

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciada en Ingeniería de
Alimentos

**Efecto del tiempo de aplicación de ultrasonido sobre los compuestos bioactivos polares
y capacidad antioxidante hidrofílica del jugo de naranja**

Elaborado por:
Jimena Brenes León
Carné: A91046

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Octubre, 2020

Tribunal examinador

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Tecnología de Alimentos como requisito parcial para optar por el grado de Licenciada en Ingeniería de Alimentos

Elaborado por:

Jimena Brenes León

Aprobado por:

M. Sc. Ana Lucía Mayorga Gross
Presidenta del tribunal

Ph.D. Eric Wong González
Director del proyecto

M. Sc. Carolina Cortés Herrera
Asesora del proyecto

Ph.D. Jessie Usaga Barrientos
Asesora del proyecto

Ph.D Patricia Esquivel Rodríguez
Profesora designada

Dedicatoria

A mi mamá, Laura.

A mi hermana, Marcia.

Y a mi abuelita, Carmela.

ÍNDICE GENERAL

Tribunal examinador.....	2
Dedicatoria.....	3
Resumen.....	8
1. Justificación.....	9
2. Objetivos.....	13
2.1 Objetivo general.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. Marco Teórico.....	14
3.1 Generalidades de los jugos.....	14
3.2 Importancia económica y comercial del jugo de naranja.....	15
3.3 Aspectos nutricionales y funcionales del jugo de naranja.....	16
3.4 Parámetros de calidad del jugo de naranja.....	18
3.4.1 Parámetros químicos.....	19
3.4.1.1 Capacidad antioxidante hidrofílica de radicales de oxígeno.....	19
3.4.1.2 Perfil de ácidos orgánicos.....	20
3.4.2 Parámetros nutricionales.....	21
3.4.2.1 Vitamina C.....	21
3.4.2. Perfil y contenido total de polifenoles.....	23
3.5 Procesamiento de jugo de naranja.....	27
3.5.1 Métodos térmicos de conservación.....	32
3.5.2 Métodos atérmicos de conservación.....	33
3.6 Ultrasonido.....	34
3.6.1 Estudios científicos con aplicación de ultrasonido a jugo de naranja.....	38
4. Materiales y métodos.....	39
4.1 Localización del proyecto.....	39
4.2 Materias primas.....	39
4.3 Descripción del tratamiento utilizado.....	39
4.3.1 Equipo utilizado.....	39
4.3.2 Descripción experimental por objetivos.....	41
4.3.2.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles.....	41

4.3.2.2 Efecto del tiempo de sonicación sobre el perfil de ácidos orgánicos y vitamina C.....	41
4.3.2.3 Efecto del tiempo de sonicación sobre la capacidad antioxidante hidrofílica del jugo de naranja.....	42
4.4 Métodos de análisis.....	43
4.4.1 Contenido de humedad.....	43
4.4.2 pH.....	43
4.4.3 Sólidos solubles.....	43
4.4.4 Acidez titulable.....	44
4.4.5 Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC-H).....	44
4.4.6 Perfil de ácidos orgánicos.....	44
4.4.7 Polifenoles.....	45
4.4.7.1 Extracción.....	45
4.4.7.2 Perfil de polifenoles.....	45
4.4.8 Vitamina C total.....	46
5. Resultados y discusión.....	48
5.1 Evaluación del efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles ...	48
5.1.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles totales	48
5.1.2 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de flavanonas	49
5.2 Evaluación del efecto del tiempo de sonicación sobre el perfil de ácidos orgánicos y contenido de vitamina C.....	55
5.2.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de vitamina C	55
5.1.4 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de ácidos orgánicos.....	57
5.3 Efecto del tiempo de sonicación sobre la capacidad antioxidante hidrofílica	58
6. Conclusiones.....	62
7. Recomendaciones.....	63
8. Referencias bibliográficas	64
9. Anexos.....	75
Anexo I. Certificado de análisis del estándar de naringenina	75
Anexo II. Características iniciales del jugo de naranja	76
Anexo III. Espectro de absorción de la señal 2 del patrón de naringenina a 100 ppm	76
Anexo IV. Espectro de absorción de la señal 1 del patrón de naringenina a 100 ppm	77

Anexo V. Espectro de absorción del patrón de hesperetina a 100 ppm.....	78
Anexo VI. Espectro de absorción del extracto de polifenoles de jugo de naranja.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la naringenina y la hesperetina	26
Figura 2. Diagrama de flujo para obtener jugo de naranja concentrado	31
Figura 3. Diagrama del sistema de sonicación directa con recirculación.	40
Figura 4. Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles totales de jugo de naranja.	48
Figura 5. Cromatograma del estándar de hesperetina 100 ppm analizado por HPLC-DAD a 290 nm.	50
Figura 6. Cromatograma del estándar de naringenina 100 ppm analizado por HPLC-DAD a 290 nm.	51
Figura 7. Cromatogramas sobrepuestos del estándar de hesperetina 100 ppm (azul), estándar de naringenina 100 ppm (rojo) y de un extracto de jugo de naranja analizado (café). Analizados por HPLC-DAD a 290 nm, C18, 0,3 mL/ min, 30 °C, fase A: ácido fórmico 0,1%, fase B: acetonitrilo 98%	53
Figura 8. Cromatogramas: I) Estándar de hesperetina 100 ppm (azul). II) Estándar de naringenina 100 ppm (rojo). III) Extracto de jugo de naranja analizado (café). Analizados por HPLC-DAD a 290 nm, C18, 0,3 mL/ min, 30 °C, fase A: ácido fórmico 0,1%, fase B: acet onitrilo 98%	54
Figura 9. Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de equivalentes de naringenina en el jugo de naranja.	55
Figura 10. Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de vitamina C total en el jugo de naranja.....	56
Figura 11. Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de a) ácido cítrico, b) ácido málico y c) ácido succínico.....	58
Figura 12. Efecto del tiempo de sonicación sobre la capacidad antioxidante hidrofílica.....	59

Resumen

Jimena Brenes León

Efecto del tiempo de aplicación de ultrasonido sobre los compuestos bioactivos polares y capacidad antioxidante hidrofílica del jugo de naranja

Licenciatura en Ingeniería de Alimentos.-San José, CR.

Brenes León, J. 2020

79 h, 12 il.- 154 refs.

El propósito de esta investigación fue evaluar el efecto del tiempo de sonicación sobre los compuestos bioactivos hidrofílicos y la capacidad antioxidante hidrofílica, determinada por el método ORAC, del jugo de naranja fresco y así analizar las consecuencias que esta tecnología puede tener sobre la calidad nutricional de este alimento. Se sonicaron (20 kHz, 40% amplitud, procesamiento directo y continuo, 25 °C, 106 mL/min) muestras de 300 mL de tres lotes de jugo de naranja a seis tiempos diferentes (0, 20, 40, 60, 80 y 105 min). A 100 mL de las muestras se les aplicó una extracción con metanol al 90% para obtener un extracto fenólico para analizar los polifenoles totales, contenido de hesperetina, naringenina y la capacidad antioxidante hidrofílica. A los restantes 200 mL de cada muestra se les analizó el contenido de vitamina C total y perfil de ácidos orgánicos. Se analizaron las tendencias de las variables respuesta en el tiempo para determinar si había diferencias significativas, usando análisis de varianza con $\alpha = 0,05$. Se observó que el tiempo de sonicación no tuvo un efecto significativo sobre el contenido de: polifenoles totales, equivalentes de naringenina, vitamina C total y ácido cítrico, málico y succínico. Sin embargo, se determinó que el tiempo de sonicación sí afecta la capacidad antioxidante hidrofílica, la cual aumenta al incrementar el tiempo de sonicación. Se concluye que el ultrasonido, bajo las condiciones utilizadas en esta investigación, se podría usar como parte de otras aplicaciones tecnológicas en jugo de naranja y otros jugos de fruta con concentraciones de compuestos hidrofílicos similares, sin afectar la concentración de estos.

JUGO DE NARANJA, ULTRASONIDO, COMPUESTOS BIOACTIVOS POLARES, H-ORAC

Ph.D Eric Wong González

Escuela de Tecnología de Alimentos.

1. Justificación

El Codex Alimentarius (2005) define el jugo de frutas como el “líquido no fermentado pero fermentable obtenido de la parte comestible de fruta madura y fresca o mantenida correctamente bajo las condiciones apropiadas, sin defectos”. El consumo de jugos y concentrados de frutas es una de las formas más populares de consumir este tipo de alimentos y, por lo tanto, una de las principales fuentes de fitoquímicos (McLellan & Padilla, 2004). Es debido a esto, que los jugos de frutas y los productos que los contienen conforman un grupo de gran importancia económica dentro de la industria procesadora de frutas (Falguera & Ibarz, 2014).

Puesto que los jugos de frutas tienen un papel destacado dentro del procesamiento de frutas, los productores se han tenido que adaptar a las tendencias cambiantes del mercado que cada vez se inclinan más hacia la calidad del bien y no tanto a la cantidad. El establecimiento de estas nuevas preferencias en los consumidores ha desembocado en la aparición de nuevas tecnologías y permutaciones sociales, económicas e incluso ambientales (Cubero, 2014).

En el escalafón global, el jugo de naranja es el jugo de mayor consumo. En el año 2010, el jugo de naranja representaba el 54% del jugo consumido en Estado Unidos y en la Unión Europea, abarcaba el 38,5% en el 2011. La producción de jugo de naranja históricamente ha sido liderada por Brasil, aunque en la última década la producción ha disminuido pues parte de la siembra se ha trasladado a Florida, Estados Unidos (Clay, 2004).

Las contracciones recientes en el mercado brasileño, por la competencia, y norteamericano, por desastres naturales, favorecen a países centroamericanos como Costa Rica, donde la producción y la comercialización del jugo de naranja han ido adquiriendo mayor relevancia. Los autores Fava *et al.* (2019) explican que el 80% de la producción de jugo de naranja a nivel mundial es dominada por Sao Paulo y Florida y como resultado existe una gran variabilidad en el volumen de producción y la oferta de este bien. En relación a lo anterior, la Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER) nota desde el 2014 que, la

contracción mundial de la oferta de jugo de naranja, además de provocar incrementos en los precios, trae oportunidades para abastecer la demanda insatisfecha.

PROCOMER también indica que, en el 2014 las cifras de exportación de este producto alcanzaron 46,2 millones de dólares, lo cual equivale aproximadamente a 26 mil toneladas de jugo. En el año 2015, las exportaciones nacionales de jugos y concentrados de frutas aumentaron en un 9,2%. Este incremento lo componen el jugo de naranja (34%) y el jugo de piña (64%). En particular, las exportaciones de jugo de naranja incrementaron a un ritmo de 4,2% anual en el ese mismo año, de acuerdo con Gamboa (2015). En su informe de gestión, PROCOMER (2018) revela que entre 2012 y 2017 las exportaciones de jugos y concentrados de frutas crecieron un 12% en promedio. Sin embargo, la Cámara Costarricense de la Industria Alimentaria (CACIA) publicó en el 2019 que PROCOMER señaló después que para el tercer trimestre del 2018 la exportación de jugos y concentrados de frutas disminuyó en un 18%. Lo anterior confirma lo cambiante que puede ser el mercado de productos como el jugo de naranja.

La aceptación e importancia del jugo de naranja se deben en gran medida a sus características inherentes. El sabor y el aroma particular de este alimento son atributos esenciales de la calidad del jugo de naranja, al punto que a la hora de pasteurizar se diseña el proceso de manera que estos elementos logren conservarse en la medida de lo posible (Velázquez *et al.*, 2016). Los compuestos químicos, de acuerdo con Yuan & Baduge (2018) y Kundu *et al.* (2018), que dan estos rasgos al jugo de naranja son, principalmente: limoneno, mirceno, α -pineno, decanal, octanal, etil butonoato, acetaldehído (sobre todo en jugo fresco) y el linalool. Sin embargo, se ha encontrado que la aplicación de calor sobre el jugo de naranja altera de forma negativa el sabor y olor de este, al disminuir las concentraciones de los compuestos mencionados (Reyes *et al.*, 2014).

La calidad del jugo de naranja se asocia además con el amargor. Este sabor, que puede llegar a afectar la aceptación del consumidor, se puede desarrollar durante su elaboración, particularmente por la presencia de limonina, naringina y taninos (Kundu *et al.*, 2018). Estos

dos últimos pertenecen a la categoría de compuestos fenólicos y son metabolitos secundarios de las plantas. Los taninos en especial pueden precipitar proteínas y otros compuestos como aminoácidos y alcaloides. Además, son responsables de la astringencia que puede dar la sensación de sequedad mientras que la limonina es responsable por el amargor tardío que en ocasiones se puede sentir (Sánchez *et al.*, 2003).

Los polifenoles, aunque pueden producir efectos negativos como el amargor, son compuestos bioactivos importantes presentes en el jugo de naranja que lo convierten en un alimento funcional. En el jugo de naranja son particularmente relevantes las flavanonas como naringenina y sus glucósidos naringina y narirutina y también la hesperetina y sus glucósidos hesperidina y neohesperidina (Siracusa & Ruberto, 2019; Cassidy & Kay, 2011).

Se ha determinado que el contenido total de polifenoles en jugo de naranja recién exprimido puede variar enormemente dependiendo del tipo de naranja, del lugar de origen y las condiciones de cultivo. Así, se han medido valores entre 421 -1353 mg equivalentes de ácido gálico por litro (Yuan & Baduge, 2018). Además, la proporción en la que se encuentra cada compuesto depende de la forma en la que se extrae el jugo. Estos compuestos fenólicos hidrofílicos se relacionan proporcionalmente con la actividad antioxidante hidrofílica (AAH), y se han asociado con propiedades anticancerígenas, antiaterogénicas, antiinflamatorias y antimicrobianas (Lu *et al.*, 2018).

Por otro lado, el jugo de naranja es una fuente importante de vitamina C (Sánchez *et al.*, 2003). Esto aumenta el valor nutricional del jugo de naranja como antioxidante y su consumo se asocia al aumento de lipoproteínas de alta densidad (HDL), a la reducción de la oxidación de lípidos y a la acumulación de estos en las paredes vasculares. Además esta vitamina fortalece el sistema inmunológico y reduce la probabilidad de padecer Alzheimer (Kelebek *et al.*, 2009).

La calidad general del jugo de naranja se asocia en gran medida a su perfil de ácidos orgánicos los cuales son indicadores de autenticidad y adecuada calidad del jugo, permiten determinar si hubo una adulteración y qué tan fresco es el producto (Hammond, 2016). En el

jugo de naranja los más importantes son el ácido cítrico, el málico y en menor medida el succínico. Los ácidos orgánicos también pueden influir en las características sensoriales y estabilidad del jugo (Blanco & Mangas, 2004).

En la actualidad se han desarrollado tecnologías que permiten extender la vida útil del jugo de naranja sin afectar las propiedades favorables a la salud que los consumidores esperan, ya que las técnicas actuales como los tratamientos térmicos afectan la estabilidad de los compuestos bioactivos mencionados (Sánchez *et al.*, 2005). Así, se han estudiado métodos no térmicos que permitan la inactivación de microorganismos y enzimas conservando a la vez, la calidad y perfil nutricional del producto en cuestión.

El uso de ultrasonido o sonicación, en combinación con otros métodos de conservación, ha acaparado la atención de diversas investigaciones y se ha estudiado como sustituto de la pasteurización en jugo de naranja (Valero *et al.*, 2007). Esta técnica consiste en la generación de pulsaciones sobre una matriz para formar cavidades que crecen y luego colapsan. Cuando esto sucede, las paredes celulares se rompen y esto da lugar a la liberación de compuestos bioactivos ligados a dicha pared celular. De esta forma se aumenta la disponibilidad en la matriz y esto implica una eventual mayor absorción. Este rompimiento de la pared celular ha encontrado aplicación en la eliminación de microorganismos presentes en la matriz también (Rodrigues *et al.*, 2015).

Se debe tomar en cuenta que este método requiere de un cuidadoso control de las condiciones de trabajo ya que compuestos inestables pueden degradarse y perder actividad biológica. Sin embargo, todavía no se cuenta con suficiente información respecto al efecto que tiene este tipo de tratamiento sobre las propiedades y características de los alimentos. Además, es necesario determinar cuáles son las condiciones de proceso que permiten conservar la calidad del producto, pues, por ejemplo, al usar tratamientos de alta potencia (mayores a 1 W/cm²), aunque se logran destruir células microbianas, se pueden alterar estructuras de algunos compuestos que más bien se desean conservar pues le dan valor nutricional al producto. La sonicación puede ser utilizada en un proceso sin afectar las características del producto o

puede estar directamente involucrado en el proceso y resaltar transformaciones físicas en el producto (Bhattacharjee *et al.*, 2019).

Este estudio buscaba analizar el efecto de distintos tiempos de tratamiento con ultrasonido sobre los compuestos bioactivos hidrofílicos y la capacidad antioxidante. Así, se puede valorar este tipo de tecnología como una posible opción para procesar jugos, en particular el de naranja, preservando los compuestos con potenciales efectos beneficiosos a la salud humana y las características que espera el consumidor en el producto procesado.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de ultrasonido a diferentes tiempos sobre los compuestos bioactivos polares y la capacidad antioxidante del jugo de naranja

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles totales en el jugo de naranja
- Evaluar el efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de los principales ácidos orgánicos y vitamina C total en el jugo de naranja.
- Evaluar el efecto del tiempo de sonicación en la capacidad antioxidante hidrofílica (H-ORAC) del jugo de naranja.

3. Marco Teórico

3.1 Generalidades de los jugos

La elaboración de jugos es una de las formas más comunes e importantes de procesar y conservar frutas. Esto se debe a que se considera una manera práctica de consumir este alimento y aprovechar sus nutrientes. Además, es una forma de consumir frutas estacionales durante todo el año, disminuyen las pérdidas de frutas y vegetales, pues se pueden usar productos que no son aptos para vender frescos

al no calificar como producto conforme y permite alargar la vida útil de la fruta en forma de jugo procesado. Por otra parte, al transformar la fruta en un producto líquido es mucho más fácil su manejo (Rajauria & Tiwari, 2017).

Los jugos de frutas son productos que se ofrecen refrigerados, congelados o en anaquel a temperatura ambiente y en una variedad de tipos de empaques. Actualmente, el consumidor busca que sean productos funcionales, que aporten beneficios a la salud (por ejemplo, que contengan vitaminas, minerales y/o fibra) y con sabores o mezclas innovadoras (Bogue & Troy, 2016).

De acuerdo con el Codex (2005), el jugo o zumo de fruta se define como el líquido sin fermentar, que se obtiene de frutas maduras y frescas y en buen estado por medio de procedimientos apropiados. Al elaborar jugos se puede hacer junto con otras partes de la fruta como las semillas o las cáscaras y es aceptable que el producto final contenga algunos residuos de estas partes cuando no se pueden eliminar mediante las diferentes etapas de la fabricación. La FDA (2018) también ha dado la definición de jugo y explica que se trata de un líquido acuoso exprimido o extraído de una o más frutas o vegetales, purés o porciones comestibles de una o más frutas o vegetales o cualquier otro concentrado de tal líquido o puré.

Otros autores indican, de manera simple, que el jugo es el líquido contenido naturalmente en el tejido de una fruta o un vegetal y agregan que se prepara mecánicamente por exprimir o macerar frutas frescas o tejido vegetal sin aplicar calor o utilizar solventes (NPCS, 2012).

Por otro lado, también existen definiciones más estrictas y detalladas. Un producto etiquetado como jugo debe ser elaborado en su totalidad (es decir el 100%), de fruta fresca. Estos son productos puros, sin preservantes, edulcorantes o colores artificiales y pueden contener o no pulpa de la misma fruta. Además, existen otras definiciones que se diferencian del término jugo en cuanto a sus componentes, por ejemplo, los denominados jugos reconstituidos o los néctares (Neves *et al.*, 2011).

3.2 Importancia económica y comercial del jugo de naranja

En un inicio las frutas cítricas se comercializaban únicamente como frutas frescas. Este tipo de producto agrícola posee la ventaja de que, luego de ser cosechado, es sumamente estable. Como resultado, se facilitaba su comercialización a escala internacional. Los cítricos no solo presentan ventajas postcosecha. La mayoría de las variedades de éstos se pueden dejar en el árbol sin cosechar, aún después de haber alcanzado el estado de maduración, sin que la fruta se deteriore o se pudra (Talon *et al.*, 2019).

Por todas estas ventajas, los cítricos se popularizaron y por lo tanto creció la superficie de siembra dedicada a estos productos, al punto que se volvió necesario industrializar su producción. Así, se favoreció la industria de las mermeladas, jaleas, aceites esenciales, que hasta el día de hoy siguen siendo relevantes. Sin embargo, la industria de los jugos es la que se ha desarrollado a mayor escala, sobre todo en lugares como California y Florida. No solo se diversificó en productos derivados, sino también en tecnología, para mejorar el procesamiento de jugos, desde la extracción hasta el almacenamiento (Neves, *et al.*, 2011).

En la actualidad se proyecta que para el año 2024 la industria de jugos de frutas y vegetales alcanzará un valor de 173 billones de dólares (Wood, 2019). Entre estos, el jugo de naranja sigue siendo de los más solicitados. Por ejemplo, en los países de la Unión Europea, representa casi el 40% del consumo total de jugos de frutas. En los Estados Unidos, a pesar de experimentar un declive en la demanda en comparación con otras frutas, el jugo de naranja sigue siendo el más consumido y representa entre 56% y 62% del consumo total (Falguera & Ibarz, 2014).

