed food products. Dietary recommendations for healthy eating include the consumption of fruit and vegetables, whose health effects are ascribed, in part, to different phytochemicals such as carotenoids, phenolic compounds, and ascorbic acid (AA). These bioactive compounds are beneficial components present in functional foods, and they have been implicated in the reduction of degenerative human diseases, mainly because of their antioxidant potential. Moreover, researchers have used AA as a quality indicator in fruits and vegetables because it is a sensitive bioactive compound providing an indication of the loss of other vitamins and therefore acting as a valid criterion for other organoleptic or nutritional components (1, 2).

Consumption of vegetable beverages, with such a diverse composition, could help fulfill the recommendation to eat more vegetables and achieve the health benefits derived from its bioactive compound combination. "Gazpacho" is a typical meal of the Mediterranean diet, which can be defined as a cold soup which contains vegetables (tomato, cucumber, pepper), olive oil, and other minor components (onion, garlic, wine vinegar, and sea salt) (3).

Thermal treatment, commonly used for preserving food, promotes organoleptic and nutritional losses, affecting AA, phenolic compounds, carotenoids, antioxidant capacity, and other parameters such as color and browning index (4). Color is an important quality characteristic of fruits and vegetables and one of the major factors affecting sensory perception and consumer acceptance of

foods because it is connected with the perception of flavor, sweetness, and other characteristics that appear to be representative of the quality of these products such as browning of fruits and vegetables. Browning of raw fruits and vegetables due to mechanical injury during postharvest handling and processing is an important cause of quality and value loss; it not only reduces the visual quality but also results in undesirable changes in flavor and loss of nutrients due to enzymatic browning and turbidity (5).

To achieve a balance between food quality and safety, there is a need to optimize conventional processing techniques currently applied in the food industry and to develop nonthermal processing techniques such as high hydrostatic pressure (HHP) processing. HHP technology is one of the nonthermal physical techniques that are being investigated to be used by the food industry as an alternative to thermal treatment because it inactivates and inhibits microorganisms and degrades enzymes (6). HHP processing preserves nutritional value with only a minimal effect on the product quality and delicate sensory properties of fruits and vegetables owing to its limited effect on the covalent bonds of low molecular mass compounds such as color and flavor compounds. Several studies have been conducted in which HHP has been applied to various matrices, especially tomatoes and derived products and other vegetable beverages (7–9).

In addition, at this stage of development of HHP technology, evaluating the influence of process variables on the bioactive compounds, total antioxidant capacity, color, and browning index is a key factor in defining treatment conditions to avoid the loss of these important properties of foods and to obtain a food beverage with high benefits for the health of the consumer. Thus, the purpose of this study was studied the impact of high pressure treatments on bioactive compounds, antioxidant activity, color, and browning

\*To whom correspondence should be addressed. Phone: +34 963544955. Fax: +34 963544954. E-mail: ana.frigola@uv.es.

## Determination of vitamins E ( $\alpha$ -, $\gamma$ - and $\delta$ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage

Francisco J. Barba · María J. Esteve · Ana Frígola

Received: 26 November 2010 / Revised: 16 January 2011 / Accepted: 28 January 2011  
© Springer-Verlag 2011

**Abstract** Concentrations of fat-soluble vitamins in food products vary in relation to origin, preparation and/or storage of the products and this makes it hard to predict the exact concentration of these micronutrients in the processed product. In order to determine their content in new food matrices is necessary to adapt and validate a routine method. A simple method for simultaneous extraction, identification and determination of  $\alpha$ -,  $\delta$ - and  $\gamma$ -tocopherol, ergocalciferol and cholecalciferol in different beverages was established. Saponification was performed with 15 mL of KOH in ethanol (50%, w/v) and BHT was added as antioxidant. The subsequent extraction was carried out with hexane. This was followed by a liquid chromatographic separation on a reversed-phase C<sub>18</sub> (5  $\mu$ m, 150  $\times$  4.6 mm) column with acetonitrile-methanol (90:10, v/v) as the mobile phase. UV detection was sufficiently sensitive for the detection of all compounds at the same  $\lambda$  (265 nm). It was shown that the HPLC method provides baseline separation of all these compounds with good resolution values in 25 min. Recovery of analytes and reproducibility of HPLC proved to be good. Furthermore, the usefulness of this method was demonstrated by its successful application to the analysis of various beverages from different natural origins (milk, infant formula, orange juice, fruit juice with milk and vegetable beverage).

**Keywords** Vitamin E · Vitamin D · Liquid chromatography · Milk · Fruit juice

### Introduction

In the last decade, the functional food sector has undergone considerable growth in the food industry with an increase in consumer demand for foods of this kind [1–3], special emphasis being placed on beverages enriched with various vitamins [4, 5]. Concentrations of fat-soluble vitamins in food products vary in relation to origin, preparation and/or storage of the products and this makes it hard to predict the exact concentration of these micronutrients in the processed product [6]. In many cases, the real concentrations do not correspond to the values indicated on the food nutrition labels due to inconsistent fortification or to the intrinsic instability of fat-soluble vitamins [7]. Loss of vitamins has been reported after pasteurization of liquid foods [8, 9], so that it is important to analyse the vitamins in food products because vitamins are present in very small quantities in foods and play an important part in the organism.

Vitamin E is found in foods in four main forms,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherols. The  $\gamma$ -tocopherol is the major tocopherol present in western diets [10] while  $\alpha$ -tocopherol is the most abundant form of vitamin E in milk [11]. Tocopherols are naturally occurring lipid antioxidants that specifically inhibit the oxidation of polyunsaturated fatty acids [12] observing the higher antioxidant capacity for  $\alpha$ -tocopherol, reacting with peroxy radicals and other free radicals [13–15]. High concentrations of antioxidants, including  $\alpha$ -tocopherol, are associated with a reduction in the risk of disorders connected to free radicals, such as atherosclerosis, cancer, cataracts and cell damage

F. J. Barba · M. J. Esteve · A. Frígola (✉)  
Àrea de Nutrició i Bromatologia,  
Facultat de Farmàcia, Universitat de València,  
Avenida Vicent Andrés Estellés s/n,  
46100 Burjassot, (Valencia), Spain  
e-mail: ana.frigola@uv.es



## Physicochemical and nutritional characteristics of blueberry juice after high pressure processing

Francisco J. Barba, Maria J. Esteve, Ana Frigola\*

Nutrition and Food Chemistry, Universitat de València, Avda. Vicent Andrés Estellés, s/n. 46100 Burjassot, Spain

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 13 October 2010  
Accepted 26 February 2011  
Available online xxxxx