Debido a esta alta demanda y a pesar de que se ha visto una disminución respecto a años anteriores, se pronostica que para el 2020 la producción de jugo de naranja será de aproximadamente 1.7 millones de toneladas. Para esta misma temporada, se proyecta que Brasil y México serán los encargados de la mayor parte de esa producción (USDA, 2020). Si bien Costa Rica no es uno de los mayores productores, sí ocupa un lugar importante en la industria. Desde inicios del presente milenio, según reconoce la FAO (2003), Costa Rica se hizo sitio como productor de jugo de naranja orgánica al producir 50 000 toneladas métricas en el año 2001. En la siguiente década ya se contaba con empresas bien establecidas, como Ticofrut, que exportan a los principales mercados como Estados Unidos y el Reino Unido. Esta compañía reporta que, en el año 2012, obtuvo ingresos de 60 millones de dólares gracias a los concentrados de naranja y piña y expresan que sus clientes desean doblar la cantidad de la compra (Cisneros, 2012). Para octubre del 2018 se reportaba que Costa Rica había exportado 34 505 toneladas métricas de jugo concentrado de naranja, cantidad que tiene un valor de \$65,7 millones (USDA, 2018).

3.3 Aspectos nutricionales y funcionales del jugo de naranja

Las frutas tienen una importancia incuestionable en la dieta actual de las personas, sin importar origen o clase social. Sus jugos son de los derivados más populares de estos alimentos y su consumo es una de las formas más eficaces de ingerir los compuestos bioactivos que hacen que las frutas sean esenciales para la salud humana. Los jugos 100% fruta contienen nutrientes tales como vitaminas, minerales, oligoelementos, fitoquímicos y además aportan energía al organismo por su contenido de carbohidratos (Bhardwaj *et al.*, 2014).

Como fue mencionado anteriormente, el jugo de naranja es ampliamente consumido alrededor del mundo. La principal razón de su notoriedad es su efecto positivo en la salud por su contenido de compuestos biológicamente activos: contenido de vitamina C, compuestos fenólicos, carotenoides y azúcares (Tighe *et al.*, 2017). La ingesta de jugo de naranja, como señalan Gonçalves *et al.* (2018), se relaciona con la prevención de

enfermedades cardiovasculares (ECV) debido a que aportan vitamina C y flavonoides, un tipo de polifenoles, esto porque funcionan como antioxidantes minimizando el efecto de los radicales libres.

Los procesos de oxidación que sufre el cuerpo humano ya sean propios de su metabolismo o por factores externos provenientes de enfermedades crónicas como diabetes o ECV, infecciones o radiación, son causados por la presencia de especies de radicales libres (Fridovich, 2013). Los radicales libres son moléculas, o fragmentos de moléculas, que poseen un electrón de valencia sin aparear, en lugar de poseer un enlace covalente formado por un par de electrones de valencia. Debido a que poseen un electrón desapareado, tienen la tendencia a involucrarse en reacciones de reducción-oxidación, pues de esta forma se gana un electrón o se pierde y el producto es una especie más estable. Por lo tanto, usualmente, los radicales libres tienen una alta reactividad, son químicamente agresivos y tienen una vida corta, en su mayoría. Los radicales de oxígeno conforman un gran porcentaje de este tipo de moléculas (Borg, 2013).

Liou (2011) explica que el problema de la presencia de radicales libres en el cuerpo y de su alta reactividad, es que pueden oxidar las membranas celulares, proteínas y ADN, causando daños graves al alterar sus estructuras químicas. Este daño puede acumularse y llevar a la célula a la apoptosis. Lo anterior puede provocar desde enfermedades cardiovasculares hasta carcinogénesis.

Es por esto que, las moléculas con capacidad antioxidante han cobrado relevancia y se fomenta su consumo mediante la dieta. Los antioxidantes reducen el estrés oxidativo, pues evitan los daños causados por radicales libres de oxígeno y porque pueden inhibir la proliferación de células que causa la fosforilación de proteínas (Khoo & Falk, 2014).

La hesperetina y la naringenina, los principales flavonoides en el jugo de naranja, afectan múltiples rutas metabólicas al mejorar la capacidad antioxidante y antiinflamatoria del suero sanguíneo. Aún más, autores como Aptekmann & Cesar (2013) han encontrado que los

flavonoides, por su naturaleza antioxidante, tienen propiedades de protección de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, siglas en inglés), pues evitan su oxidación, de ahí su relevancia en la prevención de ECV (enfermedades cardiovasculares). Además, estos compuestos también contribuyen en la disminución de la resistencia a la insulina, por lo tanto, también tienen funcionalidad en la protección contra la diabetes (Barreca *et al.*, 2017; Barreca *et al.*, 2020).

Por su parte, la vitamina C, disminuye el riesgo de padecer arterosclerosis pues protege las células endoteliales y también a las LDL, del estrés oxidativo. A la vez, fortalece el sistema inmunológico, lo cual contribuye con un buen estado de salud para hacer frente a cualquier enfermedad (Gonçalves *et al.*, 2018).

Se ha encontrado además, que el jugo de naranja es una fuente natural de ácido fólico, calcio, potasio y magnesio, los cuales son básicos para el buen funcionamiento del organismo. A lo largo del tiempo se ha asociado el consumo de jugo de naranja, por su contenido de vitamina C y compuestos bioactivos, con la prevención de enfermedades como infecciones respiratorias agudas, psoriasis, alergias, asma, artritis, entre otras (Velázquez *et al.*, 2016).

El jugo de naranja, además, juega un papel importante en la salud nutricional, al dar sensación de saciedad y ayudar a mantener el peso corporal. Este alimento es una buena fuente de energía y es fácil de incorporar a la dieta por su aporte calórico (0,45 kcal/g). Algunos estudios clínicos han demostrado que existe una relación entre el consumo de jugo de naranja y un bajo índice de masa corporal, tanto en infantes como en adultos (Flood & Rolls, 2009).

3.4 Parámetros de calidad del jugo de naranja

Existen diferentes parámetros que se pueden analizar en el jugo de naranja para determinar su calidad. Esta investigación consideró determinados parámetros químicos y nutricionales.

3.4.1 Parámetros químicos

3.4.1.1 Capacidad antioxidante hidrofílica de radicales de oxígeno

El denominado ORAC-hidrofílico se utiliza para determinar la capacidad antioxidante de los compuestos hidrofílicos, tales como los polifenoles, ácido ascórbico y xantófilas y se realiza con extractos con solventes polares (Odendaal & Schauss, 2014). Se ha observado que la contribución de los compuestos lipofílicos a la capacidad antioxidante total es baja en comparación con la contribución de los compuestos hidrofílicos. De hecho, se cree que los compuestos fenólicos son los fitoquímicos que más aportan a este parámetro (Vicente *et al.*, 2011).

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno, abreviado ORAC por sus siglas en inglés, es un análisis químico usado para determinar el potencial antioxidante de diversas sustancias nutraceuticas, farmacéuticas y alimenticias, como lo es el jugo de naranja. Este ensayo se apoya en el uso de fluoresceína para monitorear la actividad antioxidante, la cual se determina con un lector de microplacas capaz de detectar fluorescencia (Roy *et al.*, 2010). El método ORAC es de bajo costo y permite la automatización en el formato de microplacas.

El principio del método consiste en exponer la fluoresceína a los radicales libres que, al oxidarla, disminuyen la intensidad de la fluorescencia a lo largo del tiempo. El daño causado se correlaciona con la cantidad de agente oxidante. De la misma forma, la inhibición del daño causado por la oxidación se relaciona con la capacidad antioxidante de un compuesto que actúa atrapando radicales libres. Además, se utiliza una sustancia patrón antioxidante: Trolox. La capacidad antioxidante de este compuesto sirve como referencia, por lo tanto, los resultados de este análisis se dan como “equivalentes de Trolox” (TE, siglas en inglés), ya que con esta sustancia se prepara la curva de calibración (Brescia, 2012).

La capacidad antioxidante que se cuantifique para determinada fruta depende enormemente de la variedad, de las condiciones ambientales, del manejo postcosecha y las condiciones de procesamiento. Sin embargo, se han realizado estudios para poder determinar cuáles son los valores de H-ORAC de diferentes frutas y poder categorizarlas (Vicente *et al.*, 2011). Por

ejemplo, la mora y el arándano rojo son de las frutas con valores de H-ORAC más altos como se aprecia en el cuadro I. Se observa que el valor de H-ORAC de los cítricos es considerablemente más bajo que el de las dos frutas que se acaban de mencionar. Sin embargo, entre los cítricos que se muestran en el cuadro I, se puede ver que la naranja es el que presenta valores más altos. Incluso también se puede observar que dentro de las variedades y formas de consumo de naranja se reportan valores diferentes.

Cuadro I. Valores de H-ORAC cuantificados para diferentes frutas y jugos.

Alimento	H-ORAC* (μmol de TE/g de fruta o jugo)	Referencia
Mora	52,45	Wu <i>et al.</i> , 2004
Arándano rojo	92,56	Wu <i>et al.</i> , 2004
Naranja Navel	17,85	Wu <i>et al.</i> , 2004
Toronja	15,13	Wu <i>et al.</i> , 2004
Mandarina	16,13	Wu <i>et al.</i> , 2004
Naranja (variedad comercial)	21,03	USDA, 2010
Jugo de naranja (sin variedad reportada)	7,26	USDA, 2010
Jugo de naranja Valencia	20,13	Takebayashi <i>et al.</i> (2013)

*Datos reportados en base húmeda

3.4.1.2 Perfil de ácidos orgánicos

Este análisis es ampliamente usado como parámetro de calidad pues funciona como una especie de huella química. Es un indicador de la autenticidad y adecuada calidad de un jugo, pues permite saber si hubo adulteración y qué tan fresco es el producto (Hammond, 2016). La acidez de un jugo cítrico, dada por los ácidos orgánicos, indica si este es aceptable o no. Por ejemplo, el jugo de naranja se espera que contenga cerca de 1% de acidez, el jugo de toronja 1,5%-2% y el jugo de limón y lima 5-6% (Varnam & Sutherland, 2012).

En el jugo de naranja no solo se puede encontrar ácido cítrico, el cual es considerado el más abundante con un contenido de 12,66 g/L. También, se ha determinado el ácido málico como el segundo ácido orgánico mayoritario con una concentración de 1,06 g/L. Se han detectado también cantidades minoritarias de ácido succínico (Selli *et al.*, 2017). Blanco & Mangas (2004) argumentan que los ácidos orgánicos inciden en las características sensoriales de los jugos de frutas. Dependiendo de su concentración y naturaleza, pueden determinar el color, el sabor, el aroma y la estabilidad en el almacenamiento. Además, es posible que los ácidos orgánicos les den a las frutas resistencia contra enfermedades, pues un pH ácido puede inhibir la proliferación de microorganismos y la oxidación bajo ciertas condiciones.

La mayoría de los métodos analíticos utilizados para realizar el perfil de ácidos orgánicos se basan en la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC, por su siglas en inglés) acoplado a detección ultravioleta, puede utilizarse además fase reversa o intercambio de iones. Sin embargo, se ha determinado anteriormente que existe una alta variabilidad en los resultados entre diferentes laboratorios. La metodología con HPLC permite separar y determinar ácidos orgánicos con un tratamiento previo de muestra relativamente simple. Estos tratamientos dependerán de los ácidos que se quieran determinar, de su proporción y de la naturaleza de la matriz (Tastan & Baysal, 2018).

3.4.2 Parámetros nutricionales

Parte esencial de la calidad del jugo de naranja se relaciona con parámetros nutricionales. Existen muchas variables dentro de esta categoría que se pueden medir: la cantidad de minerales, como sodio, potasio o calcio, antioxidantes, fibra dietaria, vitaminas, carbohidratos, proteínas y numerosos fitoquímicos. En esta sección se describirán únicamente parámetros nutricionales de naturaleza hidrofílica relevantes para esta investigación.

3.4.2.1 Vitamina C

La vitamina C es un micronutriente común en una gran variedad de frutas como naranjas, limones, guayabas, arándanos y aguacates, aunque se encuentra en ellos en diferentes

concentraciones. Específicamente en la naranja es la vitamina que se encuentra en mayor cantidad. En la variedad Valencia se ha determinado que puede estar en un rango de concentraciones de 50 mg/100 mL a 86 mg/ 100 mL de jugo. En la variedad Navel se ha cuantificado de 38,96 mg/ 100 mL a 61,1 mg/ 100 mL (Roussos, 2015).

La vitamina C y sus vitámeros participan en una gran variedad de reacciones en el organismo humano, por lo que la ingesta de este compuesto es de gran relevancia. Sin embargo, los mecanismos de acción que sigue la vitamina C permanecen sin determinarse con exactitud. A pesar de esto, se ha asociado la vitamina C con procesos de digestión y absorción, inmunológicos, endocrinos, oculares y preventivos de ECV, por mencionar algunos (Russell, 2004).

Por otro lado, de acuerdo con Taylor (2016), la vitamina C en los alimentos es muy útil como antioxidante y por lo tanto evita la degradación de compuestos que dan sabor y olor, contribuyendo con la conservación de la calidad del producto. Este autor indica también que, en la formulación de bebidas y jugos es un componente de gran importancia. Uno de los factores a considerar durante la elaboración de jugos concentrados es que se debe agregar el ácido ascórbico luego de la etapa de concentración, pues de no ser así, el compuesto se degradaría por la exposición a las altas temperaturas. Además, una de las características químicas más representativas de la vitamina C es su poca estabilidad. Al ser la vitamina más lábil, es utilizada como referencia o indicador de la estabilidad de las vitaminas en un alimento (Herrera *et al.*, 2015).

Las frutas y los vegetales, fuentes más comunes de vitamina C, normalmente contienen los dos vitámeros, biológicamente activos, más comunes de la vitamina: ácido L-ascórbico (AA) y ácido dehidroascórbico (ADA) (Russell, 2004). Este último, se estima que tiene entre el 80% y el 100% de la actividad biológica del AA, por lo tanto, cuando se quiere determinar la cantidad de la vitamina, también se debe cuantificar el ADA. En los alimentos, es común que estos vitámeros se encuentren ligados a proteínas (Kochhar & Rossell, 2012).

Debido a que se deben tomar en cuenta tanto el AA como el ADA para determinar la cantidad total de vitamina C, la detección de este compuesto no es sencilla. Aunque los vitámeros comparten similitudes, no se comportan de la misma manera químicamente. Por ejemplo, ambos absorben en el rango UV, pero a distintas longitudes de onda, AA absorbe a 245 nm-265 nm y el ADA a 210 nm -230 nm, además el ADA es más susceptible a interferencias presentes en los alimentos. Esta característica limita los solventes y reactivos que se pueden utilizar cuando se trata de analizar este compuesto (Russell, 2013).

Se han desarrollado múltiples métodos para cuantificar la vitamina C, existen métodos enzimáticos, químicos, electroquímicos, espectroscópicos y cromatográficos. Actualmente, los más utilizados son los cromatográficos, específicamente, la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con detectores UV. Su uso se ha popularizado debido a que es de fácil acceso y es más rápida que otras técnicas, es sensible y selectiva (Devaki & Raveedran, 2017; Russell, 2004).

Recientemente, en estudios para detectar y cuantificar vitamina C que involucran HPLC, se ha popularizado el uso de columnas cromatográficas C₁₈ empacadas con partículas internas de diámetros menores a 5 µm, pues mejoran la resolución de la columna y detección de absorbancia UV. Se han desarrollado además otras innovaciones en el análisis de este compuesto como el uso de columnas monolíticas, Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica y de Espectrometría de Masas (Russell, 2013; Eitenmiller *et al.*, 2008).

3.4.2. Perfil y contenido total de polifenoles

Los polifenoles son moléculas que se encuentran en los tejidos vegetales de prácticamente todas las plantas. El grupo de los compuestos fenólicos abarca diversas categorías de moléculas con diferentes estructuras químicas. Es una clase de compuestos tan variable, que algunos polifenoles son de bajo peso molecular, menor a 100 Da, mientras que otros pueden superar los 30 000 Da. Esto ejemplifica la heterogeneidad química de estos metabolitos secundarios (Díaz *et al.*, 2013).

El factor común que une a estas moléculas, de acuerdo con Kammerer *et al.* (2013), es la presencia de uno o varios anillos fenólicos y las clases y subclases se establecen dependiendo del número de anillos fenólicos y los grupos funcionales que presentan. Las principales categorías de polifenoles son: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes, alcoholes fenólicos y flavonoides. Estos últimos se subdividen en: flavanoles, flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonoles y antocianidinas. Adicionalmente, con frecuencia, los compuestos fenólicos se encuentran unidos a uno o más mono o disacáridos por medio de enlaces glicosídicos en los grupos hidroxilo.

Los flavonoides han sido estudiados en numerosas investigaciones científicas y se han analizado muchos aspectos de estas moléculas debido a que tienen utilidad en varios campos de la ciencia. Se ha concluido, en general, que la ingesta de flavonoides es inversamente proporcional al riesgo de padecer enfermedades crónicas y otras afecciones. Estos compuestos se encuentran en importantes cantidades en cítricos, vegetales y cereales. Sin embargo las concentraciones de estos fitoquímicos pueden disminuir hasta 50% durante el procesamiento y la preparación del alimento (Gattuso *et al.*, 2007).

En las plantas y sus tejidos los roles que juegan los polifenoles son muy variables. Se ha establecido que la síntesis de polifenoles en las plantas se da principalmente cuando se encuentran expuestas a condiciones ambientales no favorables o adversas para su desarrollo, como por ejemplo, temperaturas extremas, salinidad, sequías, infecciones patogénicas, ataques de herbívoros y deficiencias nutricionales. La presencia de polifenoles le confiere protección a las plantas del estrés que provocan circunstancias como las mencionadas y que llevan al daño en los tejidos vegetales (Santana & Jacobo, 2018; Quiñones *et al.*, 2012).

Específicamente en bebidas, el perfil de polifenoles y su concentración dependen el tipo de fruta, el cultivo, la madurez de la fruta, las condiciones ambientales, condiciones post cosecha y las técnicas de procesamiento y preservación (Kulak & Cetinkaya, 2018). La distribución de polifenoles en frutas y en los jugos de frutas se regula, en gran parte, genéticamente y por lo tanto se ha utilizado el perfil de polifenoles como marcadores taxonómicos para clasificar

los cultivos. De esta forma, el perfil de polifenoles se utiliza a manera de huella química a la hora de analizar jugos de frutas. La ausencia o presencia de un compuesto fenólico y/o la proporción entre estos compuestos en el producto se pueden utilizar como indicadores de la autenticidad de un jugo de frutas o de que contiene adulterantes. Cada fruta o jugo de fruta se asocia con la presencia de distintos polifenoles. Por ejemplo, la naringina se asocia con jugos cítricos, el ácido clorogénico con jugo de manzana y las antocianinas con jugo de frutos rojos o bayas (Macheix *et al.*, 2018).

La naringenina es de suma relevancia en cítricos y se asocia a sabores amargos. En la naturaleza se encuentra principalmente como glucósido y dependiendo del carbohidrato al que se una puede ser narirutina, si se une a una neohesperidosa o naringina, si se une a una rutinosa. La hesperetina y sus glucósidos hesperidina y neohesperidina también son importantes en cítricos y son abundantes en naranja particularmente (Gattuso *et al.*, 2007). La hesperidina se relaciona con la turbidez en jugos cítricos. Este compuesto forma un complejo con la pectina y produce “nubosidad” en el jugo. Existen otros flavonoides que se encuentran en naranjas y sus derivados, sin embargo, es importante recalcar que la concentración de cada uno puede variar de acuerdo con la especie y el procesamiento de la fruta. Ambos flavonoides inciden en la calidad de jugos cítricos (Berk, 2016) y sus estructuras se muestran en la Figura 1.

Se debe proceder con precaución y cuidado en las etapas previas a la cuantificación e identificación de polifenoles, es decir durante la preparación de la muestra y extracción, para no dañar la estructura química del analito. En algunos casos se procesa la muestra moliéndola o utilizando liofilización, aunque algunas muestras no lo requieren (Nielsen, 2019). Lo primordial en esta parte del análisis es actuar de forma expedita para minimizar la oxidación de los polifenoles. En ocasiones, la extracción de estos compuestos puede ser complicada debido a que forman enlaces difíciles de romper con proteínas o con polisacáridos de la pared celular y por eso a veces es necesario aplicar hidrólisis química o enzimática para extraerlos (Durazzo, 2018).

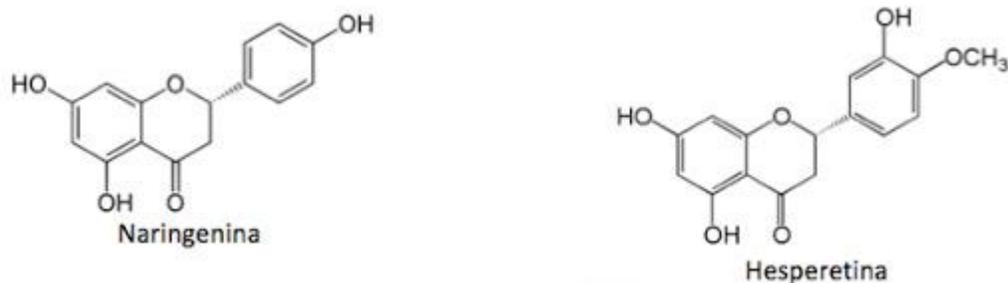


Figura 1. Estructura química de la naringenina y la hesperetina (Ahmed & Eun, 2017)

La mayoría de los perfiles de polifenoles se han obtenido por medio de separación por HPLC y aunque no se logren identificar todos los componentes de la muestra, los datos se pueden utilizar para analizarlos estadísticamente y determinar patrones de reconocimiento. Los métodos que involucran HPLC para obtener perfiles de polifenoles son los más utilizados por su rapidez y reproducibilidad, pero siempre se debe tomar en cuenta todas las fuentes de variabilidad, tanto endógenas como exógenas (Kammerer *et al.*, 2013; Macheix & Billot, 2018). Recientemente, se ha popularizado también el uso de UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) pues se ha demostrado que tiene límites de detección más bajos que el método HPLC y que es más rápido, sin embargo, se requiere de equipo más apropiado para las altas presiones que usa este método (Magiera & Baranowska, 2013).