**Keywords:**  
High pressure processing  
Physicochemical properties  
Bioactive compounds  
Color  
Blueberry juice

### ABSTRACT

This study was carried out to investigate the impact of high pressure processing (HPP) at different pressure (200, 400 and 600 MPa) and treatment times (5, 9 and 15 min) on ascorbic acid, total phenolics, anthocyanin stability and total antioxidant capacity, were also studied at different physicochemical parameters such as pH, °Brix and color. HPP treatments resulted in more than 92% vitamin C retention at all treatment intensities. On the other hand, total phenolic content in the juice was increased, mainly after HPP at 200 MPa for all treatment times. The total and monomeric anthocyanin were similar or higher than the value estimated for the fresh juice being maximum at 400 MPa/15 min (16% increase). Antioxidant capacity values were not statistically different for treatments at 200 MPa for 5–15 min in comparison with fresh juice, however for 400 MPa/15 min and 600 MPa for all times (8–16% reduction), the lowest values were observed for total antioxidant capacity determined with TEAC method. No significant changes were observed in pH and °Brix. Color changes (a\*, b\*, L\*, and ΔE) were not visually noticeable for pressurized beverage for all pressures and times.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Blueberry juices are becoming more attractive to consumers due to their high levels of antioxidants, which promote human health. Blueberry juice with higher amounts of anthocyanins and other antioxidant phytochemicals such as vitamins C and E among other beneficial substances, is healthful to humans (Nindo, Tang, Powers, & Singh, 2005). Vitamin retention studies to assess the effects of food processing on the nutritional value of foods are of great importance to food technologists and consumers. Ascorbic acid has been used as quality indicator in fruits and vegetables (Esteve, Farré, & Frigola, 1996; Giannakourou & Taoukis, 2003) because this is a temperature-sensitive bioactive compound, which is also acting as a valid criterion for other organoleptic or nutritional components (Blasco, Esteve, Frigola, & Rodrigo, 2004; Esteve, Farre, & Frigola, 1995). Anthocyanins are the major polyphenolics present in blueberry juice, which are responsible for the red, violet, purple, and blue color of this fruit (Kong, Chia, Goh, Chia, & Brouillard, 2003; Prior, 2003), and exhibit a wide range of antioxidant protection and therapeutic benefits including the integrity of genomic DNA, potent cardioprotective, neuroprotective, antiinflammatory, and anticarcinogenic properties. Among berry fruits, blueberry has the highest antioxidant capacity, which is mainly related to the anthocyanin content (Juranić & Zizak, 2005; Kalt, Forney, Martin, & Prior, 1999).

Thermal blanching above 80 °C remains the most widely adopted technology for preservation of fruit juices, however at these process conditions, blueberry products typically lose their natural flavor and some of their nutritional value (Rossi, Giussani, Morelli, Lo Scalzo, Nani & Torregiani, 2003). Consumer demand for minimally processed foods, has led to interest in non thermal technologies such as HPP (Hendrickx & Knorr, 2002). The application of HPP allows microbial and enzyme inactivation in order to enhance safety and shelf-life of perishable foods, while reducing thermal effects on nutritional and quality parameters (Butz, Fernández García, Lindauer, Dieterich, Bognár & Tauscher, 2003; Knorr, 1993). A commercial application of HPP consists of subjecting the packaged or unpacked food in water at pressures of 100–900 MPa for 1–20 min at room temperature, which results in the inactivation of vegetative microorganisms and enzymes while maintaining physicochemical and nutritive properties, allowing the storage of the product at 4–6 °C (Cheftel, 1995).

Over the last 20 years, HPP has been investigated and several commercial products, including fruit juices, i.e. mandarin, grapefruit, apple, orange, carrot juices and broccoli-apple juice mixture treated by HPP are currently available on market (Buzrul, Alpas, Largeteau, & Demazeau, 2008; Hayakawa, Kanno, Yoshiyama, & Fujio, 1994). In addition, at this stage of development of HPP technology, evaluating the influence of process variables on the stability of bioactive compounds as well as antioxidant capacity and physicochemical parameters of blueberry juice is a key factor in defining treatment conditions to avoid the loss of these important properties of foods and to obtain a food beverage with high benefits for the health of the consumer. Thus, the operating pressure, and holding times at the pressure set point were

\* Corresponding author. Tel.: +34 963544955; fax: +34 963544954.  
E-mail address: [ana.frigola@uv.es](mailto:ana.frigola@uv.es) (A. Frigola).



*PROCEEDINGS*

- Cortes, C., **Barba, F.**, Esteve, M.J., González, R., Frigola, A. (2007). Total antioxidant capacity of orange juice refrigerated treated by pulsed electric fields. 1st International Immunonutrition Workshop. Valencia (España). Proceedings of the Nutrition Society. doi:10.1017/S0029665108006435.
- González, R., **Barba, F.**, Esteve, M.J., Frigola, A. (2007). Variation in ascorbic acid content during blanching of different vegetables. Fruit, vegetables and potato processing. Gante (Bélgica)
- Tedeschi P., Maietti A., Frigola A., Esteve M.J., **Barba F.**, Brandolini V. (2008). Approccio analitico per lo studio di nuovi alimenti funzionali. VII Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti. Perugia (Italia).
- Cortés C., Palop S., **Barba F.J.**, Esteve M.J., Frígola A. (2009). The effects of pulsed electric fields processing on total antioxidant capacity in refrigerated orange juice. Comparison with HHP and pasteurized treated juice. Bio & Food Electrotechnologies (BFE). Compiègne (Francia). ISBN: 978-2-913923-31-7.
- Frígola A., Cortés C., Palop S., **Barba F.J.**, Esteve M.J. (2009). Study of ascorbic acid degradation in orange juice beverages treated by pulsed electric fields. Bio & Food Electrotechnologies (BFE). Compiègne (Francia). ISBN: 978-2-913923-31-7.
- **Barba, F.J.**, Meneses, N., Jäger, H., Esteve, M.J., Frigola, A., Knorr, D. (2010). Colour modifications in orange juice milk processed by ultrasounds. Food Innova. Valencia (España). ISBN 978-84-693-5010-2.
- **Barba, F.J.**, Meneses, N., Jäger, H., Esteve, M.J., Frigola, A., Knorr, D. (2010). Effect of high pressure processing on total anthocyanins, monomeric and polymeric in a blueberry juice. Food Innova. Valencia (España). ISBN 978-84-693-5010-2.
- **Barba, F.J.**; Meneses, N.; Jäger, H.; Esteve, M.J.; Frigola, A.; Knorr, D. (2010). Impact of pulsed electric fields on colour modifications in a blueberry juice during refrigerated storage. Food Innova. Valencia (España). ISBN 978-84-693-5010-2.

## Publicaciones y Congresos

---

- **Barba, F.J.**, Esteve, M.J., Frigola, A. (2010). Modifications in fatty acid profile in an orange juice-milk beverage processed by high hydrostatic pressure. Food Innova. Valencia (España). ISBN 978-84-693-5010-2.

*ABSTRACTS*

- **Barba, F.**, González, R., Esteve, M.J., Frígola, A. (2008). Cambios de color en una bebida a base de zumo de naranja-leche tratada por altas presiones hidrostáticas. XIII Congreso Anual en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Madrid (España).
- González, R., **Barba, F.**, Esteve, M.J., Frígola, A. (2008). Capacidad antioxidante total de una bebida a base de zumo de naranja-leche tratada por altas presiones hidrostáticas. XIII Congreso Anual en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Madrid (España).
- Esteve, M.J., González-Carrascosa, R., **Barba, F.J.**, Benedicto, J., Frígola, A. (2008). Aporte de vitamina C de una bebida a base de vegetales tratada por altas presiones hidrostáticas. VIII Congreso SENC. Revista Española de nutrición comunitaria. Valencia (España). Año: 2008
- **Barba, F.**; González, R.; Esteve, M.J.; Frígola, A. (2008). Total phenolic compounds in orange juice and milk beverage treated by pulsed electric field and high hydrostatic pressure. VII Congresso Nazionale di Chimica degli Alimenti. Perugia (Italia).
- **Barba, F.**, Benedicto, J., Esteve, M.J., Frígola, A. (2008). Impact of high hydrostatic pressure treatment (HHP) on the antioxidant capacity in a vegetables beverage. Innovative applications of non-thermal technologies in foods: technology, safety, health and consumer acceptability. Madrid (España).
- **Barba, F.**, Benedicto, J., Esteve, M.J., Frígola, A. (2008). Phenolic compounds in a vegetables beverage treated by high hydrostatic pressure (HHP). Innovative applications of non-thermal technologies in foods: technology, safety, health and consumer acceptability. Madrid (España)
- González, R., **Barba, F.**, Benedicto, J., Esteve, M.J., Frígola, A. (2008). Changes of Color in a Vegetables Beverage Treated by High Hydrostatic Pressures. First European Food Congress. Ljubljana (Eslovenia).
- Esteve, M.J., **Barba, F.J.**, Palop, S., Frígola, A. (2009). The effects of non-thermal processing on carotenoids in orange. Chemical Reactions in Foods

## Publicaciones y Congresos

---

### VI. Praga (República Checa).

- **Barba, F.J.**, Esteve, M.J., Frigola, A. (2010). Application of an HPLC metho for a rapid determination of  $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocopherol, ergocalciferol and cholecalciferol in different liquid foods and cereals. ISC 2010. Valencia (España).
- **Barba, F.J.**, Esteve, M.J., Frigola, A. (2010). Effects of high pressure processing on fatty acid profile in vegetables beverage. ISC 2010. Valencia (España).



# ANEXOS

---

## ANNEX

## **ANEXOS**

**Anexos I. Composición nutricional de las bebidas comerciales estudiadas.**

**Anexo II. Análisis estadísticos.**

## Anexo I. Composición nutricional de las bebidas comerciales estudiadas

### ZUMOS DE FRUTAS MEZCLADOS CON LECHE

Composición nutricional de las bebidas de zumo mezclado con leche comerciales estudiadas (por 100 mL)

M	E (Kcal)	Proteínas (g)	HC (g)	Grasa (g)	F (g)	Vit A (µg)	Vit C (mg)	Vit E (mg)
1A	51	0.4	12.3	0.0	0.4	120	30	1.5
			Azúcares: 11.8					
2A	51	0.4	12.3	0.0	0.4	120	30	1.5
			Azúcares: 11.8					
3B	53	0.3	12.5	0.0	0.3	-*	30	1.5
			Azúcares: 11.9					
4B	53	0.3	12.5	0.0	0.3	120*	30	1.5
			Azúcares: 11.6					
5C	54	0.4	13	0.0	-	120	9	1.5
6C	61	0.3	14.9	0.0	-	120	9	1.5
7C	50	0.3	12.2	0.0	-	120	9	1.5
8C	58	0.3	14.2	0.0	-	120	9	1.5
9C	59	0.3	14.0	0.2	-	120	9	1.5
10D	52	0.4	12.1	0.0	-	120*	30	1.5
			Azúcares: 12.0					
11D	56	0.5	13.0	0.0	0.4	120*	30	1.5
			Azúcares: 13.0					
12D	51	0.4	12.3	0.0	0.4	120	30	1.5
			Azúcares: 11.8					
13D	56	0.3	13.8	0.0		120	9	1.5
			Azúcares: 13.5					
14E	22	0.5	4.2	0.0	0.8	120*	9	1.5
			Azúcares: 4.2					
15E	22	0.5	4.0	0.1	0.9	120*	9	1.5
			Azúcares: 4.0					
16F	51	0.4	12.3	0.0	0.4	120	30	1.5
			Azúcares: 11.8					
17F	51	0.4	12.3	0.0	0.4	120	30	1.5
			Azúcares: 11.8					
18F	51	0.4	12.3	0.0	0.4	120	30	1.5
			Azúcares: 11.8					

M: Muestra. E: Energía. HC: Hidratos de carbono. F: Fibra. Vit: Vitamina. \*Añadida como β-caroteno.



BEBIDAS A BASE DE VEGETALES

Valor nutricional de las bebidas a base de vegetales comerciales estudiadas

M	E (Kcal/100 mL)	Proteínas (g/100 mL)	HC (g/100 mL)	Grasa (g/100 mL)	Fibra (g/100 mL)	Sodio (g/ 100mL)
1A	28	0.4	1.2	2.4		
2A	35	0.8	2	2.7		
3B	48	0.5	3.9	3.4		
4B	30	0.6	3.6	1.5	1.4	0.2
			Azúcares: 2.4	SFA: 0.3 MUFA: 1.2 PUFA: 0.1		
5C	28	0.4	1.2	2.4	0.9	0.2
			Azúcares: 0.5	SFA: 0.3		
6C	35	0.6	2.2	2.6	1.4	0.3
			Azúcares: 1.4	SFA: 0.3		
7C	35	0.8	2	2.7	1.4	0.3
			Azúcares: 1.4	SFA: 0.4		
8D	35	0.8	2	2.7		
9E	35	0.8	2	2.7		
10E	49	0.6	2.5	4.1	1.1	0.3
			Azúcares: 2.0	SFA: 0.5		
11E	35	0.7	2.9	2.3		
12F	48	1.0	3.7	3.2		
13G	35	0.8	2	2.7		
14H	42	0.8	3.3	3		

M: Muestra. E: Energía. HC: Hidratos de carbono.

## Anexo II. Análisis estadísticos

### ZUMOS DE FRUTAS MEZCLADOS CON LECHE COMERCIALES

Análisis de la varianza (ANOVA) de un factor (nivel de adición de vitamina C de 9 y 30 mg/100mL).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	9293.8	1	9293.8	60.23	0.0000
Intra grupos	5246.27	34	154.302		
Total (Corr.)	14540.1	35			

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la varianza de vitamina C mg/100mL en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 60.2313, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de ácido ascórbico (mg/100mL) experimental entre un nivel de vitamina C añadida por el fabricante y otro, con un nivel del 95.0% de confianza. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras se selecciona una Prueba de Múltiples Rangos (LSD).

Pruebas de Múltiple Rangos LSD para Vitamina C (mg/100mL)

Método: 95.0 porcentaje LSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
9	16	29.7225	X
30	20	62.0575	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
9 - 30	*	-32.335	8.46718

\* indica una diferencia significativa.