La mayoría de los estudios que usan HPLC para perfilar polifenoles reportan la utilización de fase reversa, lo cual permite separar las moléculas de acuerdo con su polaridad. También, se utilizan columnas C₁₈ de acero inoxidable, especialmente en el análisis de cítricos. Además, se reporta el uso de eluciones tanto isocráticas como en gradiente y con ambas se obtienen resultados con resolución satisfactoria (Xu, 2012). Por otro lado, los solventes utilizados para el análisis de polifenoles pueden variar dependiendo de la matriz. Es común el uso de fases móviles con altas concentraciones de sales. Este solvente por lo general se combina con acetonitrilo o metanol. En segunda instancia, es usual utilizar una solución acuosa de un ácido orgánico débil (ácido acético o fórmico) combinado con un solvente de polaridad media o alta como acetonitrilo o metanol (Ferrerres & Tomás, 2012).

En la etapa de detección hay una gran variedad de opciones que se combinan con HPLC. Se han utilizado sistemas UV, arreglo de diodos y detectores masas. La selección del sistema de detección depende de la matriz, de la accesibilidad del equipo y de la especificidad que se requiera (Kammerer *et al.*, 2013; Nielsen, 2019).

En cuanto a la cuantificación de polifenoles totales, lo más común es aplicar el método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (FC). Este análisis utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu, que consiste en una mezcla de tungstato de sodio y molibdato de sodio, para formar complejos con los compuestos fenólicos en la muestra, por medio de una reacción redox. El producto de la reducción es un compuesto de color azul cuya absorbancia máxima se obtiene a 765 nm, aunque tienen un amplio rango de absorbancia. Se debe realizar una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar, pues los resultados se reportan en miligramos equivalentes de ácido gálico por gramos de muestra (Ballesteros, 2015; Gonzalez *et al.*, 2018).

De acuerdo con múltiples autores (Jayaprakasha *et al.*, 2012; Macheix *et al.*, 2018; Domínguez *et al.*, 2018), el método FC debe su popularidad a que se considera un procedimiento simple. Sin embargo, no es óptimo en cuanto a especificidad y esto se debe a que el reactivo FC puede reaccionar con otros compuestos presentes en la matriz como: ácido ascórbico, azúcares y ácidos orgánicos. El resultado de esto es que se puede sobreestimar la cantidad total de polifenoles. Sin embargo, este análisis sigue siendo un procedimiento de rutina en la mayoría de los laboratorios químicos.

3.5 Procesamiento de jugo de naranja

El proceso de elaboración de jugo de naranja comienza desde el cultivo de la fruta y su cosecha. La variedad de naranja más buscada por los productores de jugo de naranja es la Valencia, debido a varias razones: tiene un alto contenido de sólidos solubles, es muy jugosa y por lo tanto da un buen rendimiento, tiene buen sabor y color de jugo y tiene pocas semillas (Kimball *et al.*, 2005).

La naranja puede provenir directamente del cultivar o de una empacadora, esto influye enormemente en cómo se procesa la fruta. Si la fruta viene del campo, es común que venga con tierra o suciedad, con hojas, tallos o piedras. Existen diferentes equipos que se encargan de eliminar este material extraño. Por ejemplo, existen sistemas de rodillos que se colocan paralelamente dejando cierta distancia entre cada rodillo para que el desecho caiga por esa abertura. La distancia debe ser suficientemente pequeña para que las naranjas no puedan caer por ella. Las naranjas se transportan por estos rodillos y así se separan de los desechos. Este proceso de remoción de desechos también puede hacerse manual (Bates *et al.*, 2001).

Además, según Woodroof (2012), cuando la fruta viene del campo, puede ser que sea necesario hacer una selección de la fruta antes de que esta ingrese a la planta para eliminar las naranjas que no cumplan con los requisitos de calidad. Cuando la fruta viene de una empacadora, las dos operaciones descritas anteriormente son innecesarias y es común que cuando se utiliza esta fuente, las naranjas estén enceradas para una mejor preservación. La etapa de recibo de materia prima se considera crítica cuando se trata de jugo no pasteurizado. Normalmente, en la etapa de descarga y recibo de la fruta, se toman muestras representativas para analizarlas y realizar proyecciones sobre el rendimiento y la calidad del jugo que se va a obtener. La toma de la muestra puede ser manual, sin embargo, se considera poco objetivo y confiable y se cuestiona la representatividad de la muestra. También puede utilizarse un muestreo mecánico, en el que se utilizan brazos robóticos que, cada cierto tiempo, toman naranjas del lote que se está descargando (Kimball, 2012).

Explica Rebeck (2013) que, sin importar de donde vengan las naranjas, la operación de limpieza es necesaria para reducir la suciedad o la cera adherida a la fruta. Lo más común, según el autor mencionado, es que se rocíe agua mezclada con algún agente limpiador sobre las naranjas mientras cepillos rotadores se encargan de limpiar la superficie de la naranja. También, existen otros sistemas más sofisticados que permiten separar los desechos sólidos de los líquidos, lo cual facilita el manejo de desechos.

Cuando se trata de jugo que no se va a pasteurizar, la etapa de lavado y desinfección debe realizarse con sumo detalle y cuidado, en ocasiones puede ser que se apliquen varias veces ambas operaciones. Dependiendo de la empresa, en ocasiones se aplica escaldado a la fruta para reducir la carga microbiana. Si es para jugo pasteurizado o concentrado de jugo de naranja, esto no es necesario, pues el tratamiento térmico es más agresivo y da la reducción necesaria de la carga microbiana presente (Kimball *et al.*, 2005).

Una vez que se lava y desinfecta, se debe hacer una selección de la fruta antes de la extracción del jugo. Esto es un último control de calidad de la materia prima antes de obtener el jugo y es de mucha importancia sobre todo cuando se trata de jugo fresco, pues se busca utilizar fruta sin defectos que no comprometan la calidad del resto del proceso de elaboración. Adicionalmente, la fruta seleccionada se debe clasificar de acuerdo con el tamaño, pues debe estar en el rango apropiado para que pueda ingresar en el extractor (Berk, 2016).

Existen varios tipos de equipo para la extracción de jugos de cítricos, sin embargo, el más utilizado a nivel industrial es el extractor FMC, de acuerdo con Pássaro y Londoño (2012). Estos autores explican que, el sistema de copas y cuchillas permite la rápida y simple separación de todas las partes de la fruta y evita que el zumo extraído entre en contacto con otros componentes que pueden afectar el sabor del producto final. Además, este equipo puede, simultáneamente, extraer y separar los aceites esenciales de la cáscara de la fruta, como una emulsión que luego puede ser tratada. Se calcula que al utilizar el extractor FMC se obtiene un rendimiento del 95%.

Luego de la etapa de extracción, el jugo puede atravesar diferentes etapas dependiendo de lo que se quiera obtener como producto final: jugo fresco no pasteurizado, jugo de naranja concentrado, jugo de naranja concentrado y congelado, entre otros. Si es jugo fresco no pasteurizado, luego de la extracción se pasa al envasado y posterior almacenamiento en refrigeración. Sin embargo, si se desea pasteurizar y concentrar, la ruta es distinta.

Antes de pasteurizar, el jugo o zumo extraído puede ser filtrado, centrifugado y homogenizado, para eliminar pulpa remanente u otros desperfectos. Además, es desaireado para eliminar el oxígeno en el líquido y evitar que haya oxigenación acelerada durante la pasteurización. Con este fin, se aplica vacío a 60 °C por 2 minutos (Berk, 2016; Pássaro & Londoño, 2012). Luego, el jugo pasa a un intercambiador de calor, que puede ser tubular o de placas, donde se calienta por un minuto a 90 °C para ser pasteurizado (Toledo, 2012). Cuando se completa este proceso se enfría rápidamente a 5 °C aproximadamente, para evitar el crecimiento de microorganismos sobrevivientes a la pasteurización. Rápidamente, el jugo debe ser empacado, ya sea en plástico, vidrio o en tetrabrik, para evitar recontaminaciones. Si se desea elaborar concentrado de jugo de naranja, entonces, después de pasteurizar, el jugo se concentra en evaporadores de placas o tubulares y luego se envasa y se congela (Rutledge, 2012).

En la Figura 2 se presenta un diagrama de flujo para ilustrar la variedad de las operaciones unitarias necesarias para elaborar jugo concentrado. Se aclara que para esta investigación se utilizó jugo fresco, pues se deseaba evaluar los efectos del ultrasonido en un jugo de naranja sin procesar. Las operaciones unitarias que implican aplicación de calor son de suma importancia puesto que preservan el producto y lo hacen seguro para su consumo, sin embargo, deben controlarse cuidadosamente para minimizar el daño provocado. Las altas temperaturas pueden destruir compuestos nutricionales esenciales como vitaminas y antioxidantes, también pueden afectar el sabor y el aspecto del jugo (Berk, 2016). Debido a esto, se ha buscado desarrollar tecnologías atérmicas que permitan elaborar un producto inocuo, de larga vida útil y que no destruyan los componentes bioactivos ni afecten la calidad sensorial del jugo.

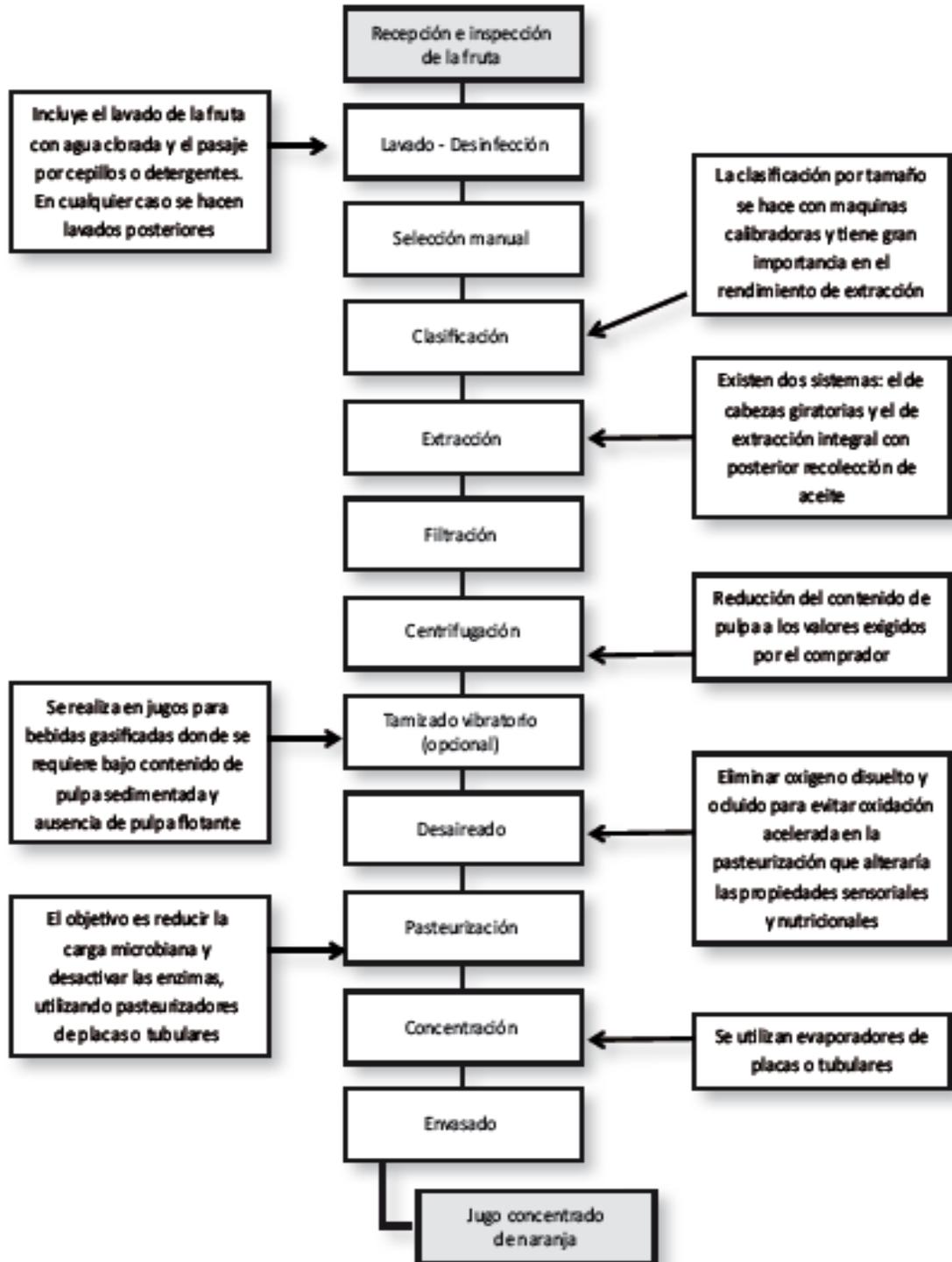


Figura 2. Diagrama de flujo para obtener jugo de naranja concentrado (Pássaro & Londoño, 2012)

3.5.1 Métodos térmicos de conservación

Existe una amplia gama de tratamientos térmicos que se pueden aplicar durante el procesamiento de frutas para obtener jugos frescos o concentrados, como por ejemplo, escaldado, pasteurización y esterilización. El objetivo de los tratamientos térmicos es eliminar los microorganismos causantes de enfermedad, reducir la cantidad de microorganismos e inactivar enzimas que pueden causar inestabilidad en el producto final. Una de las ventajas de los jugos de frutas es su bajo pH, por lo que los tratamientos térmicos de intensidad media son suficientes para darles estabilidad a largo plazo incluso a temperatura ambiente (Renard & Maingonnat, 2012).

La limitación que enfrentan los tratamientos térmicos en jugos, son los cambios que provocan a las propiedades fisicoquímicas del alimento. Esto es crucial pues los aspectos sensoriales y nutricionales influyen enormemente en la aceptación del consumidor, como se mencionó anteriormente (Sandhu & Minhas, 2006). Las altas temperaturas utilizadas en algunos tratamientos pueden causar sabores extraños, cambios en el color deseado, aumento de la viscosidad y desencadenar reacciones químicas (por ejemplo, pardeamiento no enzimático) durante el resto del procesamiento y el almacenamiento. Además, debido a que los compuestos relacionados al aroma son volátiles, se pierden fácilmente durante estas operaciones (Shen & Wu, 2018; Renard & Maingonnat, 2012).

En particular, los jugos de frutas cítricas son muy susceptibles al calor. El contenido de vitaminas, el aroma a jugo fresco y su sabor se puede perder si el tratamiento térmico no se aplica rápido. Por otro lado, algunos componentes como ciertos flavonoides y carbohidratos son relativamente estables a las condiciones de temperatura de la pasteurización (Cabral *et al.*, 2010; Ahmed & Eun, 2017). Sin embargo, en presencia de oxígeno y acelerado por la acción del calor y la presencia de metales, se puede dar la oxidación de polifenoles lo cual produce pérdida de ácido ascórbico y consecuentemente puede ocurrir la degradación en cadena de azúcares (Berk, 2016; Sandhu *et al.*, 2012).

En contraste, en estudios como el realizado por Aschoff *et al.* (2015) se ha observado que no hay diferencias en el contenido de flavonoides, específicamente narirutina y hesperidina en jugo de naranja fresco y pasteurizado.

Para minimizar estos daños se han tratado de desarrollar y estudiar los efectos de otras tecnologías térmicas menos agresivas como el uso de microondas, calentamiento óhmico, procesamiento usando calentamiento infrarrojo, calentamiento con radio frecuencia dieléctrica, aplicación de ultrasonido o sonicación, utilización de vacío y en algunos casos combinaciones de estas técnicas con la aplicación tradicional de calor (Renard & Maingonnat, 2012).

3.5.2 Métodos atérmicos de conservación

Debido a los daños fisicoquímicos y nutricionales que los tratamientos térmicos pueden causar en los alimentos, se han explorado otros métodos que no involucren altas temperaturas, que conserven las propiedades del producto y que además contribuyan con su inocuidad al eliminar los microorganismos patógenos (Zhang *et al.*, 2002).

El creciente interés por parte del consumidor por productos frescos, como los jugos de frutas, cuyas características nutricionales se mantengan intactas, ha incentivado también la búsqueda de alternativas no térmicas. Varias de estas nuevas metodologías han resultado ser eficaces en alargar la vida útil de los alimentos y al mismo tiempo mantener sus propiedades sensoriales y nutricionales. Además, las técnicas atérmicas pueden ser más eficientes energéticamente (Bhattacharjee *et al.*, 2019).

Existen muchas técnicas que actualmente se están desarrollando y cuyos efectos siguen en estudio. Entre ellas se puede mencionar luz ultravioleta, campo eléctrico pulsado, campo magnético, procesamiento con membranas, procesamiento a altas presiones, alta presión hidrostática y ultrasonido o sonicación, como algunas de las más relevantes. La mayoría de estos métodos se fundamentan en las propiedades físicas de la materia y no en las propiedades químicas, lo cual las hace además más aceptables ante el consumidor (Martín *et al.*, 2014).

En jugos, la aplicabilidad de cada una de las tecnologías mencionadas depende de la matriz y sus características y de los microorganismos patógenos que se desean eliminar, los cuales pueden ser resistentes a ese procesamiento en particular (Balasubramaniam, 2008). Estas nuevas metodologías deben además ser aplicables a gran escala, por lo que se ha tenido que desarrollar el equipo de acuerdo con las necesidades específicas a la industria alimentaria. En algunos casos experimentales en jugos con estas técnicas se ha logrado preservar el color, sabor y aroma, la conservación de la consistencia, la retención de ácido ascórbico, eliminar sabores extraños y lograr la inactivación bacteriana (Barbosa & Bermúdez, 2011).

3.6 Ultrasonido

El uso de ultrasonido con diversos fines, en la industria de jugos de frutas, ha resultado ser prometedor. Esta alternativa atérmica tiene varias características que le confieren algunas ventajas: es segura, accesible, no tóxica, no utiliza agentes químicos y es amigable con el ambiente. Se ha comprobado que la tecnología ultrasónica tiene la capacidad de extender la vida útil de los alimentos y mantener sus características originales inalteradas (Manickam & Liew, 2016).

El ultrasonido se refiere a las ondas mecánicas con altas frecuencias iguales o mayores a 20 kHz, que no son audibles para el ser humano. El procesamiento de jugos de frutas con ultrasonido se ha dividido en dos categorías de acuerdo con las frecuencias que se utilicen. El ultrasonido de baja energía o potencia, que utiliza frecuencias por encima de los 100 kHz y potencias menores a 1 W/ cm^2 y el ultrasonido de alta energía o alta potencia, que utiliza frecuencias entre 20 y 500 kHz y potencias superiores a 1 W/ cm^2 (Bhattacharjee *et al.*, 2019).

Las ondas ultrasónicas de alta frecuencia acarrearán también altas cantidades de energía y generan flujos acústicos a lo largo del medio líquido por el cual se disipan. Esta energía no puede ser contenida en el líquido, lo cual provoca turbulencia en el medio por los diferenciales de presión que se generan al pasar el flujo acústico. Los cambios en la presión

obligan al líquido a “romperse” y las partículas se acercan más unas a otras (Manickam & Liew, 2016; Martín *et al.*, 2014).

Lo descrito anteriormente resulta en un fenómeno llamado cavitación. Si bien es un proceso complejo, puede decirse que la cavitación consiste en la formación de microburbujas para disipar el aumento de energía causado por la presión de las ondas acústicas. Las microburbujas pueden coalescer unas con otras o simplemente expandirse hasta colapsar. Este proceso se da de forma cíclica y genera microaumentos locales de presión y de temperatura en el medio líquido, sin afectar su composición o propiedades. Es importante mencionar que la formación de estas cavidades o burbujas depende de la matriz alimenticia, de las partículas suspendidas, de los iones disueltos, de agentes surfactantes y de la presencia de otros componentes (Bhattacharjee *et al.*, 2019; Feng & Yang, 2011).

El efecto bactericida y preservante que se le atribuye al ultrasonido se debe a que, cuando se da la cavitación y por lo tanto el colapso de las burbujas, se producen cambios de presión y efecto cizalla sobre las paredes celulares de los microorganismos, lo cual lleva a la desintegración de la célula microbiana. Además, la cavitación provoca diminutos impactos mecánicos intracelulares que descomponen el material celular ayudando a la inactivación de enzimas. Adicionalmente, se ha encontrado que la inactivación de enzimas por ultrasonido también se debe a la acción de radicales libres que se forman por la sonólisis de moléculas de agua (Barbosa *et al.*, 2009; Bhattacharjee *et al.*, 2019).

Se ha señalado que bajo ciertas condiciones de trabajo el ultrasonido por sí solo no es capaz de lograr una reducción de 5 log pues es ineficiente para inactivar ciertos microorganismos y enzimas en jugos de frutas. Así ha surgido la idea de que, más bien, puede complementarse con otros tratamientos. Por ejemplo, se ha estudiado la combinación de ultrasonido con calor moderado y de esto ha surgido lo que se ha denominado la termosonicación. Al combinar los tratamientos se logra un golpe térmico de mayor impacto y letalidad en los microorganismos y enzimas a inactivar sin utilizar temperaturas tan elevadas. Sin embargo, siempre se deben considerar las características del medio como las mencionadas anteriormente, así como las

variables del tratamiento: la amplitud, la frecuencia, el tiempo y la temperatura (Anaya *et al.*, 2017).