#### El StatAdvisor

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. Se ha colocado un asterisco junto a 1 par, indicando que este par muestra diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Comparación de desviaciones estándar métodos **TEAC-ORAC**

	<i>TEAC</i>	<i>ORAC</i>
Desviación Estándar	0,0285122	0,105456
Varianza	0,000812947	0,011121
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,0731004

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de TEAC: [0,0177976; 0,0699295]

Desviación Estándar de ORAC: [0,0658265; 0,258643]

Razones de Varianzas: [0,010229; 0,522406]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt:  $\sigma_1 \neq \sigma_2$

F = 0,0731004 valor-P = 0,0122118

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **TEAC-DPPH**

	<i>TEAC</i>	<i>DPPH</i>
Desviación Estándar	0,0535674	0,113274
Varianza	0,00286946	0,0128311
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,223634

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de TEAC: [0,0334372; 0,13138]

Desviación Estándar de DPPH: [0,0707068; 0,277818]

Razones de Varianzas: [0,0312931; 1,59818]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt:  $\sigma_1 \neq \sigma_2$

F = 0,223634 valor-P = 0,125878

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **TEAC-ACW**

	<i>TEAC</i>	<i>ACW</i>
Desviación Estándar	0,0285122	0,197495
Varianza	0,000812947	0,0390042
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,0208426

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de TEAC: [0,0177976; 0,0699295]

Desviación Estándar de ACW: [0,123278; 0,484378]

Razones de Varianzas: [0,0029165; 0,14895]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

## Anexos

---

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 0,0208426 valor-P = 0,000633072

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **TEAC-ACL**

	<i>TEAC</i>	<i>ACL</i>
Desviación Estándar	0,0285122	0,222531
Varianza	0,000812947	0,04952
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,0164165

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de TEAC: [0,0177976; 0,0699295]

Desviación Estándar de ACL: [0,138906; 0,545782]

Razones de Varianzas: [0,00229717; 0,117319]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 0,0164165 valor-P = 0,000354003

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **ORAC-DPPH**

	<i>ORAC</i>	<i>DPPH</i>
Desviación Estándar	0,105456	0,113274
Varianza	0,011121	0,0128311
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,86672

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de ORAC: [0,0658265; 0,258643]

Desviación Estándar de DPPH: [0,0707068; 0,277818]

Razones de Varianzas: [0,12128; 6,19395]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 0,86672 valor-P = 0,879121

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **ORAC-ACW**

	<i>ORAC</i>	<i>ACW</i>
Desviación Estándar	0,105456	0,197495
Varianza	0,011121	0,0390042
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,285122

Intervalos de confianza del 95,0%

XX

Desviación Estándar de ORAC: [0,0658265; 0,258643]

Desviación Estándar de ACW: [0,123278; 0,484378]

Razones de Varianzas: [0,0398972; 2,0376]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 0,285122 valor-P = 0,1947

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **ORAC-ACL**

	ORAC	ACL
Desviación Estándar	0,105456	0,222531
Varianza	0,011121	0,04952
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,224575

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de ORAC: [0,0658265; 0,258643]

Desviación Estándar de ACL: [0,138906; 0,545782]

Razones de Varianzas: [0,0314248; 1,60491]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 0,224575 valor-P = 0,126865

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **DPPH-ACW**

	DPPH	ACW
Desviación Estándar	0,113274	0,197495
Varianza	0,0128311	0,0390042
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,328967

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de DPPH: [0,0707068; 0,277818]

Desviación Estándar de ACW: [0,123278; 0,484378]

Razones de Varianzas: [0,0460324; 2,35094]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 0,328967 valor-P = 0,247768

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **DPPH-ACL**

	DPPH	ACL
Desviación Estándar	0,113274	0,222531
Varianza	0,0128311	0,04952

## Anexos

---

Gl	5	5
----	---	---

Razón de Varianzas= 0,259109

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de DPPH: [0,0707068; 0,277818]

Desviación Estándar de ACL: [0,138906; 0,545782]

Razones de Varianzas: [0,0362572; 1,8517]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 0,259109 valor-P = 0,164606

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **ACW-ACL**

	<i>ACW</i>	<i>ACL</i>
Desviación Estándar	0,197495	0,222531
Varianza	0,0390042	0,04952
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,787645

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de ACW: [0,123278; 0,484378]

Desviación Estándar de ACL: [0,138906; 0,545782]

Razones de Varianzas: [0,110215; 5,62884]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 0,787645 valor-P = 0,799774

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

EFECTO DE LAS APH EN LA BEBIDA DE ZUMO DE NARANJA MEZCLADO CON LECHE PREPARADA EN EL LABORATORIO

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **ácido ascórbico** en las bebidas de zumo y leche tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:t seg	9.86774	4	2.46693	12.05	0.0000
B:Presión	14.8847	3	4.96157	24.23	0.0000
INTERACCIONES					
AB	6.36978	12	0.530815	2.59	0.0288
RESIDUOS	4.0952	20	0.20476		
TOTAL (CORREGIDO)	35.2174	39			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **compuestos fenólicos** en las bebidas de zumo y leche tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:t seg	60503.5	4	15125.9	7.16	0.0009
B:Presión	21946.7	3	7315.57	3.47	0.0356
INTERACCIONES					
AB	39744.6	12	3312.05	1.57	0.1803
RESIDUOS	42224.5	20	2111.23		
TOTAL (CORREGIDO)	164419.	39			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **carotenoides totales** en las bebidas de zumo y leche tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:t seg	0.00653635	4	0.00163409	29.52	0.0000
B:Presión	0.001027	3	0.000342333	6.18	0.0038
INTERACCIONES					
AB	0.00107525	12	0.0000896042	1.62	0.1646
RESIDUOS	0.001107	20	0.00005535		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0097456	39			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

## Anexos

---

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **a\*** en las bebidas de zumo y leche tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	5.17764	3	1.72588	297.04	0.0000
B:t seg	2.21556	4	0.55389	95.33	0.0000
INTERACCIONES					
AB	1.9834	12	0.165284	28.45	0.0000
RESIDUOS	0.581033	100	0.00581033		
TOTAL (CORREGIDO)	9.95764	119			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **b\*** en las bebidas de zumo y leche tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	61.7418	3	20.5806	557.94	0.0000
B:t seg	20.6922	4	5.17305	140.24	0.0000
INTERACCIONES					
AB	25.2798	12	2.10665	57.11	0.0000
RESIDUOS	3.6887	100	0.036887		
TOTAL (CORREGIDO)	111.403	119			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **L\*** en las bebidas de zumo y leche tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	31.3126	3	10.4375	222.86	0.0000
B:t seg	24.6942	4	6.17356	131.82	0.0000
INTERACCIONES					
AB	12.042	12	1.0035	21.43	0.0000
RESIDUOS	4.68348	100	0.0468348		
TOTAL (CORREGIDO)	72.7323	119			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **Chroma** en las bebidas de zumo y leche tratadas a diferentes presiones y tiempos.