Los efectos físicos y químicos que tiene la tecnología de ultrasonido han impulsado a los investigadores a encontrarle numerosas aplicaciones. En general, el ultrasonido mejora o potencia la eficiencia de muchas operaciones unitarias y procesos tecnológicos en alimentos. Por ejemplo, al darle uniformidad a la transferencia de calor mejora procesos como la cocción, congelación, cristalización y secado. Al incrementar la transferencia de masa mejora el marinado de conservas, vegetales, carnes, pescado y queso. Durante la desgasificación de productos fermentados disminuye el tiempo de operación por los fenómenos físicos de compresión y rarefacción que generan las ondas mecánicas acústicas (McHugh, 2016). Al aplicar el ultrasonido en la filtración de jugos también se disminuye el tiempo de operación y mejora la calidad del filtrado obtenido, debido a las vibraciones que se generan en el medio. Por esta misma razón se ha encontrado que es útil en el desmoldado de productos horneados pues reduce las pérdidas de producto. El fenómeno de cavitación favorece la emulsificación, la oxidación en vinos y otras bebidas alcohólicas como el “whisky” y la operación de corte en productos frágiles como queques o queso, al minimizar la deformación del producto. Además, la cavitación evita la formación de espuma en bebidas carbonatadas y en bebidas fermentadas (Chemat *et al.*, 2011).

Respecto al efecto del ultrasonido en los compuestos bioactivos, se ha establecido que el efecto puede ser diverso y que depende en gran medida de la intensidad del tratamiento de sonicación. Se han estudiado ampliamente las consecuencias de la sonicación en el procesamiento de jugos. Por ejemplo, se encontró que el ultrasonido, aplicado por tiempos cortos y a bajas temperaturas, es efectivo en la retención de compuestos como ácido ascórbico, fenoles y flavonoides (Abid *et al.*, 2014). También Wong *et al.* (2010), determinaron que el ultrasonido no provocó cambios significativos en el contenido de antocianinas ni la actividad antioxidante del jugo de mora. En jugo de granada también se han evaluado los efectos del ultrasonido y se concluyó que esta tecnología no tiene efectos destructivos sobre compuestos del jugo como antocianinas y fenoles y además no se observó

decrecimiento porcentual considerable sobre la capacidad antioxidante (Alighourchi *et al.*, 2013).

En otras investigaciones se ha concluido que la aplicación de ultrasonido incrementa el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en jugos (Zafra *et al.*, 2013; Guerrouj *et al.*, 2016). Resultados similares se obtuvieron en la investigación de Nadeem *et al.* (2018) quienes encontraron que, al sonicar una mezcla de jugo de zanahoria y de uva, se retiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides y además la capacidad antioxidante del jugo, aunque disminuye, sigue siendo mayor que en el jugo control sin sonicar. En esta misma investigación se encontró que el jugo sonicado por más tiempo tenía mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides. La razón de estos efectos es, de nuevo, el fenómeno de cavitación el cual, al causar el rompimiento mecánico de las células, permite la liberación de fitoquímicos (Rojas *et al.*, 2017).

Por otro lado, otros autores han concluido de sus investigaciones que el ultrasonido también puede detener efectos adversos sobre compuestos bioactivos en jugos debido a que se forman productos oxidativos que causan daños sobre las estructuras de compuestos antioxidantes tales como el ácido ascórbico y carotenoides (Tiwari *et al.*, 2009c; Martinez *et al.*, 2015). Para evitar que esto se dé, la recomendación ha sido que se aplique el ultrasonido a jugos previamente desgasificados (Aguilar *et al.*, 2017). A pesar del efecto negativo encontrado, al compararlo con los daños causados por los tratamientos térmicos en jugos, se ha observado que el ultrasonido es menos perjudicial para los compuestos bioactivos. Además, se ha hallado que la utilización de ultrasonido le otorga estabilidad a los compuestos bioactivos de jugos a lo largo del almacenamiento (Rojas *et al.*, 2017).

En contraste, Sun *et al.* (2015) encontraron en su investigación que la actividad antioxidante del jugo de manzana ultrasonicado por 10 minutos disminuyó más en comparación con el mismo jugo sin tratar, en sus conclusiones asocian este resultado a que también hubo una disminución de los compuestos fenólicos totales y de flavonoides. Lo anterior parece confirmar que el efecto del ultrasonido depende enormemente de la matriz a la cual se aplica

pues otros estudios se ha hallado que este tratamiento no tiene efectos sobre la actividad antioxidante en una mezcla de jugo de naranja y zanahoria (Caminiti *et al.*, 2012) y en otros más bien se observó un aumento de este parámetro en jugo de lima (Bhat *et al.*, 2011).

3.6.1 Estudios científicos con aplicación de ultrasonido a jugo de naranja

A continuación, en el cuadro II, se presentan los resultados de los estudios de ultrasonido en jugo de naranja más relevantes para esta investigación:

Cuadro II. Resumen de los resultados obtenidos en investigaciones del efecto del ultrasonido en la calidad del jugo de naranja.

Cita bibliográfica	Condiciones experimentales	Resultados
Tiwari <i>et al.</i> (2009b)	DEA (W/mL): 0,30, 0,33, 0,36, 0,42, 0,53, 0,61, 0,81 TT (min): 2,4,6,8,10 F: 20 kHz	Muestras sonicadas mostraron una mayor retención de ácido ascórbico respecto a la muestra tratada térmicamente. El tratamiento de US más agresivo (0,81 W/mL por 10 min) provocó una reducción de menos del 5% de ese parámetro.
Tiwari <i>et al.</i> (2009a)	A: 40%, 70%, 100% TT (min): 2, 6, 10 F: 20 kHz Almacenamiento de 30 días	Aunque el contenido de ácido ascórbico en muestras sonicadas disminuyó durante el almacenamiento, en comparación con el jugo sin sonicar, las muestras sonicadas lograron retener más este compuesto a lo largo del tiempo.
Gómez <i>et al.</i> (2010)	A: 50%, 60%, 75% TT (min): 2, 4, 8, 10 F: 20 kHz	El jugo de naranja sonicado retiene su aroma y sabor en valores aceptables por más tiempo que las muestras no sonicadas. Ultrasonido degradó el ácido ascórbico pero ese efecto se eliminó durante el almacenamiento, es decir que en comparación con las muestras control no se observó una mayor degradación.
Wahia <i>et al.</i> (2020)	Uso de baño ultrasónico Temperatura: 47 C TT (min): 30 F: 20 kHz Almacenamiento: 24 días	Las muestras termosonicadas retuvieron una mayor cantidad de polifenoles totales, flavonoides totales y ácido ascórbico a lo largo del tiempo.
Caminiti <i>et al.</i> (2012)	Uso de manotermosonicación F: 20 kHz Temperatura: 63 C TT (min): 2.2 min	Se redujo el contenido de polifenoles, pero no se observó reducción significativa en la capacidad antioxidante. No se encontraron diferencias de olor, dulzor y acidez con el jugo control.

TT: tiempo de tratamiento. F: frecuencia. A: amplitud. DEA: densidad de energía acústica.

Por la gran importancia del jugo de naranja en la industria de jugos y bebidas y la alta aplicabilidad de la tecnología del ultrasonido en el procesamiento de este tipo de productos, se han realizado múltiples investigaciones para estudiar y entender los efectos que la sonicación puede tener en el jugo de naranja, en las últimas dos décadas. A pesar de que se han hecho muchísimas investigaciones y se continúa recolectando información con respecto

al uso de ultrasonido en alimentos, todavía existen múltiples factores, variables, condiciones y perspectivas que analizar.

4. Materiales y métodos

4.1 Localización del proyecto

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo en la Universidad de Costa Rica, Sede Rodrigo Facio. Los análisis químicos del jugo de naranja se hicieron en el Laboratorio de Química del CITA. La sonicación del jugo de naranja se hizo en el Laboratorio de Química de la Escuela de Tecnología de Alimentos.

4.2 Materias primas

El jugo de naranja comercial, sin pasteurizar fue adquirido en las instalaciones del supermercado Price Smart (Zapote, San José, Costa Rica), se obtuvo a partir de naranjas variedad Valencia desinfectadas previamente y se procesaron en un exprimidor de la marca Fresquita (El Guarco, Cartago, Costa Rica). Las muestras de jugo de naranja que analizó el Laboratorio de Química del CITA se transportaron en botellas plásticas forradas con papel aluminio para evitar que entraran en contacto con la luz. Las muestras de jugo a las que primero se les aplicó una extracción de polifenoles con metanol al 90% se transportaron en bolsas de polietileno, empacadas al vacío y forradas en papel aluminio para evitar que entraran en contacto con la luz.

4.3 Descripción del tratamiento utilizado

4.3.1 Equipo utilizado

Se utilizó un sistema de sonicación directa con recirculación como el que se muestra a continuación en la Figura 3. Para utilizar este sistema se mantuvo el jugo a temperatura constante en $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en todos los tratamientos aplicados. Para lograrlo, se utilizó un baño con control de temperatura (A). Se usaron 300 mL de muestra de jugo de naranja (mL) para cada tratamiento y se colocaron en un beaker (B) desde el cual se recirculan de manera continua con un flujo volumétrico de 106 mL/min. Para lo anterior, se utilizó una bomba

peristáltica Masterflex (D) (Cole-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL) que envía el jugo a través de la celda de flujo continuo (E). Dentro de esta celda y en su centro geométrico, se coloca la sonda ultrasónica (H) que se encarga de transmitir las ondas ultrasónicas a la muestra.

Se aplicó una frecuencia de 20 kHz utilizando un convertidor ultrasónico (F) de forma continua. El controlador ultrasónico CP-750 (Coleman-Parmer Instrument Company, Vernon Hills, IL) se configuró para trabajar a una amplitud máxima constante de 40% para generar una energía de $50,0 \pm 0,2$ W en la sonda. Lo anterior corresponde a una fuerza de tratamiento de $0,83$ W/mL sobre los 60 mL dentro de la celda de flujo continuo (E). Todo el circuito se autoclavó antes de la aplicación de los tratamientos.

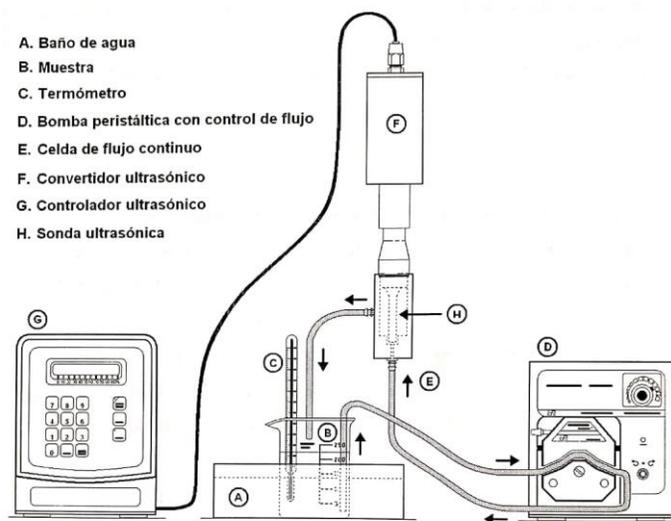


Figura 3. Diagrama del sistema de sonicación directa con recirculación (Wong, 2010).

Se reporta el tiempo de sonicación total de cada tratamiento, 20, 40, 60, 80 y 105 minutos (tiempo total que recirculó el jugo por todo el sistema). Esto corresponde a tiempos efectivos de tratamiento de 4, 8, 12, 16 y 21 minutos, que corresponden a los tiempos promedios de flujo dentro de la celda de flujo continuo (E). Los resultados se reportaran con el tiempo de sonicación total.

4.3.2 Descripción experimental por objetivos

4.3.2.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles.

- Diseño experimental estadístico

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo en seis niveles (0, 20, 40, 60, 80 y 105 minutos) que corresponden a los tiempos de sonicación del jugo de naranja, de acuerdo con lo determinado por Wong (2010). Los bloques corresponden a los diferentes lotes que se analizaron, de manera que cada tratamiento tiene tres repeticiones.

- Procedimiento experimental

Se sonicaron muestras de jugo de naranja a seis diferentes tiempos y se hicieron tres repeticiones por cada tiempo. Una vez obtenidas las muestras sonicadas se procedió a determinar el contenido de polifenoles totales y el contenido de hesperetina y naringenina.

- Análisis de datos

Para determinar si es significativo el tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles totales y de hesperetina y naringenina se aplicaron análisis de variancia (ANDEVA) con el tiempo como factor continuo. Los resultados se presentaron como gráficos utilizando el modelo lineal para el contenido de cada compuesto en el tiempo.

Ya que el objetivo de la investigación no era generar un modelo matemático para obtener una ecuación que permitiera predecir la concentración de los compuestos a lo largo del tiempo de sonicación, las gráficas no incluyen los intervalos de confianza continuos alrededor de la recta. Para ilustrar el error puro y no el del ajuste lineal, se usan los intervalos de confianza correspondientes a cada uno de los promedios de la variable respuesta calculados para cada tiempo de sonicación.

4.3.2.2 Efecto del tiempo de sonicación sobre el perfil de ácidos orgánicos y vitamina C

- Diseño experimental estadístico

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo en seis niveles (0, 20, 40, 60, 80 y 105 minutos) que corresponden a los tiempos de sonicación del jugo de naranja, de acuerdo con lo determinado por Wong (2010). Los bloques corresponden a los diferentes lotes que se analizaron, de manera que cada tratamiento tiene tres repeticiones

- Procedimiento experimental

Se sonicaron muestras de jugo de naranja a seis diferentes tiempos y se hicieron tres repeticiones por cada tiempo. Una vez obtenidas las muestras sonicadas se procedió a determinar el contenido de ácido cítrico, málico y succínico y vitamina C total.

- Análisis de datos

Para determinar si era significativo el tiempo de sonicación sobre el contenido de ácido cítrico, málico y succínico y de vitamina C, se aplicaron análisis de variancia (ANDEVA) con el tiempo como factor continuo. Los resultados se presentaron como gráficos utilizando el modelo lineal para el contenido de cada compuesto en el tiempo.

Ya que el objetivo de la investigación no era generar un modelo matemático para obtener una ecuación que permitiera predecir la concentración de los compuestos a lo largo del tiempo, las gráficas no incluyen los intervalos de confianza continuos alrededor de la recta. Para ilustrar el error puro y no el del ajuste lineal, se usaron los intervalos de confianza continuos correspondientes a cada uno de los promedios calculados para cada tiempo de sonicación.

4.3.2.3 Efecto del tiempo de sonicación sobre la capacidad antioxidante hidrofílica del jugo de naranja.

- Diseño experimental estadístico

Se aplicó un diseño de bloques al azar con el tiempo en seis niveles (0, 20, 40, 60, 80 y 105 minutos) que corresponden a los tiempos de sonicación del jugo de naranja, de acuerdo con lo determinado por Wong (2010). Los bloques corresponden a los diferentes lotes que se analizaron, de manera que cada tratamiento tiene tres repeticiones.

- Procedimiento experimental

Se sonicaron muestras de jugo de naranja a seis diferentes tiempos (niveles (0, 20, 40, 60, 80 y 105 minutos) y se hicieron tres repeticiones por cada tiempo. Una vez obtenidas las muestras sonicadas se procedió a determinar la capacidad antioxidante hidrofílica de cada una.

- Análisis de datos

Para determinar si es significativo el tiempo de sonicación sobre la capacidad antioxidante hidrofílica se aplicaron análisis de variancia (ANDEVA) con el tiempo como factor continuo.

Los resultados se presentaron como gráficos utilizando el modelo lineal para la capacidad antioxidante hidrofílica en el tiempo.

Ya que el objetivo de la investigación no era generar un modelo matemático para obtener una ecuación que permitiera predecir la concentración de los compuestos a lo largo del tiempo, las gráficas no incluyen los intervalos de confianza continuos alrededor de la recta. Para ilustrar el error puro y no el del ajuste lineal, se usan los intervalos de confianza continuos correspondientes a cada uno de los promedios calculados para cada tiempo de sonicación.

4.4 Métodos de análisis

4.4.1 Contenido de humedad

Para determinar el contenido de humedad del jugo de naranja se siguió el procedimiento de la AOAC 950.27 (AOAC, 2005). Se debe secar a 60 °C por aproximadamente 14 horas hasta alcanzar masa constante, en estufa de convección. El ensayo se realizó por triplicado.

4.4.2 pH

Se determinó de acuerdo con la metodología de la AOAC 981.12 (AOAC, 2005). Se utiliza un pH metro con electrodo de vidrio y de referencia. Se toman las mediciones con las muestras a 25 °C. El ensayo se realizó por triplicado.

4.4.3 Sólidos solubles

Los sólidos solubles se miden como grados Brix, que es una escala que se basa en la relación entre la densidad de un jugo y la cantidad de azúcar que este contiene, como se indica en el método de la AOAC 932.12 (AOAC, 2005). Al medir los grados Brix se debe tomar en cuenta que, se deben hacer correcciones por temperatura y acidez cuando sean necesarias. Específicamente este dato es un porcentaje masa/masa de sólidos disueltos en una solución acuosa (Mauri *et al.*, 2011).

4.4.4 Acidez titulable

Para determinar la acidez titulable de los jugos se usó el método AOAC 942.15 (AOAC, 2005). Tradicionalmente, este valor se expresa como gramos de ácido cítrico por 100 mL de producto. Dependiendo del ácido a utilizar, para expresar el valor se usa un factor de conversión determinado. El ensayo se realizó por triplicado.

4.4.5 Capacidad antioxidante de radicales de oxígeno (ORAC-H)

Se utilizó el método ORAC hidrofílico para determinar la actividad antioxidante de acuerdo con el procedimiento P-SA-MQ-037 (CITA, 2019), el cual se basa en Huang *et al.* (2002). Para el análisis se utilizó un espectrofluorómetro (Synergy HT, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE. UU.) y placas de polipropileno de 96 pocillos, con fluoresceína como indicador del daño por radicales peroxilo. La longitud de onda de excitación se ajustó a 493 nm y la longitud de onda de emisión a 515 nm. Para preparar las soluciones se usó buffer de fosfato (75 mM, pH 7,4). Cada pocillo se llenó con 150 μ L de fluoresceína y 25 μ L del buffer (blanco), o soluciones de Trolox estándar o una muestra de una dilución apropiada. Las placas se incubaron a 37 ° C por 30 min. Después se añadieron 25 μ L de solución de AAPH (dihidrocloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)). Luego de la adición de AAPH y de la agitación, se midió la disminución de la fluorescencia cada minuto durante 45 min a 37 ° C. El valor H-ORAC se expresó como micromoles (μ mol) de equivalentes Trolox (TE) por 100 g, usando una curva de calibración externa de Trolox 4,0-32,3 μ mol TE / L y $r^2 = 0,9993$. El análisis se realizó por triplicado.

4.4.6 Perfil de ácidos orgánicos

Se determinó el perfil de ácidos orgánicos en el jugo de naranja de forma directa, ya que este tipo de muestra no requiere tratamiento previo. El método aplicado se hizo por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia como lo indica el procedimiento descrito en el documento P-SA-MQ-051 (CITA, 2016) basado en Gokturk (2006) y Nozal *et al.* (2003). Se utilizaron cartuchos OASIS® (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.) para extraer 500 μ L de extracto rico en polifenoles. Se inyectó el filtrado, con 2,5 mL de agua tipo I, en el equipo

HPLC-DAD (Serie LC-10A HPLC, Shimadzu), Kyoto, Japón). Cada ácido orgánico se analizó en una columna de intercambio iónico (Hi-Plex H 300 mm x 7,8 mm, 8 μ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE. UU.) Se utilizaron las siguientes condiciones analíticas: flujo 0,6 mL/min, 60 ° C; eluyente H₂SO₄ (2,25 mM), condición isocrática durante 40 min a 210 nm. La identificación de cada ácido orgánico se obtuvo utilizando patrones comparando los tiempos de retención. La cuantificación se realizó mediante curvas de calibración externas con un rango de linealidad de 50,0-1 000,0 mg de ácido orgánico / L y un $r^2 = 0,9996$. La concentración de cada orgánico se reportó como miligramos de ácido orgánico por 100 g de muestra fresca. El análisis se realizó por triplicado.

4.4.7 Polifenoles

4.4.7.1 Extracción

La extracción de polifenoles se hizo basándose en lo indicado por Iglesias *et al.* (2019). En su estudio se determinó que el mejor solvente de extracción es metanol al 90%. Además se determinó que la mejor proporción de jugo:solvente era de 3:7. Se utilizó una velocidad de centrifugación de 5000 rpm con protección de la luz para obtener mayores rendimientos. Por último se procedió a concentrar los extractos en metanol por medio de evaporación con nitrógeno hasta obtener extractos secos. El ensayo se realizó por triplicado.

4.4.7.2 Perfil de polifenoles

Se utilizaron los patrones disponibles de los principales polifenoles presentes en jugo de naranja, en este caso naringenina y hesperetina. Se inyectaron en el equipo de Cromatografía Líquida de Alto Eficiencia acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), donde luego también se inyectaron las muestras de jugo de naranja y se midió la absorción a 290nm. Se utilizó una columna marca Waters modelo XSelect HSS T3 C18 (2,1 x 150 mm, 3,5 μ m). La fase móvil correspondió a una solución acuosa de ácido fórmico (0,1% v/v) como fase móvil A y acetonitrilo (98% v/v) como fase móvil B. El gradiente será de 6-10% de B (0-16 min), 10-22% de B (16-36 min), 22-100% de B (36-38 min). Se utilizó un volumen de inyección de 10 μ L. El flujo fue de 0,3 mL/min a 30°C y se mantuvo por 5 minutos en las condiciones finales. Esto

se hizo de acuerdo con lo estudiado por Mesquita & Montero (2018), Iglesias *et al.* (2019), Khoddami *et al.* (2013) y Samukelo *et al.* (2015). Este método fue modificado para incluir el tiempo para regresar a las condiciones iniciales, así como el tiempo de estabilización de esas condiciones e iniciar una nueva inyección. El ensayo se realizó por triplicado. La identificación de cada polifenol se hizo utilizando patrones comparando los tiempos de retención y la cuantificación se realizó mediante curvas de calibración externas con un rango de linealidad entre 10-100 mg de polifenol / L de jugo de naranja.

4.4.7.3 Contenido total de polifenoles

Para cuantificar los polifenoles totales se utiliza el método de Folin-Ciocalteu y medir la absorbancia a 725 nm por espectrofotometría tal como se detalla en procedimiento P-SA-MQ-048 (CITA, 2014) que se basa en Iglesias *et al.* (2019). Se usó ácido gálico como estándar para construir la curva de calibración con un rango de linealidad de 10-80 mg GAE / L y $r^2 = 0,9996$. De esta forma los resultados se expresan en miligramos equivalentes de ácido gálico por 100 g de muestra fresca (GAE/ 100 g). Para eliminar las interferencias del ácido ascórbico y azúcares reductores se usaron cartuchos OASIS® (Waters Corporation, Milford, MA, EE. UU.). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro UV-VIS (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu, Tokio, Japón) a una longitud de onda de 765 nm frente a un blanco de reactivo. El análisis se realizó por triplicado.

4.4.8 Vitamina C total

Este método requiere la extracción de ácido ascórbico y la reducción del ácido dehidroascórbico (DHA) a ácido ascórbico (AA) de manera que se evite al máximo su deterioro para poder cuantificarlos, sumando ambos totales. Se determina el contenido de vitamina C total por HPLC como se explica en P-SA-MQ-024 (CITA, 2018), método basado en Hernández *et al.* (2006), Lykkesfeldt (2000), Mertz (2009) y Wechtersbach & Cigié (2007). La submuestra de jugo fresca se pesó (5-10 g) y luego se mezcló con 15-20 mL de la solución extractora (0,04% de ácido metafosfórico). Se homogenizó en vórtex durante 1 min y se centrifugó a 4 500 rpm (4 °C) durante 10 min. Lo anterior se hizo por duplicado y los dos sobrenadantes resultantes se mezclaron juntos en un balón de 50 mL y se aforó con la

solución extractora. Luego se tomó una alícuota de extracto que se colocó en una jeringa con un filtro de microporo de celulosa regenerada (0,45 o 0,20) μm y se filtró en un vial de 2 mL. Para reducir el DHA a AA, se tomó 500 μL de extracto y se le añadió 500 μL de clorhidrato de Tris [2-carboxietil] fosfina (40 mmol / L), se calentó a 30 °C durante 40 min. El extracto inicial y el extracto reducido se inyectaron en el equipo HPLC-UV (Serie LC-10A HPLC, Shimadzu, Kyoto, Japón). El AA se analizó en una columna C18 (Phenomenex Luna 5 μm , 100 Å, 250 mm x 4,60 mm) bajo las siguientes condiciones analíticas: 30 ° C, flujo 0,8 mL/min; eluyente H_2SO_4 (1,8 mM, pH 2,60) condición isocrática en 20 min a 245 nm. El análisis se realizó por duplicado. La identificación del ácido ascórbico se obtuvo mediante el uso de patrones y la comparación de los tiempos de retención. Por medio de curvas de calibración externas con un rango de linealidad de 7,5-150 mg AA / L y $r^2 = 0,9996$ se cuantificó el AA. La concentración de vitamina C total se reportó como mg de vitamina C total por 100 g de muestra fresca.

5. Resultados y discusión

Como pruebas preliminares se realizaron análisis de humedad, grados Brix, acidez total y pH a los jugos de naranja antes de aplicar ultrasonido. De esta manera se tenían las condiciones generales e iniciales del jugo y en caso de ser necesario se utilizarían para explicar algunos de los resultados obtenidos, sin embargo esto no se requirió. Los resultados de estos análisis se presentan en Anexos II.

5.1 Evaluación del efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles

5.1.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles totales

Como se aprecia en la figura 4, los resultados obtenidos indican que no se observó que el tiempo de tratamiento ultrasónico tuviera un efecto significativo en el contenido de polifenoles totales como equivalentes de ácido gálico ($P > 0,6564$; $1-\beta = 0,9209$). Esta conclusión se refuerza dado que la potencia del tratamiento es alta, es decir que se contó con una alta probabilidad de detectar diferencias si estas realmente existieran lo cual valida los resultados obtenidos.

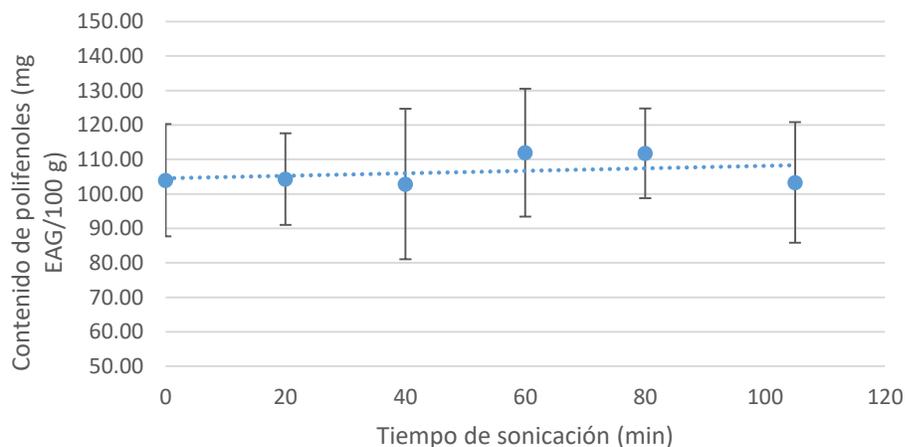


Figura 4. Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de polifenoles totales de jugo de naranja.

Se observa que no existe un efecto que indica que la variación del tiempo de tratamiento pueda afectar de alguna manera la cantidad de este tipo de compuestos. Los polifenoles son

fitoquímicos a los que se les atribuyen múltiples beneficios a la salud humana, por lo tanto se busca su conservación durante el procesamiento de los alimentos que los contienen. Lo observado en la figura 4 anterior indica que el tratamiento de ultrasonido se pudo aplicar hasta por 105 minutos sin alterar el contenido de polifenoles totales, es decir que no se vio una afectación en el contenido de estos compuestos en el jugo como sí lo hacen las tecnologías térmicas que se ha demostrado que pueden disminuir la concentración de algunos polifenoles y dañar su estructura (Cabral *et al.*, 2010; Azzouzi *et al.*, 2018).

En algunos estudios se ha observado que el ultrasonido ha aumentado el contenido de polifenoles en jugos de diversas frutas debido a que la cavitación produce inestabilidad en la pared celular provocando que esta se rompa que se liberan algunos compuestos bioactivos y por lo tanto aumenta su biodisponibilidad. En las investigaciones donde se han obtenido aumentos en la concentración de polifenoles, los tratamientos ultrasónicos aplicados generan potencias entre 1000 W y 1500 W (Zafra *et al.*, 2013; Guerrouj *et al.*, 2016), mientras que en el presente estudio el tratamiento aplicado fue de $50 \pm 0,2$ W. Se considera que el tratamiento aplicado pudo no haber tenido la energía suficiente para desestabilizar la pared celular y aumentar la disponibilidad de los polifenoles.

Los resultados obtenidos coinciden con lo observado por Wong *et al.* (2010) quienes aplicaron un tratamiento de osmosonificación en jugo de mora cuyas condiciones de tratamiento ultrasónico fueron las mismas que las usadas en la presente investigación. Estos autores describen que el contenido de los polifenoles analizados, antocianinas y elagitaninos, no tuvieron diferencias significativas ante el tratamiento aplicado a diferentes tiempos.

5.1.2 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de flavanonas

La composición de flavonoides del jugo de naranja puede variar ampliamente dependiendo de múltiples factores, por lo tanto tienen una distribución considerablemente heterogénea (Santana & Jacobo, 2018; Quiñones *et al.*, 2012). En este caso, se determinó la naringenina como el polifenol mayoritario en el jugo de naranja fresco utilizado para esta investigación. La naringenina se relaciona con el amargor en jugos de cítricos por lo que se consideró importante evaluar el efecto del ultrasonido en la concentración de este flavonoide para

visualizar si podría haber cambios en uno de los aspectos más importantes relacionados con el sabor de un jugo.

Para estudiar el efecto del tiempo de sonicación sobre los polifenoles más abundantes en el jugo de naranja, se realizó un análisis para evaluar el perfil de este tipo de compuestos en el jugo. Se contó con patrones de dos de los flavonoides más importantes en cítricos, hesperetina y naringenina. En las Figuras 5 y 6 se presentan los cromatogramas obtenidos al inyectar las soluciones patrón de ambos flavonoides en el equipo HPLC-DAD.

Para lograr una identificación de los compuestos polifenólicos en el jugo de naranja se compararon los tiempos de retención de los patrones con los del jugo. Al realizar la comparación se observó que ninguno de los picos de la muestra coincidían (ver Figura 7 y 8) con el tiempo de retención del patrón de hesperetina (27,342 min), por lo tanto, no se pudo identificar la presencia de este flavonoide en la muestra de jugo de naranja con la que se trabajó.

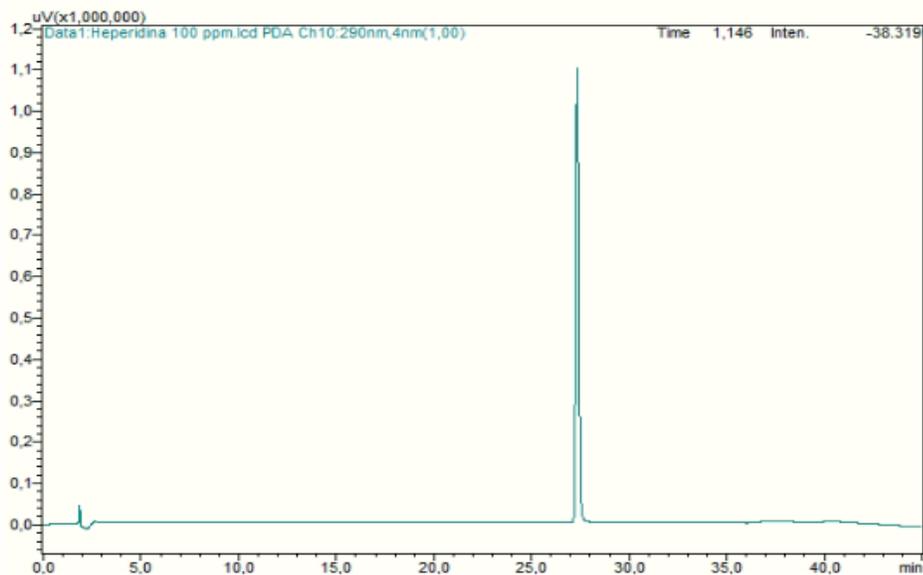


Figura 5. Cromatograma del estándar de hesperetina 100 ppm analizado por HPLC-DAD a 290 nm.

Por otro lado, al analizar el cromatograma del estándar de naringenina en la Figura 6, se observan dos señales. La señal 2 corresponde al compuesto naringenina (26,18 min) pues es la señal mayoritaria observada. Además de este pico, se puede ver una pequeña señal 1 (19,285 min), que se detecta antes que el pico mayoritario. Es importante resaltar que según el certificado de análisis (ver Anexo I) el estándar de naringenina posee una pureza $\geq 95\%$, por lo que existe la posibilidad de que hayan cantidades minoritarias de otros compuestos relacionados, en este caso, podrían ser las formas glucosiladas de la naringenina, (naringina y narirutina), por la manera en que se extrae el estándar.

La hipótesis anterior se puede ratificar si se considera que las formas glucosiladas, al poseer carbohidratos ligados y contar con más grupos hidroxilos, son más polares que las respectivas agliconas (Cartaya & Reynaldo, 2001), por lo que en la separación cromatográfica su tiempo de retención sería menor, ya que este tipo de estructuras serían menos afines a la fase estacionaria. Este comportamiento se ha evidenciado en varios estudios como en Dugo *et al.* (2005), Silva *et al.* (2014), He *et al.* (2018).

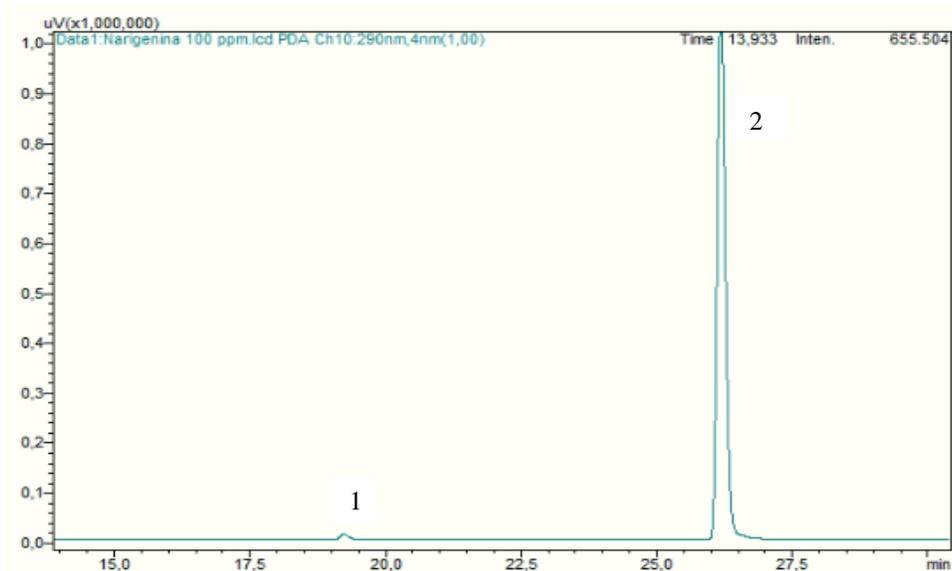


Figura 6. Cromatograma del estándar de naringenina 100 ppm analizado por HPLC-DAD a 290 nm.

Al comparar el extracto rico en polifenoles de jugo de naranja con el estándar de naringenina (Figura 7 y 8), se observa que la señal mayoritaria del jugo no coincide con la señal mayoritaria del estándar. Sin embargo, se observa que la señal 1 del estándar de naringenina se encuentra muy cercano a la señal mayoritaria (19,402 min) que aparece en el extracto de jugo de naranja. Se estima, por tanto que en el jugo esta flavanona se podría encontrar glucosidada.

Además al comparar los espectros de absorción de ambos patrones tanto de hesperetina como naringenina con el del extracto de polifenoles de jugo de naranja se puede observar que son sumamente similares. El señal matoritaria de la hesperetina está a 287 nm (ver Anexo V) y la señal 2 de la naringenina está a 289 nm (ver Anexo III). La señal 1 de la naringenina está a 282 nm (ver Anexo IV) lo cual es un valor un poco más alejado de los otros dos pero es de esperar ya que la concentración de ese compuesto es muy baja. Por último se observa que la señal A del extracto analizado está a 284 nm (ver Anexo VI). Tomando en cuenta todo lo anterior se puede confirmar que el polifenol mayoritario del extracto pertenece a la misma familia que los patrones utilizados.

Con en el fin de cumplir con el objetivo de observa el efecto del ultrasonido, se decidió cuantificar esta señal de cromatograma (polifenol A), señalado en la figura 8, por cuanto es la señal con mayor intensidad, como equivalentes de naringenina. Se puede apreciar en la Figura 9 la concentración del polifenol A a los diferentes tiempos de sonicación. Este parámetro es útil para evaluar de una manera más específica el comportamiento del polifenol más abundante en el jugo de naranja ante el efecto del ultrasonido. Los valores indican que la concentración de este compuesto se mantiene constante al aumentar el tiempo de ultrasonido, es decir, que no hay una tendencia que indique que el tiempo de sonicación afecta de alguna manera el contenido del polifenol mayoritario A ($P > 0,7650$; $1-\beta = 0,9976$).

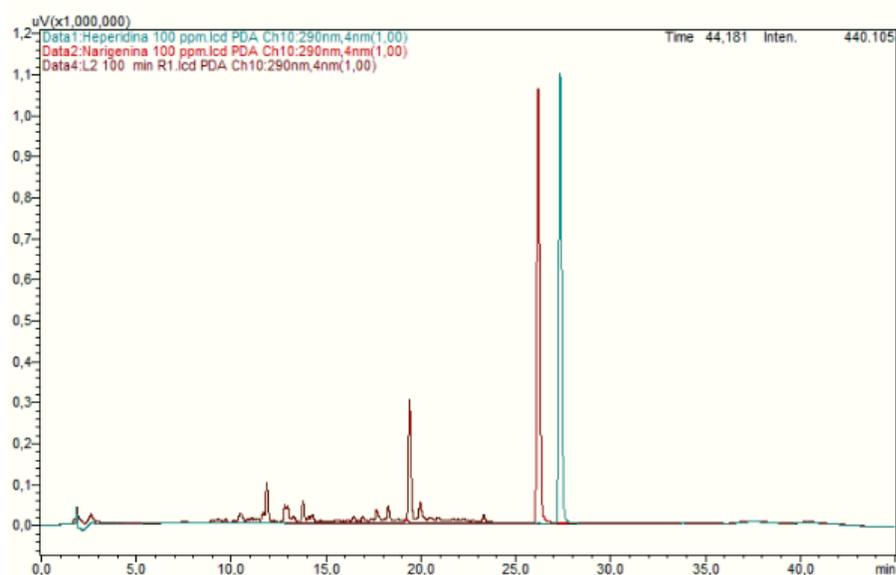


Figura 7. Cromatogramas sobrepuestos del estándar de hesperetina 100 ppm (azul), estándar de naringenina 100 ppm (rojo) y de un extracto de jugo de naranja analizado (café). Analizados por HPLC-DAD a 290 nm, C18, 0,3 mL/ min, 30 °C, fase A: ácido fórmico 0,1%, fase B: acetonitrilo 98%

Esto implica que el tratamiento con ultrasonido, bajo las condiciones utilizadas e incluso por periodos prolongados, permite la conservación de uno de los principales compuestos bioactivos y no afecta su concentración o estructura. En Tiwari *et al.* (2008) se analizó la degradación de polifenoles, como las antocianinas, en jugo de fresa ante el efecto del ultrasonido, sin embargo, estos autores estudiaron múltiples condiciones de amplitud. Se encontró que a una amplitud del 40% la concentración de antocianinas aumentó levemente (<1%) y de forma no significativa.

Estos resultados coinciden con lo observado en la Figura 9 y señalan que las condiciones de ultrasonido utilizadas, independientemente del tiempo, conservan la cantidad del polifenol mayoritario en el jugo de naranja.

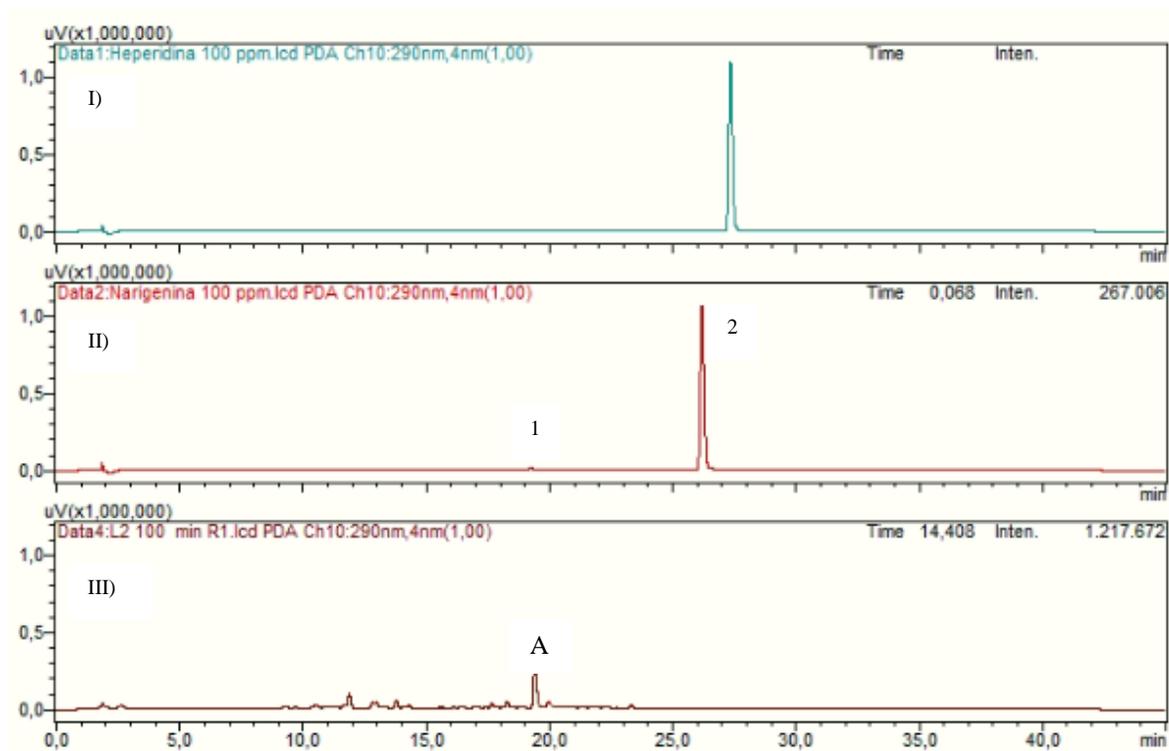


Figura 8. Cromatogramas: I) Estándar de hesperetina 100 ppm (azul). II) Estándar de naringenina 100 ppm (rojo). III) Extracto de jugo de naranja analizado (café). Analizados por HPLC-DAD a 290 nm, C18, 0,3 mL/ min, 30 °C, fase A: ácido fórmico 0,1%, fase B: acet onitrilo 98%

Hallazgos similares obtuvieron Khan *et al.*, (2010) quienes observaron que el ultrasonido a 20 kHz y con 60 W de potencia no causa degradación de flavonoides. Estos autores afirman que el daño a la estructura química de los flavonoides ocurre a frecuencias mayores a la utilizada en este ensayo. Los resultados explicados anteriormente son de gran relevancia ya que apuntan a que el ultrasonido mantiene la importancia nutricional del jugo de naranja.