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	62.5848	3	20.8616	549.10	0.0000
B:t seg	21.0699	4	5.26747	138.65	0.0000
INTERACCIONES					
AB	25.6115	12	2.13429	56.18	0.0000
RESIDUOS	3.79925	100	0.0379925		
TOTAL (CORREGIDO)	113.065	119			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### BEBIDAS A BASE DE VEGETALES COMERCIALES

Comparación de desviaciones estándar métodos **TEAC-ORAC**

	TEAC	ORAC
Desviación Estándar	0,126172	0,101082
Varianza	0,0159195	0,0102175
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 1,55805

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de TEAC: [0,0787578; 0,309452]

Desviación Estándar de ORAC: [0,0630961; 0,247915]

Razones de Varianzas: [0,218019; 11,1345]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 1,55805 valor-P = 0,638413

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **TEAC-DPPH**

	TEAC	DPPH
Desviación Estándar	0,126172	0,0604218
Varianza	0,0159195	0,00365079
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 4,36055

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de TEAC: [0,0787578; 0,309452]

Desviación Estándar de DPPH: [0,0377158; 0,148191]

Razones de Varianzas: [0,610172; 31,1623]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

## Anexos

---

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 4,36055 valor-P = 0,131886

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

### Comparación de desviaciones estándar métodos **TEAC-ACW**

	<i>TEAC</i>	<i>ACW</i>
Desviación Estándar	0,126172	0,0154919
Varianza	0,0159195	0,00024
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 66,3311

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de TEAC: [0,0787578; 0,309452]

Desviación Estándar de ACW: [0,00967019; 0,0379957]

Razones de Varianzas: [9,28172; 474,03]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 66,3311 valor-P = 0,000287445

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

### Comparación de desviaciones estándar métodos **TEAC-ACL**

	<i>TEAC</i>	<i>ACL</i>
Desviación Estándar	0,126172	0,0383419
Varianza	0,0159195	0,0014701
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 10,8288

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de TEAC: [0,0787578; 0,309452]

Desviación Estándar de ACL: [0,0239333; 0,094038]

Razones de Varianzas: [1,51528; 77,3871]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 10,8288 valor-P = 0,0205671

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

### Comparación de desviaciones estándar métodos **ORAC-DPPH**

	<i>ORAC</i>	<i>DPPH</i>
Desviación Estándar	0,101082	0,0604218
Varianza	0,0102175	0,00365079
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 2,79871

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de ORAC: [0,0630961; 0,247915]  
 Desviación Estándar de DPPH: [0,0377158; 0,148191]  
 Razones de Varianzas: [0,391625; 20,0008]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 2,79871 valor-P = 0,283155

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **ORAC-ACW**

	ORAC	ACW
Desviación Estándar	0,101082	0,0154919
Varianza	0,0102175	0,00024
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 42,573

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de ORAC: [0,0630961; 0,247915]

Desviación Estándar de ACW: [0,00967019; 0,0379957]

Razones de Varianzas: [5,95726; 304,245]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 42,573 valor-P = 0,000845729

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

Comparación de desviaciones estándar métodos **ORAC-ACL**

	ORAC	ACL
Desviación Estándar	0,101082	0,0383419
Varianza	0,0102175	0,0014701
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 6,95021

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de ORAC: [0,0630961; 0,247915]

Desviación Estándar de ACL: [0,0239333; 0,094038]

Razones de Varianzas: [0,972544; 49,6691]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 <> \sigma_2$

F = 6,95021 valor-P = 0,0529549

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

## Anexos

---

### Comparación de desviaciones estándar métodos **DPPH-ACL**

	<i>DPPH</i>	<i>ACL</i>
Desviación Estándar	0,0604218	0,0383419
Varianza	0,00365079	0,0014701
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 2,48336

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de DPPH: [0,0377158; 0,148191]

Desviación Estándar de ACL: [0,0239333; 0,094038]

Razones de Varianzas: [0,347497; 17,7471]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 2,48336 valor-P = 0,340802

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

### Comparación de desviaciones estándar métodos **DPPH-ACW**

	<i>DPPH</i>	<i>ACW</i>
Desviación Estándar	0,0604218	0,0154919
Varianza	0,00365079	0,00024
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 15,211

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de DPPH: [0,0377158; 0,148191]

Desviación Estándar de ACW: [0,00967019; 0,0379957]

Razones de Varianzas: [2,12857; 108,709]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt.:  $\sigma_1 < \sigma_2$

F = 15,2116 valor-P = 0,00959728

Se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

### Comparación de desviaciones estándar métodos **ACL-ACW**

	<i>ACW</i>	<i>ACL</i>
Desviación Estándar	0,0154919	0,0383419
Varianza	0,00024	0,0014701
Gl	5	5

Razón de Varianzas= 0,163254

Intervalos de confianza del 95,0%

Desviación Estándar de ACW: [0,00967019; 0,0379957]

Desviación Estándar de ACL: [0,0239333; 0,094038]

Razones de Varianzas: [0,0228441; 1,16668]

Prueba-F para comparar Desviaciones Estándar

Hipótesis Nula:  $\sigma_1 = \sigma_2$

Hipótesis Alt:  $\sigma_1 \neq \sigma_2$

F = 0,163254 valor-P = 0,0684505

No se rechaza la hipótesis nula para  $\alpha = 0,05$ .

**EFECTO DE LAS APH EN LA BEBIDA A BASE DE VEGETALES PREPARADA EN EL LABORATORIO**

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **ácido ascórbico** en las bebidas a base de vegetales tratadas a diferentes presiones y tiempos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	0.0362191	3	0.012073	0.26	0.8548
B:tiempo	14.7246	4	3.68116	78.64	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.47222	12	0.0393517	0.84	0.6124
RESIDUOS	0.8894	19	0.0468105		
TOTAL (CORREGIDO)	16.3845	38			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **compuestos fenólicos** en las bebidas a base de vegetales tratadas a diferentes presiones y tiempos.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	8042.95	3	2680.98	0.76	0.5285
B:tiempo	2766.22	4	691.556	0.20	0.9369
INTERACCIONES					
AB	25599.7	12	2133.31	0.61	0.8104
RESIDUOS	66727.5	19	3511.97		
TOTAL (CORREGIDO)	103156.	38			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

## Anexos

---

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **carotenoides totales** en las bebidas a base de vegetales tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	0.000746087	3	0.000248696	0.54	0.6626
B:tiempo	0.0606583	4	0.0151646	32.74	0.0000
INTERACCIONES					
AB	0.00892375	12	0.000743646	1.61	0.1724
RESIDUOS	0.0088	19	0.000463158		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0788667	38			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **a\*** en las bebidas a base de vegetales tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	6.81226	3	2.27075	539.31	0.0000
B:tiempo	7.90472	4	1.97618	469.35	0.0000
INTERACCIONES					
AB	3.97373	12	0.331144	78.65	0.0000
RESIDUOS	0.214733	51	0.00421046		
TOTAL (CORREGIDO)	16.8447	70			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **b\*** en las bebidas a base de vegetales tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	9.2911	3	3.09703	40.65	0.0000
B:tiempo	20.555	4	5.13875	67.45	0.0000
INTERACCIONES					
AB	19.0741	12	1.58951	20.86	0.0000
RESIDUOS	3.8854	51	0.0761843		
TOTAL (CORREGIDO)	48.5598	70			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **L\*** en las bebidas a base de vegetales tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	9.51077	3	3.17026	176.32	0.0000
B:tiempo	4.14217	4	1.03554	57.59	0.0000
INTERACCIONES					
AB	14.5486	12	1.21238	67.43	0.0000
RESIDUOS	0.917	51	0.0179804		
TOTAL (CORREGIDO)	26.2776	70			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **Chroma** en las bebidas a base de vegetales tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	11.2501	3	3.75003	47.13	0.0000
B:tiempo	24.4675	4	6.11686	76.88	0.0000
INTERACCIONES					
AB	20.7195	12	1.72663	21.70	0.0000
RESIDUOS	4.05772	51	0.0795631		
TOTAL (CORREGIDO)	55.4828	70			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### EFFECTO APH ZUMO DE NARANJA-LECHE Y BEBIDA DE VEGETALES