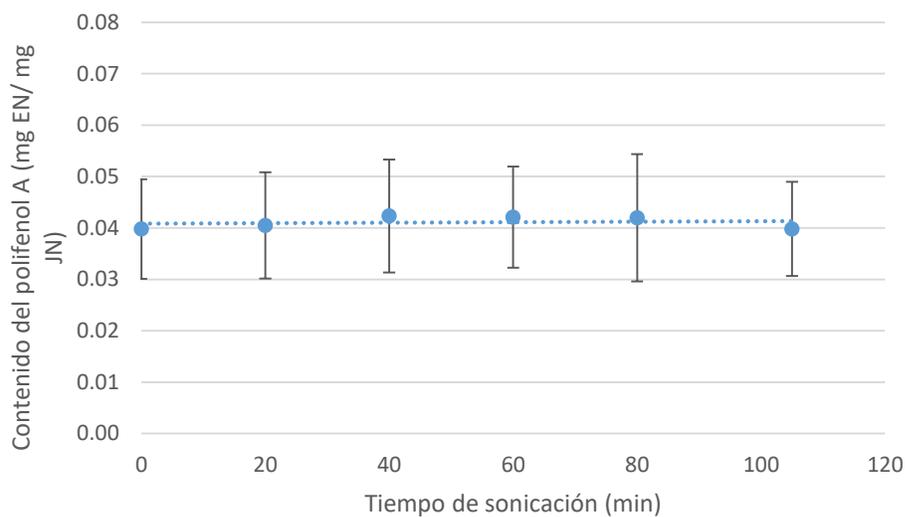


Figura 9. Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de equivalentes de naringenina en el jugo de naranja (n=3; barras de error representan el intervalo de confianza).

Debido a que no hay un efecto del tiempo de sonicación sobre este tipo de compuesto, se puede predecir que no hay cambios en el sabor del jugo en el cual los polifenoles, como la naringina, tienen gran incidencia. Por lo anterior, no se consideró necesario hacer pruebas sensoriales. Es notable que se puede sonicar el jugo de naranja hasta 105 minutos y la concentración de equivalentes de naringenina se mantiene muy similar a la del jugo fresco.

5.2 Evaluación del efecto del tiempo de sonicación sobre el perfil de ácidos orgánicos y contenido de vitamina C

5.2.1 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de vitamina C

La determinación de la cantidad de vitamina C en el jugo de naranja es tal vez el parámetro de calidad más importante en su procesamiento. Este antioxidante cumple diversas funciones fisiológicas en el cuerpo humano por lo tanto su conservación en los alimentos es de vital relevancia (Russell, 2004).

La preservación de la vitamina C es uno de los retos más grandes para la industria debido a que es sumamente inestable, por lo tanto, funciona como índice de control de nutrimentos (Herrera *et al.*, 2015). Se pudo determinar que no hay efecto del tiempo de sonicación sobre la concentración de vitamina C ($P>0,0734$, $1-\beta=1,000$) (Figura 10).

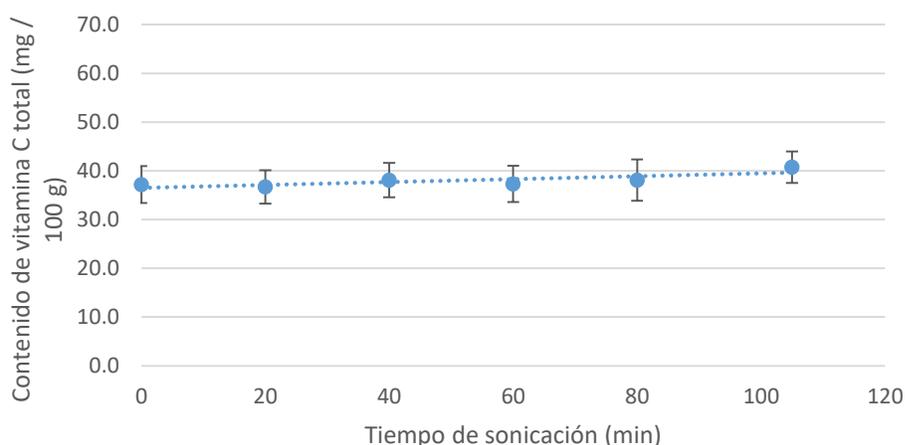


Figura 10. Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de vitamina C total en el jugo de naranja (n=3; barras de error representan el intervalo de confianza).

Investigaciones anteriores sobre el efecto del ultrasonido en vitamina C han encontrado que aunque sí hay degradación del compuesto, ésta es menor en comparación con la disminución provocada por tratamientos térmicos. Además, se ha encontrado que en el jugo de naranja sonicado se logra una mayor retención de vitamina C durante el almacenamiento, lo cual se asocia con una mayor vida útil de la bebida (Tiwari *et al.*, 2009a; Tiwari *et al.*, 2009b; Gómez *et al.*, 2010; Wahia *et al.*, 2020). Sin embargo, la presente investigación utilizó condiciones de aplicación de ultrasonido de menor intensidad, menor amplitud, temperatura y densidad de energía acústica.

Esto indica que las condiciones usadas permiten la conservación de la concentración de vitamina C e incluso a nivel de muestra, se pueden observar pequeños aumentos al aplicar el tratamiento por más tiempo, aunque se recalca que no hay diferencias significativas. Además, estos resultados comprueban que aunque el ultrasonido puede provocar microaumentos de temperatura y de presión (Bhattacharjee *et al.*, 2019; Feng & Yang, 2011), que en otras

circunstancias han afectado negativamente compuestos bioactivos causando su degradación, como la vitamina C, bajo las condiciones utilizadas esto no ocurrió.

Entonces, se puede decir que, incluso con el tratamiento máximo utilizado (105 min), el uso de ultrasonido de baja potencia, de ser utilizado como parte de una aplicación tecnológica, contribuiría con una mayor vida útil del jugo de naranja puesto que mantiene la concentración de vitamina C invariable respecto al jugo fresco sin sonicar.

5.1.4 Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de ácidos orgánicos

Tras el análisis por HPLC y la identificación de cada ácido, al comparar los tiempos de retención con patrones, se determinó que los ácidos orgánicos mayoritarios en el jugo de naranja son el ácido cítrico, succínico y málico. Como era de esperar, el ácido cítrico es el que se encontraba en mayor cantidad de los tres, pues de acuerdo con la literatura es el ácido más abundante y característico en jugo de naranja (Selli *et al.*, 2017). Esta proporción se mantuvo en todos los tiempos de sonicación evaluados.

En la Figura 11 se puede observar que no existe una tendencia que señale que el tiempo de sonicación afecte de manera alguna la concentración de ácido cítrico ($P > 0,9733$; $1-\beta = 1,0000$), málico ($P > 0,4079$; $1-\beta = 0,7900$) y succínico ($P > 0,8159$; $1-\beta = 0,9118$) en el jugo de naranja.

La degradación química de ácidos orgánicos provocada por la sonicación se debe principalmente a la generación de radicales de oxígeno formados durante el tratamiento. Sin embargo, esto ocurre de manera notoria cuando se utilizan frecuencias mucho más altas (200 kHz o más) que las aplicadas en la presente investigación (Okitsu *et al.*, 2016; Bremner *et al.*, 2011). Esto confirma que las condiciones bajo las cuales se aplica la sonicación siempre son determinantes en los resultados obtenidos.

Una vez más, los resultados permiten decir que el tratamiento ultrasónico utilizado, incluso en las condiciones de tiempo más prolongado (105 minutos), no afecta el perfil de los ácidos orgánicos mayoritarios en el jugo de naranja, lo cual significa que conserva uno de los parámetros de calidad más importantes.

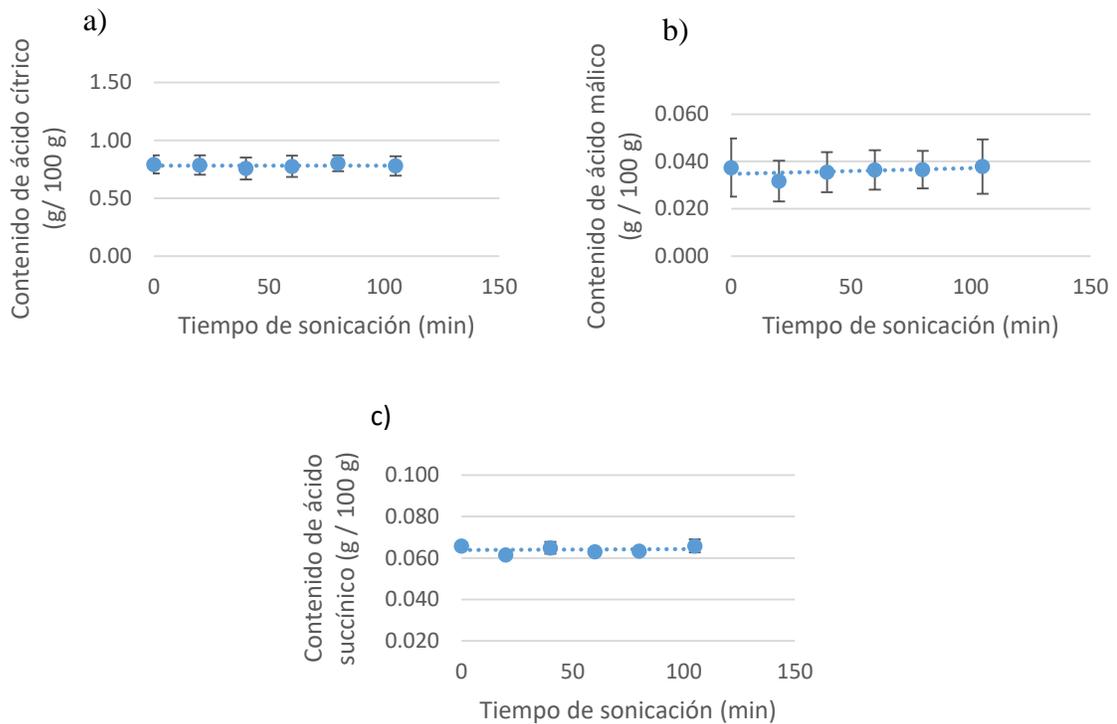


Figura 11. Efecto del tiempo de sonicación sobre el contenido de a) ácido cítrico, b) ácido málico y c) ácido succínico (n=3; barras de error representan el intervalo de confianza).

La concentración de ácidos orgánicos puede incidir en el sabor y el aroma del jugo (Blanco y Mangas, 2004) y debido a que el tiempo de sonicación no produce cambios significativos en la concentración de estos compuestos, se pronostica que no hay diferencias importantes en cuanto a sabor y aroma tampoco. Además, se considera que el tratamiento utilizado es viable para conservar los ácidos orgánicos presentes en el jugo de naranja, preservando las características del jugo fresco.

5.3 Efecto del tiempo de sonicación sobre la capacidad antioxidante hidrofílica

El método H-ORAC permite obtener una medida de la capacidad protectora ante la oxidación que exhiben los compuestos hidrofílicos presentes es una muestra. Ante el creciente interés de los consumidores por obtener alimentos funcionales y beneficiosos para la salud, las propiedades antioxidantes de las frutas y sus derivados ha ganado relevancia.

Además, se busca encontrar maneras para conservar estas características o minimizar el daño provocado por el procesamiento o factores ambientales.

Lo anterior resalta la importancia de los resultados presentados en la Figura 12. Se puede observar que sí existe un efecto del tiempo sobre la capacidad antioxidante ($P>0,0484$). Es decir, al aumentar el tiempo de tratamiento también se potencia significativamente la capacidad de los compuestos bioactivos de detener procesos oxidativos en el jugo de naranja y también en el cuerpo humano.

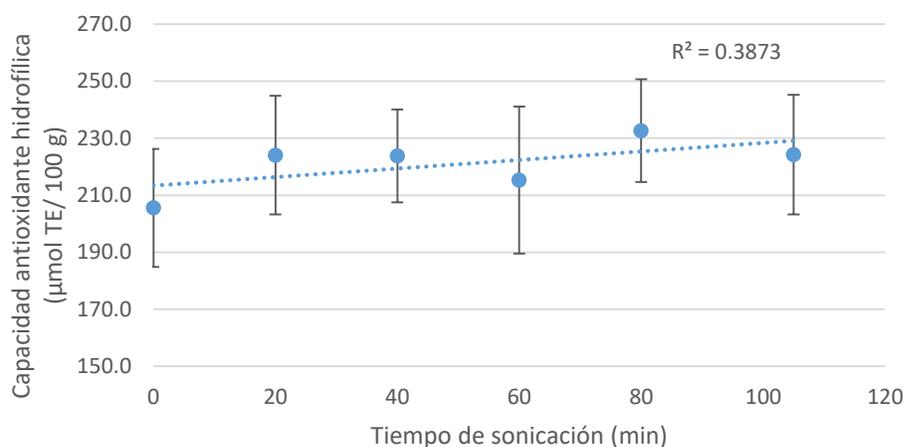


Figura 12. Efecto del tiempo de sonicación sobre la capacidad antioxidante hidrofílica.

($n=3$; barras de error representan el intervalo de confianza).

Aunque el aumento es estadísticamente significativo esto no significa que en lo práctico también lo sea, el aumento observado no necesariamente se traduce en una mayor capacidad antioxidante hidrofílica real y todo los efectos en la salud que esto implica sino que es más bien un aumento numérico. Sin embargo, se considera que los resultados observados son relevantes y que invitan a una investigación más profunda sobre el efecto que puede tener el ultrasonido sobre este parámetro.

El aumento en el H-ORAC al incrementar el tiempo de sonicación, se podría explicar por aumentos en compuestos antioxidantes tales como vitamina C, polifenoles o flavonoides. Si bien los resultados a nivel de muestras indican pequeños incrementos en las concentraciones, estos son estadísticamente no significativos. Sin embargo, podría haber un efecto sinérgico causado por el conjunto de esos incrementos pequeños en los compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes. También es posible que el ultrasonido haya afectado positivamente compuestos antioxidantes cuya concentración no se evaluó en esta investigación, pero que afectan directamente el H-ORAC del jugo.

Otra explicación para el aumento de la capacidad antioxidante hidrofílica del jugo de naranja se podría deber a las reacciones sonoquímicas desencadenadas por el ultrasonido. Ashokkumar *et al.* (2008) realizaron un estudio preliminar en el que evalúan si el ultrasonido puede mejorar la funcionalidad de algunos alimentos al modificar ciertos ingredientes. Los hallazgos de estos autores explican que la cavitación acústica, bajo determinadas condiciones, produce radicales hidroxilo los cuales pueden modificar compuestos fenólicos e incluso flavonoides.

Es bien sabido que la capacidad antioxidante de los flavonoides se ve beneficiada por el grado de hidroxilación que el compuesto presente. Por lo tanto, el aumento significativo en la capacidad antioxidante hidrofílica del jugo de naranja podría deberse en gran medida a la hidroxilación de los flavonoides presentes en el jugo, los cuales son los polifenoles más importantes en cítricos. Por lo tanto, se podría presumir que al aumentar el tiempo de sonicación, se produjo un aumento en la hidroxilación de estos compuestos debido a la cavitación y en consecuencia se aumentó la capacidad antioxidante hidrofílica.

De los resultados obtenidos se deriva que, en general, el tiempo de tratamiento de ultrasonido no tuvo un efecto negativo en los compuestos bioactivos polares ni en la capacidad antioxidante del jugo de naranja. Los datos analizados implican que el ultrasonido, bajo las condiciones estudiadas y hasta por 105 minutos, se podría utilizar en jugo de naranja como parte de otras aplicaciones tecnológicas dado que no afecta los compuestos bioactivos hidrofílicos ni la capacidad antioxidante. Esta es una ventaja notable del ultrasonido sobre las tecnologías térmicas ya que potencia la eficiencia de otras operaciones unitarias y además

permitiría la conservación de los compuestos bioactivos hidrofílicos durante el procesamiento, porque las condiciones de frecuencia, amplitud y densidad de energía acústica permiten conservar las estructuras de los compuestos analizados y no provocan su degradación.

Los resultados analizados indican que el sabor del jugo sonicado, incluso bajo el tratamiento más prolongado (105 minutos) no se afecta de ninguna manera. Esto porque los compuestos más relevantes relacionados con la calidad sensorial del jugo, tales como los polifenoles y los ácidos orgánicos, permanecen invariables. De lo anterior se infiere que, en ese aspecto, el procesamiento con ultrasonido, bajo estas condiciones, permite obtener un jugo de naranja cuyas características son iguales a las del jugo fresco. Esta conclusión podría ser extrapolable a otros jugos cítricos y también de otras frutas cuya composición de compuestos bioactivos hidrofílicos sea similar a la del jugo de naranja.

Al mismo tiempo se recalca que todavía no existe el procesamiento ultrasónico a nivel industrial pero estos hallazgos motivan a dirigir las investigaciones hacia la posibilidad de utilizarlo a gran escala. Sin embargo, para esto los efectos del ultrasonido sobre las matrices deben ser estudiados y descritos con exactitud. Además, tener equipos de ultrasonido para procesamiento industrial permitiría evaluar los costos reales de esta tecnología y compararlo adecuadamente con otras aplicaciones como, por ejemplo, los tratamientos térmicos.

6. Conclusiones

- Se determinó que el tiempo de sonicación no tiene un efecto sobre la concentración de polifenoles totales en jugo de naranja fresco ($P > 0,6564$; $1-\beta = 0,9209$).
- Se concluyó que el tiempo de sonicación no afecta la concentración del polifenol mayoritario expresado como equivalentes de naringenina en jugo de naranja fresco ($P > 0,7650$; $1-\beta = 0,9976$).
- Se determinó que el tiempo de sonicación no tiene un efecto sobre la concentración de los principales ácidos orgánicos del jugo de naranja fresco: cítrico ($P > 0,9733$; $1-\beta = 1,0000$), málico ($P > 0,4079$; $1-\beta = 0,7900$) y succínico ($P > 0,8159$; $1-\beta = 0,9118$).
- No hay un efecto estadísticamente significativo del tiempo de sonicación sobre la concentración de vitamina C total del jugo de naranja fresco ($P > 0,0734$, $1-\beta = 1,000$).
- Se concluye que el tiempo de sonicación tiene un efecto estadísticamente significativo sobre el H-ORAC del jugo de naranja ($P > 0,0484$). Al aumentar el tiempo de sonicación aumenta el H-ORAC.
- El tiempo de sonicación no afectó negativamente el contenido de compuestos bioactivos polares ni la capacidad antioxidante hidrofílica. De hecho, esta última propiedad mostró aumentos significativos al aumentar el tiempo de sonicación. De manera que se concluye que el ultrasonido bajo las condiciones utilizadas puede usarse como parte de una aplicación tecnológica y no afectaría de manera negativa la concentración de estos compuestos.

7. Recomendaciones

- Se recomienda incluir el análisis de flavonoides totales, por colorimetría, del jugo sonicado, para evaluar con más detalle si hay cambios en la concentración de este tipo de polifenoles, ya que son de los más importantes en la matriz analizada.
- Se insta a realizar un perfil de polifenoles del jugo fresco, previo a las etapas experimentales, para determinar con anticipación cuales polifenoles se encuentran en mayor cantidad para escoger y adquirir una mayor variedad de patrones y hacer evaluaciones individuales de cada compuesto.
- Para facilitar la identificación de compuestos y hacerlo de forma más exacta, se aconseja evaluar la posibilidad de usar el equipo de HPLC o UPLC acoplado a Espectrometría de Masas (MS), esto permitiría enfocar la investigación hacia compuestos específicos.
- Se considera útil realizar la etapa experimental de esta investigación pero utilizando ultrasonido pulsado, debido a que es otra modalidad de ultrasonido ampliamente estudiada y así se puede comparar con la sonicación directa. De esta manera se puede determinar cuál técnica da resultados más favorables en jugo de naranja.
- Se propone extender el alcance de este estudio y evaluar el contenido de estos compuestos bioactivos polares durante el almacenamiento, luego de la sonicación.
- Con el objetivo de potenciar los efectos del ultrasonido se recomienda incluir el uso de temperaturas medias (30-35°C) durante la sonicación, para evaluar si esto aumenta la disponibilidad de los compuestos bioactivos polares.

8. Referencias bibliográficas

- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M., Wu, T., Lei, S., Khan, M. & Zeng, X. 2014. Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*. 21 (3): 984-990.
- Aguilar, K., Garvín, A., Ibarz, A. & Augusto, P. 2017. Ascorbic acid stability in fruit juices during thermosonication. *Ultrasonics Sonochemistry*. 37: 375-381.
- Ahmed, M. & Eun, J. 2017. Flavonoids in fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 58 (18): 3159-3188.
- Alighourchi, H., Barzegar, M, Sahari, H. & Abbasi, S. 2013. Effect of sonication on anthocyanins, total phenolic contents and antioxidant capacity of pomegranate juices. *Int. Food. Res. J.* 20(4): 1703-1709.
- Anaya, L., Velázquez, R., Roig, A., García, H., Sayago, S. & Montalvo, E. 2017. Thermosonication: an alternative processing for fruit and vegetable juices. *Trends in food science and technology*. 61: 26-37
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 16^a ed. Método 942.15. Association of Official Analytical Chemists. Estados Unidos.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 16^a ed. Método 950.27. Association of Official Analytical Chemists. Estados Unidos.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 16^a ed. Método 981.12. Association of Official Analytical Chemists. Estados Unidos.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis. 16^a ed. Método 932.12. Association of Official Analytical Chemists. Estados Unidos.
- Aptekmann, N. & Cesar T. 2013. Long-term orange juice consumption is associated with low LDL- cholesterol and apolipoprotein B in normal and moderately hypercholesterolemic subjects. *Lipids Health Dis.* 12 (1): 119-129.
- Aschoff, J., Kaufmann, S., Kalkan, O., Neidhart, S., Carle, R., Schweiggert, R. 2015. In vitro bioaccessibility of carotenoids, flavonoids and vitamin C from differently processed oranges and orange juices (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *J. of Agr. and F. Chem.* 63: 578-587.
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K. & Versteeg, C. 2008. Modification of ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 9(2): 155-160.
- Azzouzi, H., Elfazazi, K., Achchoub, M., Chafki, L., Jbilou, M. & Salmaoui, S. 2018. Effect of thermal pasteurization on the physicochemical stability and nutritional quality of Moroccan Valencia Late orange juice. *Int.J. Eng. Sc. & Reas. Tech.* 7(8): 277-283.
- Balasubramaniam, V. 2008. Non-thermal Preservation of fruit juices. Consultado el 2 de junio del 2020. Recuperado de

https://www.researchgate.net/publication/322566758_Non-Thermal_Preservation_of_Fruit_Juices

- Ballesteros, E. 2015. Phenolic compounds. En Nollet, L. & Toldra, F. (eds). Handbook of Food Analysis. CRC Press, Estados Unidos. p. 695-716.
- Barbosa, G. & Bermúdez, D. 2011. Introduction. En Zhang, H., Barbosa, G., Balasubramaniam, V., Dunne, P., Farkas, D. & Yuan, J. (eds). Nonthermal processing technologies for food. Wiley-Blackwell, Estados Unidos. p. XX-XXX.
- Barbosa, G., Góngora, M., Rodríguez, J. & Swanson, B. 2009. Nonthermal processing of foods and emerging technologies. En Barbosa, G. (ed). Food Engineering. EOLSS, Reino Unido. p. 281-310.
- Barreca, D., Gattuso, G., Bellocco, E., Calderaro, A., Trombetta, D., Smeriglio, A., Nabavi, S. 2017. Flavanones: Citrus phytochemical with health-promoting properties. *BioFactors*. 43(4): 495–506.
- Barreca, D., Mandalari, G., Calderaro, A., Smeriglio, A., Trombetta, D., Felice, M. & Gattuso, G. 2020. Citrus flavones: an update on sources, biological functions, and health promoting properties. *Plants*. 9 (3): 288-311.
- Bates, R., Morris, J. & Crandall, P. 2001. Principles and practices of small and medium scale fruit juice processing. FAO, Italia.
- Berk, Z. 2016. Citrus fruit processing. Elsevier, Estados Unidos.
- Bhat, R., Kamaruddin, N., Liong, M. & Karim, A. 2011. Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrason Sonochem*. 18:1295–1300.
- Bhardwaj, R., Nandal, U., Pal, A. & Jain, S. 2014. Bioactive compounds and medicinal properties of fruit juices. *Fruits*. 69 (5): 391-412.
- Bhattacharjee, C., Saxena, V. & Dutta, S. 2019. Novel thermal and non-thermal processing of watermelon juice. *Trends in food science and technology*. 93 (2019): 234-243.
- Blanco, D. & Mangas, J. 2004. Organic acids. En Nollet, L. (ed). Handbook of food analysis: physical characterization and nutrient analysis. Marcel Dekker, Estados Unidos. p. 573-603.
- Bremner, D., Burgess, A. & Chand, R. 2011. The chemistry of ultrasonic degradation of organic compounds. *Current organic chemistry*. 15: 168-177.
- Brescia, P. 2012. Determination of antioxidant potencial using an oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay with Synergy H4. Consultado el 26 de marzo del 2020. Disponible en <https://www.biotek.com/resources/application-notes/determination-of-antioxidant-potential-using-an-oxygen-radical-absorbance-capacity-orac-assay-with-synergy-h4/>
- Bogue, J. & Troy, A. 2016. Functional beverages: market trends and market-oriented new product designs. In Shahidi, F. & Alasalvar, C. (eds). CRC Press, Estados Unidos. p. 3-14.
- Borg, D. 2013. Oxygen free radicals and tissue injury. En Tarr, M. & Samson, F. (eds). Oxygen free radicals in tissue damage. Estados Unidos, Springer. p. 1-11.

- Cabral, L. Bravo, A., Freire, M., Bizzo, H. & Matta, V. 2010. Citrus fruits and oranges. En Hui, Y. (ed). Handbook of fruit and vegetable flavor. Wiley-Blackwell, Estados Unidos. p. 265-278.
- CACIA. 2019. Azúcar, jugos y concentrados de frutas vieron afectadas sus exportaciones (en línea). Costa Rica. Consultado el 22 de agosto del 2020. Disponible en <http://alimentaria.cacia.org/160-noviembre-2018/azucar-jugos-y-concentrados-de-frutas-vieron-afectadas-sus-exportaciones/>
- Caminiti, I., Noci, F., Morgan, D., Cronin, D. & Lyng, J. 2012. The effect of pulsed electric fields, Ultraviolet Light or High Intensity Light Pulses in Combination with Manothermosonication on selected physico-chemical and sensory attributes of an orange and carrot juice blend. *Food Bioprod Process* 90:442–448.
- Cartaya, O. & Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*. 22 (2): 5-14.
- Cassidy, A. & Kay, C. 2011. Phytochemicals. In Lanham, S., McDonald, I. & Roche, H. (eds). *Nutrition and Metabolism*. Wiley- Blackwell, Estados Unidos. p. 339-353.
- Chemat, F., Huma, Z. & Khan, M. 2011. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*. p. 813-835.
- Cisneros, M.F. 2012. Consumo de jugos abre oportunidad a exportadores. *La República*.
- CITA. 2016. Método de análisis: determinación de ácidos orgánicos por HPLC. P-SA-MQ-051. Emisión N°2. San José, Costa Rica.
- CITA. 2018. Método de análisis: determinación de vitamina C por HPLC. P-SA-MQ-024. Emisión N°7. San José, Costa Rica
- CITA. 2019. Método de análisis: determinación de la actividad antioxidante ORAC hidrofílico. P-SA-MQ-037. Emisión N°10. San José, Costa Rica.
- Clay, J. 2004. *World Agriculture and the Environment: a Commodity-by-Commodity Guide to Impacts and Practices*. Island Press, Londres.
- CODEX. 2005. General Standard for Fruit Juices and Nectars.
- Cubero, M. 2014. Product Innovation: Current Trends in Fruit Juice Production to Meet Market Demands. In Falguera, V. & Ibarz, A. (eds). *Juice Processing: Quality, Safety and Value-Added Opportunities*. CRC Press, Florida. p. 1-13.
- Devaki, S. & Raveedran, R. 2017. Vitamin C: Sources, functions, sensing and analysis. En Hamza, A (ed). *Vitamin C*. Intech Open, Croacia. p. 3-20.
- Díaz, M., Castellar, M.R. & Obón, J.M. 2013. Juices and non-alcoholic beverages. En de la Guardia, M. & González, A. (ed). *Food protected designation of origin: methodologies and applications*. Elsevier, Reino Unido. p. 439-455.
- Domínguez, J., Velderrain, G., Ovando, M., Quirós, A., Villegas, M., González, G. 2018. Phenolic compounds in fruits. En Nollet, L. & Gutierrez, J. (eds). *Phenolic compounds in food*. CRC Press, Estados Unidos. p. 355-368.
- Dugo, P., Presti, M., Öhman, M., Fazio, A., Dugo, G., & Mondello, L. 2005. Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *J. Sep Sci*. 28 (11): 1149-1156.

- Durazzo, A. 2018. Extractable and non-extractable polyphenols: an overview. En Saura, F. & Perez, J. (eds). Non-extractable polyphenols and carotenoids. The Royal Society of Chemistry, Reino Unido. p. 37-45.
- Falguera, V. & Ibarz, A. 2014. Squeezing Fruits in the Second Decade of the Twenty-First Century: The Current Situation of the Juice Industry. In Falguera, V. & Ibarz, A. (eds). Juice Processing: Quality, Safety and Value-Added Opportunities. CRC Press, Florida. p. 1-13.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2003. World markets for organic citrus and citrus juices. Consultado el 2 de marzo de 2020. Disponible en <http://www.fao.org/3/j1850e/j1850e00.htm#TopOfPage>.
- Neves, M., Trombin, V., Monaco, L. & Bordonal, R. 2019. Orange juice chain. Quickfox Publishing, Brasil.
- FDA (Food and Drug Administration). 2018. Guidance for Industry: juice hazard analysis critical control point hazards and controls guidance. Consultado del 12 de febrero de 2020. Disponible en <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-juice-hazard-analysis-critical-control-point-hazards-and-controls-guidance-first#ii>.
- Feng, H. & Yang, W. 2011. Ultrasonic processing. En Zhang, H., Barbosa, G., Balasubramaniam, V., Dunne, P., Farkas, D. & Yuan, J. (eds). Nonthermal processing technologies for Food. Wiley-Blackwell, Estados Unidos. p. 135-154.
- Ferreres, F. & Tomás, F. 2012 Flavonoids: Flavonols, flavones and flavanonas. En Nollet, L. & Toldra, F (eds). Handbook of analysis of active compounds in functional foods. Taylor & Francis, Estados Unidos. p. 289-316.
- Flood, J., & Rolls, B. 2009. The effect of fruit in different forms on energy intake and satiety at a meal. *Appetite*. 52(2): 416–422.
- Fridovich, I. 2013. Getting along with oxygen. En Tarr, M. & Samson, F. (eds). Oxygen free radicals in tissue damage. Estados Unidos, Springer. p. 1-11.
- Eitenmiller, R., Ye, L. & Landen, W. 2008. Vitamin analysis for the health and food sciences. CRC Press, Estados Unidos.
- Gamboa, F. 2015. Ponencia: análisis del dinamismo de las exportaciones de bienes de Costa Rica y su evolución durante la última década (en línea). Costa Rica. Consultado el 4 de abril del 2019. Disponible en: https://estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/021/economia/ExportsGamboaC3.pdf
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. 2007. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*. 12: 1641-1673.
- Gokturk, N. 2006. Organic acid, tocopherol, and phenolic compositions of some Turkish grape cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*. 42(2): 156-159.
- Gómez, V., Orsolani, L., Martínez, A. & Tapia, M. 2010. Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. *Food Science and technology*. 43(5): 808-813.

- Gonçalves, D., Souza, P., Baldwin, E. & Borges, T. 2018. Health benefits of orange juice and citrus flavonoids. En Xingqian, Y. (ed). *Phytochemicals in citrus: applications in functional foods*. Estados Unidos, Taylor and Francis. p. 299-319.
- Gonzalez, A., Vásquez, M., Espada, E. Jimenez, A., Ferreiro, M., Amores, A., Palma, M., Barroso, C., Barbero, G. 2018. Development of new analytical microwave assisted extraction methods of bioactive compounds from myrtle. En Gentili, A. & Fanali, C. (eds). *Advances in food analysis. Topical Collection*, Suiza. p. 337-352.
- Guerrouj, K., Sánchez, M., Taboada, A., Cava, R. & Marín, F. 2016. Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioproducts Processing*. 99: 20-28.
- Hammond, D. 2016. Analysis of soft drinks and fruit juices. En Ashurst, P. (ed). *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. Wiley Blackwell, Reino Unido. p. 231-289.
- He, Y., Li, Z., Wang, W., Sooranna, S., Shi, Y., Chen, Y., Wu, C., Zeng, J., Tang, Q. & Xie, H. 2018. Chemical profiles and simultaneous quantification of *Aurantii fructus* by use of HPLC-Q-TOF-MS combined with GC-MS and HPLC methods. *Molecules*. 23(9): 2-18.
- Hernández, Y., Lobo, M. G., González, M. 2006. Determination of vitamin C in tropical fruits: a comparative evaluation of methods. *Food Chem*. 96:654-664.
- Herrera, C., Lutz, G. & Acuña, J. 2015. *Vitaminas y minerales: un enfoque nutricional y tecnológico*. Editorial UCR, San José, Costa Rica.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch, M., Flanagan, J. & Prior, R. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J. Agric. Food Chem*. 50: 4437-4444.
- Iglesias, L., Mas, A., Bravo, F., Aragonés, G., Muguerza, B. & Arola, A. 2019. Optimization of a polyphenol extraction method for sweet orange pulp (*Citrus sinensis* L.) to identify phenolic compounds consumed from sweet oranges. *Plos one*. 14 (1).
- Jayaprakasha, G., Vikram, A. & Patil, B. 2012. Analysis methods of flavones. En Xu, Z. & Howard, L. (eds). *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. p. 275-312
- Kammerer, D., Kramer, M. & Carle, R. 2013. Phenolic compounds. En Nollet, L. & Toldra, F. (ed). *Food analysis by HPLC*. CRC Press, Estados Unidos. p. 717-756.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A. & Cabaroglu, T. 2009. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*. 91 (2): 187-192.
- Khoddami, A., Wilkes, M. & Roberts, T. 2013. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 18 (2): 2328-2375.

- Khoo, C. & Falk, M. 2014. Cranberry polyphenols: effects on cardiovascular risk factors. En Ross, R., Preedy, V. & Zibadi, S. (eds). Polyphenols in human health and disease. Elsevier, Estados Unidos. p. 1049-1061.
- Kimball, D. 2012. Citrus processing: a complete guide. Aspen Publishers, Estados Unidos.
- Kimball, D., Parish, M. & Braddock, R. 2005. Oranges and tangerines. En Barret, D., Somogyi, L. & Ramaswamy, H. (eds). Processing fruits: science and technology. Taylor & Francis, Estados Unidos. p. 617-638.
- Kochhar, S.P. & Rossell, J.B. 2012. Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems. En Hudson, B (ed). Food antioxidants. Elsevier, Estados Unidos. p. 19-64.
- Kulak, M. & Cetinkaya, H. 2018. A systematic review: polyphenol contents in stressed olive tree and its fruit oil. En Wong, J. (ed). Polyphenols. IntechOpen, Croacia. p. 3-22.
- Kundu, D., Singh, J., Das, M., Rastogi, A., & Banerjee, R. 2018. A Sustainable Process for Nutrient Enriched Fruit Juice Processing: An Enzymatic Venture. In Kuila, A. & Sharma, V. Principles and Applications of Fermentation Technology. Scrivener, Estados Unidos. p 387–400.
- Liou, S. 2011. About free radical damage. Consultado el 26 de marzo del 2020. Disponible en <https://hopes.stanford.edu/about-free-radical-damage/>
- Lu, Q., Lv, S., Peng, Y., Zhu, C. & Pan, S. 2018. Characterization of phenolics and antioxidant abilities of red navel orange “Cara Cara” harvested from five regions of China. *International Journal of Food Properties*. 21(1): 1107-1116.
- Lykkesfeldt, J. 2000. Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in biological samples by high-performance liquid chromatography using subtraction methods: reliable reduction with tris [2-carboxyethyl] phosphine hydrochloride. *Anal. Biochem.* 282:89-93.
- Macheix, J., Fleuriet, A. & Billot, J. 2018. Fruit Phenolics. Estados Unidos: CRC Press.
- Magiera, S. & Baranowska, I. 2013. UHPLC in the analyses of isoflavones and flavonoids. En Xu, Q. (ed). Ultra-high performance liquid chromatography and its applications. Wiley & Sons, Reino Unido. p. 197-233.
- Manickam, S. & Liew, Y. 2016. Ultrasonic and UV disinfection of food. En Vazarkas, T. & Tzia, C. (eds). Handbook of food processing: food preservation. CRC Press, Estados Unidos. p. 517-528.
- Martín, O., Marsellés, A., Soliva, R. & Elez, P. 2014. Emergin nonthermal thecnologies in fruit juice processing. En Falguera, V. & Ibarz, A. (eds). Juice processing: quality, safety and value-added opportunities. CRC Press, Estados Unidos. p. 217-231.
- Martinez, H., Garnica, M., Bermúdez, D., Pokhrel, P. & Barbósa, G. 2015. Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermosonicated carrot juice during storage. *Food Chem.* 172: 650-656.

- Mauri, A., Llobat, M. & Herráez, R. 2011. Laboratorio de análisis instrumental. España: Universidad de Valencia.
- McHugh, T., 2016. Putting ultrasound to use in food processing. *Food. Tech. Mag.* 70(12): 72-74.
- McLellan, M. & Padilla, O. 2004. Juice Processing. In Barrett, D., Somogyi, H. & Ramaswamy, S. (eds). *Processing Fruits: Science and Technology*. CRC Press, Florida. p. 77-94.
- Mertz, C. 2009. Micro-constituants de la mure andine et de la tomate d'arbre : caractérisation et impact du traitement thermique. Tesis de Doctorado en Biochimie, Chimie et Technologie des Aliments. Université Montpellier II Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, Francia.
- Mesquita, E. & Montero, M. 2018. Simultaneous HPLC determination of flavonoids and phenolic acids profile in Petra Rio orange Juice. *Food Research International*. 106: 54-63.
- Nadem, M., Ubaid, N., Qureshi, T., Munir, M. & Mehmood, A. Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*. 45: 1-6.
- NPCS (NIIR Project Consultancy Services). 2012. Handbook on agro-based industries. NPCS, India.
- Neves, M., Trombin, V., Lopes, F., Kalaki, R. & Milan, P. 2011. The orange juice business: a Brazilian perspective. Springer, Estados Unidos.
- Nielsen, S. 2019. Food Analysis. Springer, Estados Unidos.
- Nozal, M., Bernal, J., Gómez, L., Higes, M. & Meana, A. 2003. Determination of oxalic acid and other organic acids in honey and in some anatomical structures of bees. *Apidologie*. 34 (2003): 181-188.
- Odendaal, A. & Schauss, A. 2014. Polyphenols in chronic diseases and their mechanisms of action. En Ross, R., Preedy, V. & Zibadi, S. (eds). *Polyphenols in human health and disease*. Elsevier, Estados Unidos. p. 1049-1061.
- Okitsu, K., Nanzai, B. & Thangavadivel, K. 2016. Sonochemical degradation of aromatic compounds, surfactants and dyes in aqueous solutions. En Ashokkumar, M. (ed). *Handbook of Ultrasonics and Sonochemistry*. Springer, Singapur. p. 785-812.
- Pássaro, C. & Londoño, J. 2012. Industrialización de cítricos y valor agregado. En Pássaro, C. (ed). *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización*. Corporación Universitaria Lasallista, Colombia. p. 307-342.
- PROCOMER. 2014. Reducción en oferta global de jugo de naranja. (en línea). Costa Rica. Consultado el 4 de abril del 2019. Disponible en: https://www.centralamericadata.com/es/article/home/Reduccion_en_oferta_global_de_jugo_de_naranja
- PROCOMER. 2018. Informe de gestión 2015-2018. Consultado el 22 de agosto del 2020. Disponible en:

- <http://www.asamblea.go.cr/sd/SiteAssets/Lists/Consultas%20Biblioteca/EditForm/Anexo%2010.%20PROCOMER.pdf>
- Quiñones, M., Miguel, M. & Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr. Hosp.* 27 (1):76-89.
- Rajauria, G. & Tiwari, B. 2017. Fruit juices: an overview. En Rajauria, G. & Tiwari, B. (eds). *Fruit juices: extraction, composition, Quality and Analysis*. Elsevier, Reino Unido. p. 3-13.
- Rebeck, H. 2013. Processing of citrus juices. En Ashurst, P. (ed). *Non- carbonated fruit juices and fruit beverages*. Springer, Estados Unidos. p. 221-252.
- Renard, C. & Maingonnat, J. 2012 Thermal processing of fruits and fruit juices. En Sun, D. (ed). *Thermal food processing: new technologies and quality issues*. CRC Press, Estados Unidos. p. 413-430.
- Reyes, J., Goodrich, R., Barringer, S. & Landeros, M. 2014. Processing of Fruit and Vegetable Beverages. In Clark, S., Jung, S. & Lamsal, B (eds). *Food Processing*. Wiley and Sons, Reino Unido. p. 339–362.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Silva, A., Amorim, M., Pereira, L., Santos, T., Gomes, A., Duarte, A. & Freitas, A. 2015. Impact of enzyme and Ultrasound assisted Extraction Methods on Biological Properties of Red, Brown and Green Seaweeds from the Central Coast of Portugal. *J. Agric. Food Chem.* 65 (12): 3177-3188.
- Rojas, M., Miano, A., Augusto, P. 2017. Ultrasound processing of fruit and vegetable juices. En Bermúdez, D. (ed). *Ultrasound: advances in food processing and preservation*. Elsevier, Estados Unidos.
- Roussos, P. 2015. Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). En Simmonds, M. & Preedy, V. (eds). *Nutritional composition of fruit cultivars*. Elsevier, Estados Unidos. p. 469-496.
- Roy, M. K., Koide, M., Rao, T. P., Okubo, T., Ogasawara, Y., & Juneja, L. R. 2010. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61(2): 109–124.
- Russell, L. 2004. Water soluble vitamins. En Nollet, L. (ed). *Handbook of food analysis: physical characterization and nutrient analysis*. Marcel Dekker, Estados Unidos. p. 487-572.
- Russell, L. 2013. Water soluble vitamins. En Nollet, L. & Toldra, F. *Food analysis by HPLC*. CRC Press, Estados Unidos. p. 325-442.
- Rutledge, P. 2012. Production of non-fermented fruit products. En Arthey, D. & Ashurst, R. *Fruit Processing*. Springer, Estados Unidos. p. 70-96.
- Samukelo, L., Linus, U., Cronje, P., Landhal, S., Ortiz, J., & Terry, L. 2015. Rapid methods for extracting and quantifying phenolic compounds in citrus rinds. *Food Sci. Nutr.* 4 (1): 4-10.