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **índice de pardeamiento** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	0,0357013	1	0,0357013	9520,33	0,0000
B:Presión	0,00011375	3	0,0000379167	10,11	0,0000
C:Tiempo	0,0000575	4	0,000014375	3,83	0,0099
INTERACCIONES					
AB	0,00022375	3	0,0000745833	19,89	0,0000
AC	0,0001175	4	0,000029375	7,83	0,0001
BC	0,0001925	12	0,0000160417	4,28	0,0002
ABC	0,0001325	12	0,0000110417	2,94	0,0051
RESIDUOS	0,00015	40	0,00000375		
TOTAL (CORREGIDO)	0,0366887	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**El StatAdvisor**

## Anexos

---

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de índice de pardeamiento en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 7 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre índice de pardeamiento con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de  $a^*$  en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	214,72	1	214,72	40846,18	0,0000
B:Presión	10,9828	3	3,66094	696,42	0,0000
C:Tiempo	2,1419	4	0,535474	101,86	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,95162	3	0,650541	123,75	0,0000
AC	8,44131	4	2,11033	401,45	0,0000
BC	5,17198	12	0,430999	81,99	0,0000
ABC	1,16737	12	0,0972807	18,51	0,0000
RESIDUOS	0,799033	152	0,0052568		
TOTAL (CORREGIDO)	235,065	191			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de  $a$  en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 7 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre  $a$  con un 95,0% de nivel de confianza.



Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **b\*** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	12905,9	1	12905,9	258855,27	0,0000
B:Presión	45,6372	3	15,2124	305,12	0,0000
C:Tiempo	8,60132	4	2,15033	43,13	0,0000
INTERACCIONES					
AB	10,9493	3	3,64978	73,20	0,0000
AC	30,7151	4	7,67877	154,01	0,0000
BC	30,6272	12	2,55227	51,19	0,0000
ABC	15,4868	12	1,29056	25,88	0,0000
RESIDUOS	7,57837	152	0,0498577		
TOTAL (CORREGIDO)	13945,6	191			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de **b** en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 7 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre **b** con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **L\*** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	75363,5	1	75363,5	2038391,35	0,0000
B:Presión	33,4463	3	11,1488	301,55	0,0000
C:Tiempo	4,30179	4	1,07545	29,09	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,12451	3	0,374837	10,14	0,0000
AC	22,7948	4	5,69871	154,14	0,0000
BC	22,7448	12	1,8954	51,27	0,0000
ABC	6,13935	12	0,511612	13,84	0,0000
RESIDUOS	5,61975	152	0,036972		
TOTAL (CORREGIDO)	79471,7	191			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

## Anexos

---

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de L en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 7 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre L con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **Chroma** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	12491,7	1	12491,7	241515,06	0,0000
B:Presión	49,7659	3	16,5886	320,73	0,0000
C:Tiempo	9,42063	4	2,35516	45,53	0,0000
INTERACCIONES					
AB	10,1355	3	3,37849	65,32	0,0000
AC	34,5316	4	8,6329	166,91	0,0000
BC	32,9011	12	2,74176	53,01	0,0000
ABC	15,5502	12	1,29585	25,05	0,0000
RESIDUOS	7,86178	152	0,0517223		
TOTAL (CORREGIDO)	13537,4	191			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de Chroma en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 7 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Chroma con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de  $\Delta E$  en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	0,0000534405	1	0,0000534405	0,00	0,9648
B:Presión	13,527	3	4,50898	164,41	0,0000
C:Tiempo	85,7166	4	21,4292	781,37	0,0000
INTERACCIONES					
AB	59,1679	3	19,7226	719,14	0,0000
AC	3,66701	4	0,916752	33,43	0,0000
BC	14,0267	12	1,16889	42,62	0,0000
ABC	35,5742	12	2,96452	108,09	0,0000
RESIDUOS	4,16863	152	0,0274252		
TOTAL (CORREGIDO)	228,41	191			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de  $\Delta E$  en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 6 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre AE con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **ácido ascórbico** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	1918,84	1	1918,84	14861,48	0,0000
B:Presión	7,53768	3	2,51256	19,46	0,0000
C:Tiempo	22,975	4	5,74376	44,49	0,0000
INTERACCIONES					
AB	7,45704	3	2,48568	19,25	0,0000
AC	2,36735	4	0,591838	4,58	0,0038
BC	3,80827	12	0,317356	2,46	0,0165
ABC	2,94351	12	0,245293	1,90	0,0642
RESIDUOS	5,1646	40	0,129115		
TOTAL (CORREGIDO)	1971,09	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de ácido ascórbico en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por

## Anexos

---

omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 6 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre ácido ascórbico con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **compuestos fenólicos** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	63903,2	1	63903,2	23,45	0,0000
B:Presión	16399,1	3	5466,38	2,01	0,1286
C:Tiempo	30038,9	4	7509,72	2,76	0,0409
INTERACCIONES					
AB	13539,6	3	4513,19	1,66	0,1919
AC	33538,9	4	8384,73	3,08	0,0267
BC	40617,9	12	3384,83	1,24	0,2901
ABC	25412,8	12	2117,73	0,78	0,6699
RESIDUOS	109021,	40	2725,53		
TOTAL (CORREGIDO)	332472,	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de compuestos fenólicos en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre compuestos fenólicos con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **carotenoides totales** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	0,313	1	0,313	1238,75	0,0000
B:Presión	0,0002795	3	0,0000931667	0,37	0,7760
C:Tiempo	0,0327077	4	0,00817692	32,36	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,0014675	3	0,000489167	1,94	0,1393
AC	0,0343937	4	0,00859842	34,03	0,0000
BC	0,00464413	12	0,00038701	1,53	0,1532
ABC	0,00518613	12	0,000432177	1,71	0,1010
RESIDUOS	0,010107	40	0,000252675		
TOTAL (CORREGIDO)	0,401786	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de carotenoides totales en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre carotenoides totales con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **capacidad antioxidante (TEAC)** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	2,38548E6	1	2,38548E6	127,57	0,0000
B:Presión	5,16457E6	3	1,72152E6	92,06	0,0000
C:Tiempo	3,08345E6	4	770864,	41,22	0,0000
INTERACCIONES					
AB	631983,	3	210661,	11,27	0,0000
AC	479965,	4	119991,	6,42	0,0001
BC	2,33387E6	12	194489,	10,40	0,0000
ABC	735487,	12	61290,6	3,28	0,0005
RESIDUOS	1,96348E6	105	18699,8		
TOTAL (CORREGIDO)	1,82798E7	144			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### El StatAdvisor

## Anexos

---

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de TEAC en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 7 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre TEAC con un 95,0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores para los valores de **capacidad antioxidante (ORAC)** en las bebidas tratadas a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Tipo muestra	253,415	1	253,415	19697,41	0,0000
B:Presión	2,52457	3	0,841525	65,41	0,0000
C:Tiempo	1,44405	4	0,361012	28,06	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,02028	3	0,340093	26,43	0,0000
AC	0,892364	4	0,223091	17,34	0,0000
BC	1,18658	12	0,0988813	7,69	0,0000
ABC	1,35477	12	0,112898	8,78	0,0000
RESIDUOS	0,514616	40	0,0128654		
TOTAL (CORREGIDO)	262,352	79			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de ORAC en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 7 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre ORAC con un 95,0% de nivel de confianza.

ZUMO DE ARÁNDANOS

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **ácido ascórbico** en zumo de arándanos tratado a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	4.76444	2	2.38222	52.94	0.0000
B:Tiempo	0.0344444	2	0.0172222	0.38	0.6926
INTERACCIONES					
AB	0.178889	4	0.0447222	0.99	0.4586
RESIDUOS	0.405	9	0.045		
TOTAL (CORREGIDO)	5.38278	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **compuestos fenólicos** en zumo de arándanos tratado a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	426752.	2	213376.	15.92	0.0011
B:Tiempo	94051.6	2	47025.8	3.51	0.0747
INTERACCIONES					
AB	390744.	4	97686.0	7.29	0.0067
RESIDUOS	120618.	9	13402.0		
TOTAL (CORREGIDO)	1.03217E6	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de contenido en **antocianinas totales** en zumo de arándanos tratado a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	0.00129253	2	0.000646264	0.57	0.5826
B:Tiempo	0.00447635	2	0.00223818	1.99	0.1927
INTERACCIONES					
AB	0.00950089	4	0.00237522	2.11	0.1619
RESIDUOS	0.0101327	9	0.00112585		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0254024	17			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

## Anexos

---

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **a\*** en zumo de arándanos tratado a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	0.0154741	2	0.00773704	1.55	0.2400
B:Tiempo	0.00160741	2	0.000803704	0.16	0.8528
INTERACCIONES					
AB	0.042637	4	0.0106593	2.13	0.1189
RESIDUOS	0.0900667	18	0.0050037		
TOTAL (CORREGIDO)	0.149785	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **b\*** en zumo de arándanos tratado a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	7.16762	2	3.58381	609.34	0.0000
B:Tiempo	0.0772667	2	0.0386333	6.57	0.0072
INTERACCIONES					
AB	1.85804	4	0.464511	78.98	0.0000
RESIDUOS	0.105867	18	0.00588148		
TOTAL (CORREGIDO)	9.2088	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **L\*** en zumo de arándanos tratado a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Presión	0.909719	2	0.454859	24.50	0.0000
B:Tiempo	0.0378296	2	0.0189148	1.02	0.3809
INTERACCIONES					
AB	0.436637	4	0.109159	5.88	0.0033
RESIDUOS	0.3342	18	0.0185667		
TOTAL (CORREGIDO)	1.71839	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de **Chroma** en zumo de arándanos tratado a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Presión	7.1357	2	3.56785	592.45	0.0000
B: Tiempo	0.075763	2	0.0378815	6.29	0.0085
INTERACCIONES					
AB	1.83415	4	0.458537	76.14	0.0000
RESIDUOS	0.1084	18	0.00602222		
TOTAL (CORREGIDO)	9.15401	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores para los valores de  $\Delta E$  en zumo de arándanos tratado a diferentes presiones y tiempos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Presión	0.621956	2	0.310978	19.79	0.0000
B: Tiempo	0.0950092	2	0.0475046	3.02	0.0738
INTERACCIONES					
AB	0.18908	4	0.0472699	3.01	0.0459
RESIDUOS	0.282808	18	0.0157116		
TOTAL (CORREGIDO)	1.18885	26			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de  $\Delta E$  en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre  $\Delta E$  con un 95.0% de nivel de confianza.

## Anexos

### *EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EN ARÁNDANOS*

Concentraciones de diversos compuestos antioxidantes tras aplicar tratamiento térmico a pulpa de arándanos y posterior extracción

	Tiempo (min)	CDI (%)	Agua-etanol (v:v)	FST (mg GAE/g)	AT (mg/g)	TEAC ( $\mu$ mol/g)
Temperatura: 85°C	0	0	80:20	0.79 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	15.65 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
	2	16	80:20	1.11 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	21.14 $\pm$ 1.23 <sup>b</sup>
	30	32	80:20	1.17 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	20.86 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>
	60	44	80:20	1.34 $\pm$ 0.03 <sup>c</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	22.29 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>
	0	0	20:80	1.39 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.44 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	24.13 $\pm$ 0.66 <sup>a</sup>
	2	16	20:80	2.06 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup>	0.52 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	31.48 $\pm$ 0.81 <sup>b</sup>
	30	32	20:80	2.20 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	0.46 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	33.68 $\pm$ 0.85 <sup>bc</sup>
	60	44	20:80	2.24 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	0.45 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	34.63 $\pm$ 1.06 <sup>c</sup>

a-c distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado para una mezcla. FST: fenoles solubles totales. AT: antocianinas totales.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **FST** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento térmico

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFEITOS PRINCIPALES					
A:CDI	323136.	3	107712.	63.04	0.0008
RESIDUOS	6834.52	4	1708.63		
TOTAL (CORREGIDO)	329971.	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de FST en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre FST con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **AT** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento térmico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	0.3505	3	0.116833	9.64	0.0266
RESIDUOS	0.0485	4	0.012125		
TOTAL (CORREGIDO)	0.399	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de AT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre AT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **TEAC** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento térmico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	52.4906	3	17.4969	43.72	0.0016
RESIDUOS	1.60083	4	0.400207		
TOTAL (CORREGIDO)	54.0915	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CAT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CAT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **FST** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento térmico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	943540.	3	314513.	98.86	0.0003
RESIDUOS	12725.1	4	3181.29		
TOTAL (CORREGIDO)	956265.	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

## Anexos

---

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de FST en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre FST con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **AT** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento térmico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	0.78615	3	0.26205	23.71	0.0052
RESIDUOS	0.0442	4	0.01105		
TOTAL (CORREGIDO)	0.83035	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de AT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre AT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **TEAC** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento térmico

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	135.416	3	45.1386	61.08	0.0008
RESIDUOS	2.95621	4	0.739053		
TOTAL (CORREGIDO)	138.372	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CAT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CAT con un 95.0% de nivel de confianza.

Concentraciones de diversos compuestos antioxidantes tras aplicar APH a pulpa de arándanos y posterior extracción

	Tiempo (min)	CDI (%)	Agua- etanol (v:v)	FST (mg GAE/g)	AT (mg/g)	TEAC ( $\mu$ mol/g)
APH: 600 MPa	0	0	80:20	0.85 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	12.57 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>
	5	5	80:20	1.06 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	0.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	16.01 $\pm$ 0.61 <sup>b</sup>
	9	8	80:20	0.84 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.26 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	14.00 $\pm$ 0.91 <sup>a</sup>
	15	15	80:20	0.89 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	13.99 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>
	0	0	20:80	1.30 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	20.84 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup>
	5	5	20:80	1.41 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.51 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	21.35 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
	9	8	20:80	1.37 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.54 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	22.91 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>
	15	15	20:80	1.34 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	0.53 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	22.01 $\pm$ 1.44 <sup>a</sup>

<sup>a-c</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado para una mezcla. APH: altas presiones hidrostáticas. FST: fenoles solubles totales. AT: antocianinas totales.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **FST** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por APH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	64470.5	3	21490.2	18.96	0.0079
RESIDUOS	4532.84	4	1133.21		
TOTAL (CORREGIDO)	69003.4	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de FST en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre FST con un 95.0% de nivel de confianza.