- Sánchez, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. 2003. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juices. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83(5): 430–439.
- Sánchez, C., Plaza, L., Elez, P., De Ancos, B., Martín, O., & Cano, M. 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.
- Sandhu, K. & Minhas, K. 2006. Oranges and citrus juices. En Hui, Y. (ed). *Handbook of fruits and fruit processing*. Blackwell, Estados Unidos. p. 309-357.
- Sandhu, K. & Minhas, K. & Sidhu, J. 2012. Processing of citrus juices. En Sinha, N., Sidhu, J., Barta, J., Wu, J. & Cano, P. (ed). *Handbook of fruits and fruit processing*. Wiley-Blackwell, Estados Unidos. p. 389-533.
- Santana, J. & Jacobo, D. 2018 Classification of phenolic compounds. En Nollet, L. & Gutierrez, J. (ed). *Phenolic compounds in food: characterization and analysis*. CRC Press, Estados Unidos. 3-20.
- Selli, S., Kelebek, H. & Panesar, P. 2017. Citrus wines. En Kosseva, M., Joshi, V. & Panesar, P (eds). *Science and technology of fruit wine production*. Elsevier, Estados Unidos. p. 410-440.
- Shen, S. & Wu, J. 2018. Processing of vegetable juices and blends. En Hui, Y. & Sinha, N. (eds). *Handbook of vegetables and vegetable processing*. Wiley-Blackwell, Estados Unidos. p. 335-350.
- Silva, L., David, J., Borges, R., Ferreira, S., David, J., Reis, P. & Burns, R. 2014. Determination of flavanones in orange juice obtained from different sources by HPLC/DAD. *Journal of Analytical Methods of Chemistry*. 2014:1-5.
- Siracusa, L. & Ruberto, G. 2019. Orange Juice: Polyphenols from orange byproducts). In Watson, R. *Polyphenols in plants: Isolation, Purification and Extract Preparation*. Elsevier, Estados Unidos. p 3-21.
- Sun, Y., Zhong, L., Cao, L., Lin, W., & Ye, X. 2015. Sonication inhibited browning but decreased polyphenols contents and antioxidant activity of fresh apple (*malus pumila mill*, cv. *Red Fuji*) juice. *J. Food. Sci. Tech*. 52(12): 8336-8342.
- Takebayashi, J., Oki, T., Watanabe, J., Yamasaki, K., Chen, J., Sato, M., Tsubota, M., Taku, K., Goto, K., Matsumoto, T. & Ishimi, Y. 2013. Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods. *J. of Food Comp. and An*. 29: 25-31
- Taylor, B. 2016. Fruit and juice processing. En Ashurst, P. (ed). *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. Wiley Blackwell, Reino Unido. p. 31-64.
- Talon, M., Wu, G., Gmitter, F. & Rokhsar, D. 2019. The origin of citrus. En Talon, M., Caruso, M. & Gmitter, F. (eds). *The Genus Citrus*. Elsevier, Reino Unido. p. 9-28.

- Tastan, O. & Baysal, T. 2018. Adulteration analysis of pomegranate juice. En Shrivastava, A. (ed). *Frontiers in drug safety: Adulteration analysis of some foods and drugs*. Bentham eBooks, Emiratos Arabes Unidos. p. 91-99.
- Tighe, R., Alberdi, M., Arce, P., Romero, J., Reyes, M. & Inostroza, C. 2017. Foods with functional properties and their potential uses in human health. En Waisundara, V. & Shiomi, N (eds). *Superfood and functional food: an overview of their processing and utilization*. InTech, Croacia. p. 185-220.
- Tiwari, B., Muthukumarappan, K., O' Donnell, C., Cullen, P. 2009a. Effect of sonication on orange juice quality parameter during storage. *Intl. J. Food Sc. and Tech.* 44: 586-595.
- Tiwari, B., Muthukumarappan, K., O' Donnell, C., Cullen, P. 2009b. Ascorbic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurized juice. *LWT-Food Science and Technology.* 42(3): 700-704.
- Tiwari, B., O'Donnell, C., Patras, A., & Cullen, P. 2008. Anthocyanin and ascorbic acid degradation in sonicated strawberry juice. *J. of Agr. and Food Chem.* 56: 10071-1007.
- Toledo, R. 2012. *Fundamentals of food process engineering*. Springer, Estados Unidos.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2010. Database for the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) of selected foods. Consultado el 16 de junio de 2020. Disponible en http://www.orac-info-portal.de/download/ORAC_R2.pdf
- USDA (United States Department of Agriculture). 2018. Costa Rica. *Citrus Annual. Orange Juice Production and Trade*. Consultado del 2 de marzo de 2020. Disponible en https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Citrus%20Annual_San%20Jose_Costa%20Rica_12-17-2018.pdf.
- USDA (United States Department of Agriculture). 2020. *Citrus: World market and trade*. Consultado del 2 de marzo de 2020. Disponible en <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>
- 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.
- Varnam, A. & Sutherland, J. 2012. *Beverages: technology, chemistry and microbiology*. Springer, Reino Unido.
- Velázquez, R., Chávez, J., Hernández, J. & Roig, A. 2016. Orange Juice. In Shahidi, F. & Alasalvar, C. (eds). *Handbook of Functional Beverages and Human Health*. CRC Press, Florida. p. 423-438.
- Vicente, A., Manganaris, G., Cisneros, L. & Crisosto, C. 2011. Prunus. En Terry, L. (ed). *Health promoting properties of fruits and vegetables*. CAB, Estados Unidos. p. 238-259.

- Wahia, H., Zhou, C., Mustapha, A., Amanor, R., Mo, L., Abiola, O. & Ma, H. 2020. Storage effect on the quality quartet of orange juice submitted to moderate thermosonication: predictive modeling and odor fingerprint approach.
- Wechtersbach, L., Cigić, B. 2007. Reduction of dehydroascorbic acid at low pH. J. Biochem. Biophys. Methods 70:767-772.
- Wong, E. 2010. Combinación de sonicación y almacenamiento en alta presión osmótica: una alternativa de procesamiento para obtener jugos de frutas inocuos de calidad. Tesis de Dr en Ciencias. Universidad de Costa Rica, Programa de Doctorado en Ciencias. San José.
- Wong, E. Vaillant, F. Pérez, A.M. 2010. Osmosonication of blackberry juice: impact on selected pathogens, spoilage microorganisms, and main quality parameters. Journal of Food Science. 75(7): 468-474.
- Wood, L. 2019. World concentrate orange juice market report 2019: Analysis, forecast, size, trends and insights. Consultado el 2 de marzo de 2020. Disponible en <https://www.businesswire.com/news/home/20191015005963/en/World-Concentrated-Orange-Juice-Market-Report-2019>.
- Woodroof, J. 2012. Fruit washing, peeling and preparation for processing. En Woodroof, J. (ed). Commercial fruit processing. Avi Publishing Company, Estados Unidos. p. 99-120.
- Wu, X., Beecher, G., Holden, J. M., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. 2004. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. J. of Agr. and Food Chem. 52(12): 4026–4037.
- Xu, Z. 2012. Analysis methods of phenolic compounds. En Xu, Z. & Howard, L. (eds). Analysis of antioxidant- rich phytochemicals. Wiley & Sons, Reino Unido. p. 69-104.
- Yuan, Y. & Baduge, S. 2018. The contribution of Phytochemicals to the Antioxidant Potential of Fruit Juices. In Rajauria, G. & Tiwari, B. (eds). Fruit Juices: Extration, Composition, Quality and Analysis. Academic Press, Estados Unidos. p. 95-128.
- Zafra, Q., Cruz, N., Ramírez, E., Delgado, L., Villanueva, J. & Alanís, E. 2013. Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. Ultrasonics sonochemistry. 20(5): 1283-1288.
- Zhang, Q., Qiu, X. & Sharma, S. 2002 Improving safety and quality of orange juice by pulse electric field processing. En Harrison, X. & Tang, J. Advances in bioprocessing engineering. World Scientific, Reino Unido. p. 45-68.

9. Anexos

Anexo I. Certificado de análisis del estándar de naringenina

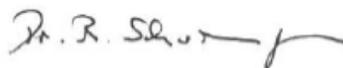
SIGMA-ALDRICH

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103 USA
Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com

Certificate of Analysis

Product Name: (±)-NARINGENIN
analytical standard
Product Number: 52186
Batch Number: BCBX5116
Brand: Sigma-Aldrich
CAS Number: 67604-48-2
Formula: C₁₅H₁₂O₅
Formula Weight: 272.25
Storage Temperature: 2-8 C
Expiration Date: JUN 2020
Quality Release Date: 03 JUL 2018

TEST	SPECIFICATION	RESULT
APPEARANCE (COLOR)	WHITE TO BEIGE	LIGHT BEIGE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (TLC AREA %)	≥ 95 %	97 %
INFRARED SPECTRUM	CONFORMS TO STRUCTURE	CONFORMS TO STRUCTURE



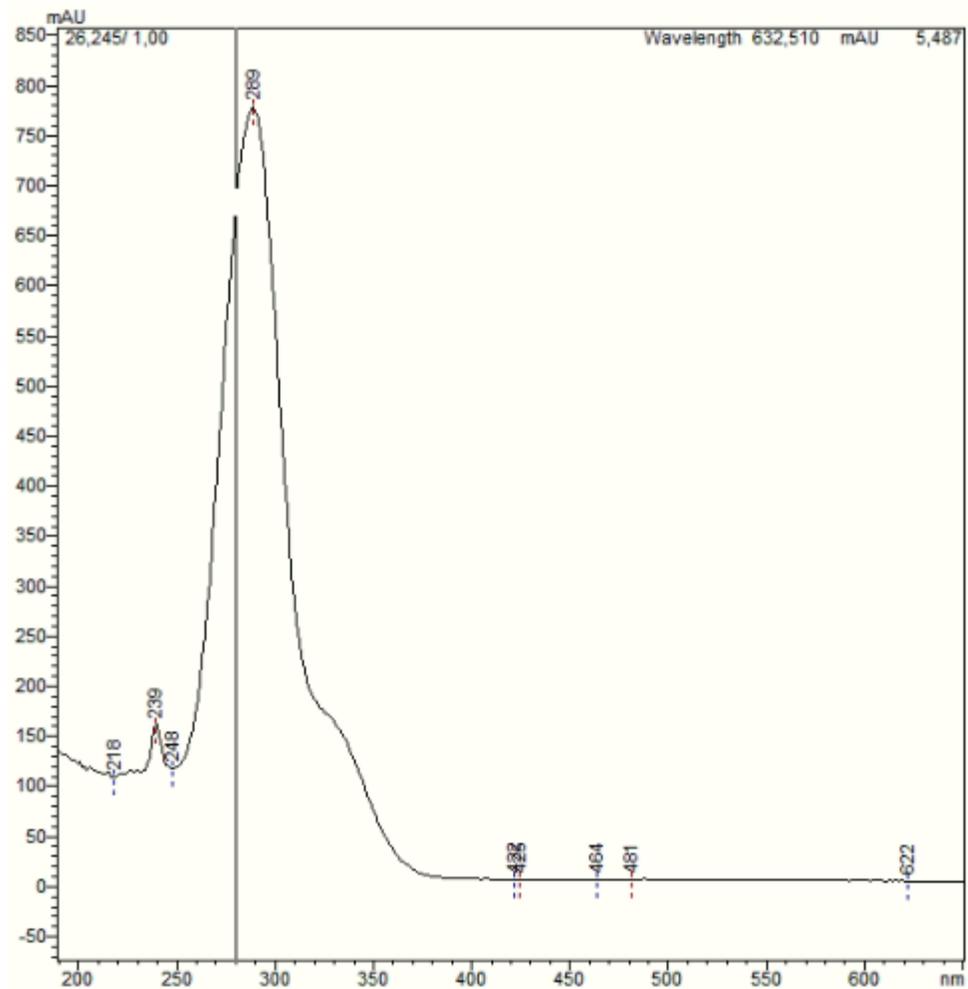
Dr. Reinhold Schwenninger
Quality Assurance
Buchs, Switzerland

Anexo II. Características iniciales del jugo de naranja

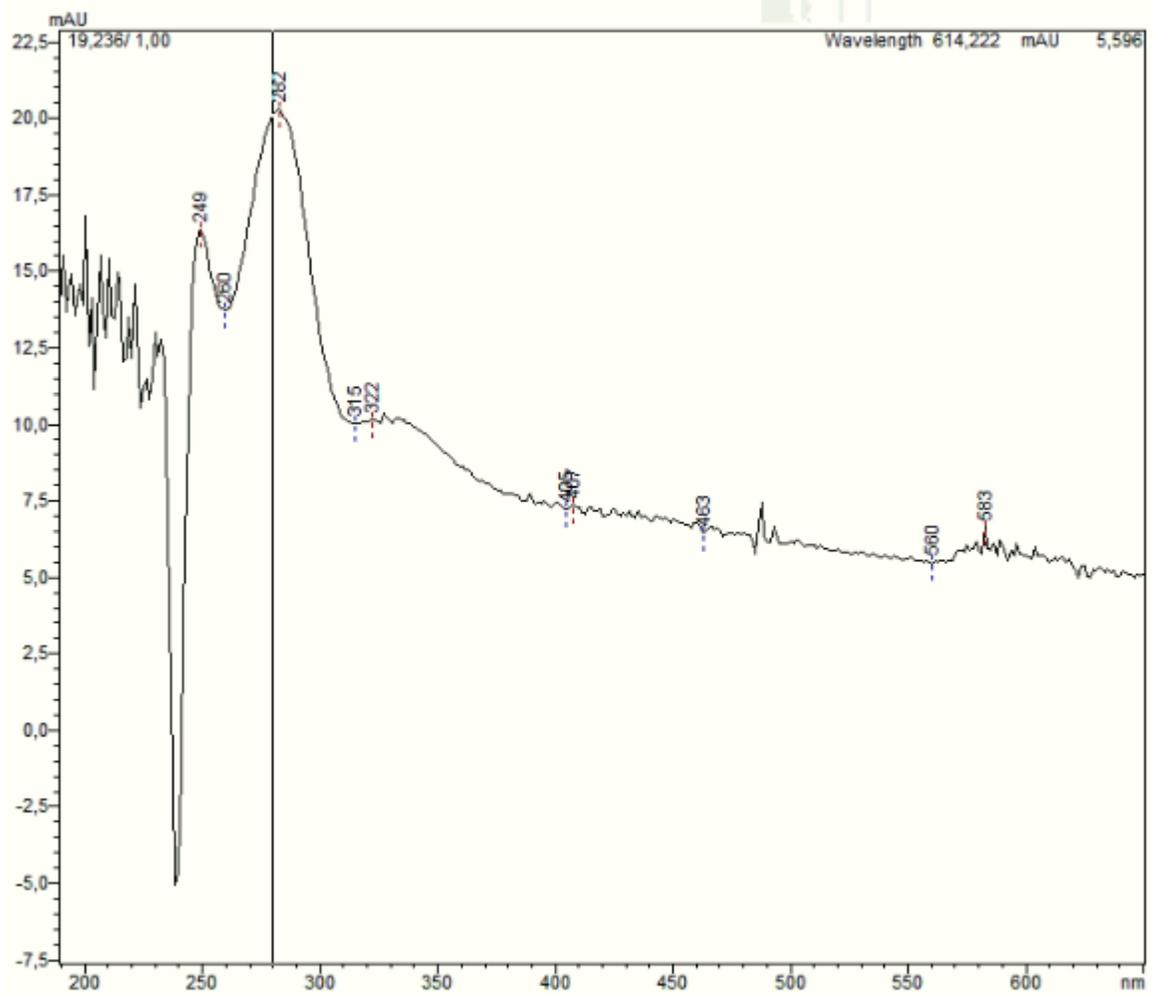
Cuadro III. Características químicas de cada lote de jugo de naranja antes de aplicar ultrasonido (n=3).

Lote	°Brix	Humedad (g/100 g)	Acidez total (g/100 g, expresado como ácido cítrico)	pH
1	9,34 ±0,25	91 ±13	0,787 ±0,050	3,62 ±0,07
2	9,12 ±0,25	91 ±13	0,826 ±0,053	3,60 ±0,07
3	9,65 ±0,25	90 ±13	1,086 ±0,053	3,38 ±0,07

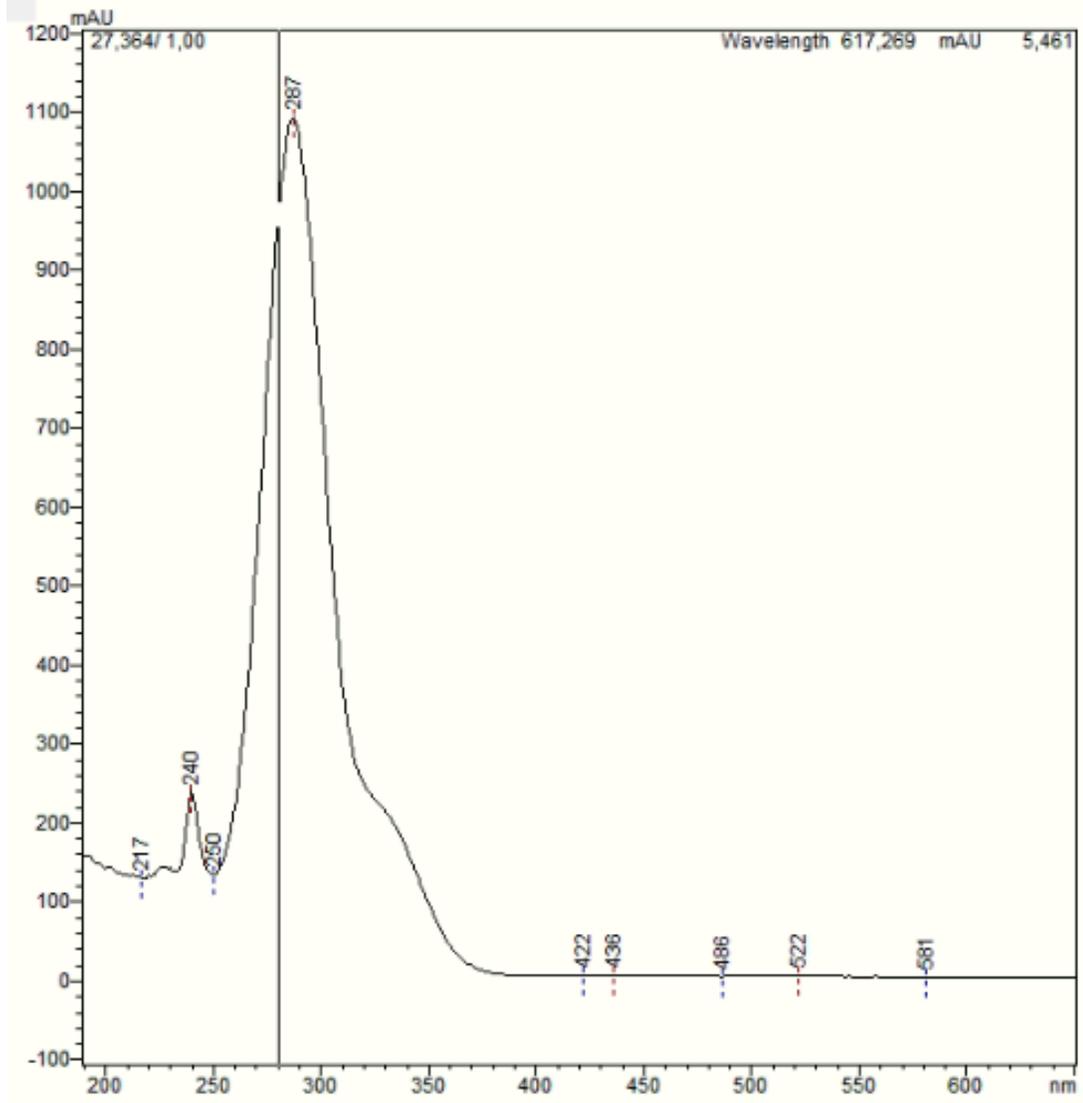
Anexo III. Espectro de absorción de la señal 2 del patrón de naringenina a 100 ppm



Anexo IV. Espectro de absorción de la señal 1 del patrón de naringenina a 100 ppm



Anexo V. Espectro de absorción del patrón de hesperetina a 100 ppm



Anexo VI. Espectro de absorción del extracto de polifenoles de jugo de naranja