## Anexos

---

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **AT** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por APH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	0.151038	3	0.0503458	5.78	0.0616
RESIDUOS	0.03485	4	0.0087125		
TOTAL (CORREGIDO)	0.185887	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de AT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre AT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **CAT** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por APH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	11.9578	3	3.98592	8.10	0.0356
RESIDUOS	1.96841	4	0.492102		
TOTAL (CORREGIDO)	13.9262	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CAT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CAT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **FST** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por APH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	14240.7	3	4746.89	30.25	0.0033
RESIDUOS	627.631	4	156.908		
TOTAL (CORREGIDO)	14868.3	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de FST en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre FST con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **AT** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por APH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	3.6349	3	1.21163	82.85	0.0005
RESIDUOS	0.0585	4	0.014625		
TOTAL (CORREGIDO)	3.6934	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de AT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre AT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **CAT** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por APH

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	4.82766	3	1.60922	1.59	0.3235
RESIDUOS	4.03624	4	1.00906		
TOTAL (CORREGIDO)	8.8639	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CAT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CAT con un 95.0% de nivel de confianza.

## Anexos

Concentraciones de diversos compuestos antioxidantes tras aplicar PEAI a pulpa de arándanos y posterior extracción

	Energía (kJ/kg)	CDI (%)	Agua-etanol (v:v)	FST (mg GAE/g)	AT (mg/g)	TEAC ( $\mu$ mol/g)
E: 16 kV/cm	0	0	80:20	1.26 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	20.19 $\pm$ 0.49 <sup>a</sup>
	10	20	80:20	1.27 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.31 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	20.88 $\pm$ 2.75 <sup>a</sup>
	20	30	80:20	1.09 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.31 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	24.77 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>
	30	40	80:20	1.29 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	0.34 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	22.22 $\pm$ 2.26 <sup>a</sup>
	0	0	20:80	1.63 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	0.48 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	27.89 $\pm$ 1.05 <sup>a</sup>
	10	20	20:80	1.61 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	28.87 $\pm$ 0.73 <sup>a</sup>
	20	30	20:80	1.64 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.70 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	32.97 $\pm$ 0.96 <sup>b</sup>
	30	40	20:80	1.63 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	0.74 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	40.37 $\pm$ 0.40 <sup>c</sup>

E: campo eléctrico. <sup>a-d</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado para una mezcla. FST: fenoles solubles totales. AT: antocianinas totales.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **FST** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por PEAI

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	122590.	3	40863.5	47.15	0.0014
RESIDUOS	3466.72	4	866.681		
TOTAL (CORREGIDO)	126057.	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de FST en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre FST con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **AT** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por PEAI

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	0.150244	3	0.0500815	14.15	0.0135
RESIDUOS	0.0141595	4	0.00353987		
TOTAL (CORREGIDO)	0.164404	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual



**El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de AT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre AT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **CAT** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por PEAI

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFEITOS PRINCIPALES					
A:CDI	24.0295	3	8.00983	2.46	0.2027
RESIDUOS	13.0379	4	3.25948		
TOTAL (CORREGIDO)	37.0674	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CAT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CAT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **FST** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por PEAI

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFEITOS PRINCIPALES					
A:CDI	980.729	3	326.91	0.05	0.9841
RESIDUOS	27195.8	4	6798.95		
TOTAL (CORREGIDO)	28176.5	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

**El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de FST en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre FST con un 95.0% de nivel de confianza.

## Anexos

---

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **AT** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por PEAI

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	9.48883	3	3.16294	375.51	0.0000
RESIDUOS	0.0336925	4	0.00842312		
TOTAL (CORREGIDO)	9.52252	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de AT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre AT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **CAT** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por PEAI

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	193.377	3	64.459	94.88	0.0004
RESIDUOS	2.71737	4	0.679342		
TOTAL (CORREGIDO)	196.094	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CAT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CAT con un 95.0% de nivel de confianza.

Concentraciones de diversos compuestos antioxidantes tras aplicar ultrasonidos a pulpa de arándanos y posterior extracción

	Energía (kJ/kg)	CDI (%)	Agua- etanol (v:v)	FST (mg GAE/g)	AT (mg/g)	TEAC ( $\mu$ mol/g)
Amplitud: 101.4 $\mu$ m	0	0	80:20	1.13 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.29 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	15.91 $\pm$ 1.35 <sup>ab</sup>
	23	3	80:20	1.11 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.28 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	15.77 $\pm$ 0.24 <sup>ab</sup>
	47	8	80:20	1.19 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	0.30 $\pm$ 0.01 <sup>ab</sup>	14.84 $\pm$ 1.01 <sup>a</sup>
	350	15	80:20	1.23 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	0.29 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	17.30 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>
	0	0	20:80	1.47 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.42 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	13.40 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>
	23	3	20:80	1.69 $\pm$ 0.00 <sup>b</sup>	0.46 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	12.76 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup>
	47	8	20:80	1.61 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.45 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	18.04 $\pm$ 1.97 <sup>b</sup>
	350	15	20:80	1.61 $\pm$ 0.00 <sup>c</sup>	0.45 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	21.32 $\pm$ 0.24 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> distinto superíndice en una misma columna indica diferencias estadísticamente significativas en función del tratamiento aplicado para una mezcla. FST: fenoles solubles totales. AT: antocianinas totales.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **FST** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por US

Fuente	Suma de Cuadrados	de Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	16467.3	3	5489.11	19.74	0.0073
RESIDUOS	1112.34	4	278.085		
TOTAL (CORREGIDO)	17579.7	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de FST en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre FST con un 95.0% de nivel de confianza.

## Anexos

---

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **AT** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por US

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	0.0525375	3	0.0175125	9.40	0.0277
RESIDUOS	0.00745	4	0.0018625		
TOTAL (CORREGIDO)	0.0599875	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de AT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre AT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **CAT** en extracto agua-metanol (80:20, v/v) tras previo tratamiento por US

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	6.14687	3	2.04896	3.32	0.1381
RESIDUOS	2.46592	4	0.616479		
TOTAL (CORREGIDO)	8.61278	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CAT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CAT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **FST** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por US

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	48293.0	3	16097.7	190.35	0.0001
RESIDUOS	338.28	4	84.57		
TOTAL (CORREGIDO)	48631.3	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

### El StatAdvisor

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de FST en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre FST con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **AT** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por US

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	0.1599	3	0.0533	6.01	0.0580
RESIDUOS	0.0355	4	0.008875		
TOTAL (CORREGIDO)	0.1954	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de AT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que ningún valor-P es menor que 0.05, ninguno de los factores tiene un efecto estadísticamente significativo sobre AT con un 95.0% de nivel de confianza.

Análisis de la varianza (ANOVA) para los valores de **CAT** en extracto agua-metanol (20:80, v/v) tras previo tratamiento por US

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>de Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:CDI	98.1314	3	32.7105	22.26	0.0059
RESIDUOS	5.87913	4	1.46978		
TOTAL (CORREGIDO)	104.011	7			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

#### **El StatAdvisor**

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de CAT en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que un valor-P es menor que 0.05, este factor tiene un efecto estadísticamente significativo sobre CAT con un 95.0% de nivel de confianza.

