



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Aprovechamiento tecnológico mediante minimización de
residuos en la industria cítrica

D. José Antonio Macario Legaz

2022

Agradecimientos:

Al Grupo de Investigación "*Análisis y Simulación de Procesos Químicos, Bioquímicos y de Membrana*", por brindarme la oportunidad de participar en el proyecto de investigación en el que se enmarca la presente Tesis Doctoral. Por facilitar el desarrollo y contribuir a la finalización de la misma.

A mi tutora y directora Dra. Dña. Asunción María Hidalgo Montesinos por su trato amable y cercano. Por su dedicación, ilusión y motivación que hace que las personas a su alrededor brillen con más fuerza. Por confiar en mí y darme libertad investigadora. Por todo.

Especialmente a Sandra, por estar siempre ahí cuando se le necesita, por su apoyo fiel e incondicional en todo momento. Por los miles de aventuras y desafíos que hemos superado juntos. Gracias.

A mis padres, por ser mi ejemplo a seguir. Por creer siempre en mi trabajo y darme las fuerzas para seguir adelante. Por enseñarme a que los sueños se pueden cumplir.

“Esta tesis doctoral está sometida a procesos de protección o transferencia de tecnología o de conocimiento, por lo que los siguientes contenidos están inhibidos en la publicación en los repositorios.

Autorizado por la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia con fecha de 20 de enero de 2022”

ÍNDICE



Índice

1. Introducción y objetivos	1
2. Antecedentes	7
2.1. Los cítricos	9
2.1.1. El origen de los cítricos.....	9
2.1.2. Importancia del sector	11
2.2. Clasificación, composición y propiedades bioactivas de los cítricos	14
2.2.1. Caracterización botánica y agronómica de los cítricos	14
2.2.2. Descripción física de los cítricos.....	15
2.2.3. Composición química y propiedades bioactivas	16
2.2.3.1. Azúcares.....	16
2.2.3.2. Ácidos orgánicos.....	17
2.2.3.3. Compuestos fenólicos.....	18
2.2.3.4. Otros compuestos presentes en los cítricos.....	19
2.2.3.5. Propiedades bioactivas.....	21
2.3. Productos y subproductos en el procesado de cítricos	22

2.3.1. Productos primarios	23
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
2.3.2. Productos secundarios	23
2.4. Clarificación de subproductos	26
2.4.1. Clarificación mediante tratamiento enzimático	26
2.4.2. Tecnología de filtración mediante membranas	29
2.4.3. Desarrollo de procesos biosostenibles en la obtención de nuevos productos funcionales	37
2.5. Estudios de vida útil en zumos y concentrados	43
2.5.1. Estudios de vida útil en zumos clarificados.....	44
2.5.2. Valoración organoléptica en estudios de vida útil de zumos y concentrados.....	46
2.6. Propiedades bioactivas de los extractos y su papel en la prevención de la obesidad.....	48
3. Materiales y métodos	57
3.1. Materiales y reactivos	59
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
3.1.1. Membranas	59
Contenido totalmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
3.1.2. Reactivos	59
3.1.3. Otros materiales.....	61
3.2. Equipos.....	61
3.2.1. Planta piloto de filtración tangencial	61
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	

3.2.2. Módulo de membranas <i>Triple System Model F1</i>	63
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
3.2.3. Planta de nanofiltración	65
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
3.2.4. Otros equipos	65
3.3. Métodos	66
3.3.1. Métodos analíticos	66
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
3.3.2. Métodos de cálculo	77
4. Resultados y discusión	79
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
4.1. Clarificación mediante ultrafiltración	82
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
4.2. Optimización de la corriente de permeado clarificada	86
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
4.2.1. Determinación de la permeabilidad de las membranas utilizadas mediante ensayos con agua destilada	88
4.2.2. Caracterización de las corrientes de permeado y rechazo	90
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
4.2.3. Estudio del ensuciamiento (<i>fouling</i>) de la membrana GR60PP	93
4.3. Proceso de separación de azúcares	97

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
4.4. Estudios de vida útil de los productos clarificados obtenidos	100
4.4.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos	102
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
4.4.2. Evolución de las cualidades organolépticas	110
4.5. Utilización de los extractos con propiedades bioactivas en el desarrollo de bebidas y preparados alimentarios.....	116
4.5.1. Evolución del interés por la influencia de las propiedades bioactivas en zumos	116
4.5.2. Procedimiento para la aprobación de los ensayos por el Comité de Bioseguridad en Experimentación	118
4.5.3. Desarrollo de los ensayos.....	120
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
5. Conclusiones.....	127
Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022	
6. Bibliografía	135
7. Nomenclatura.....	157
8. Anexos.....	163

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



1. Introducción y objetivos

En la Región de Murcia existen numerosas industrias dedicadas a la actividad del procesado de frutas y vegetales tanto en productos destinados en fresco como en zumos, purés, conservas, mermeladas, etc. El sector agroalimentario es un importante motor económico en todo el sureste español y dentro del mismo los cítricos juegan un papel esencial.

Como consecuencia de esta actividad, en el procesado de frutas y vegetales se generan diferentes tipos de fracciones de las cuales, algunas de ellas hasta la fecha no son valorizables o reutilizables. Esto supone un problema medioambiental, que va en contra del camino marcado hacia el “*zero waste*” y del aprovechamiento de todas las corrientes disponibles. Por lo que existe un interés y una preocupación creciente por lograr un mejor aprovechamiento, así como de los productos y subproductos que contienen, con el fin de obtener un mayor rendimiento de los recursos disponibles y, además de, minimizar los gastos que suponen la gestión de estos residuos.

A través de la utilización de las tecnologías emergentes, o procesos tecnológicos se ha intentado buscar una explotación nutricional para estos subproductos, dado que

poseen compuestos de alto valor añadido, como aceites esenciales, agentes antioxidantes donde encontramos más de treinta polifenoles (Abad-García et al., 2014) rentabilizando así su valor económico. Además, los flavonoides presentes en los cítricos tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antivirales, antimutagénicas y anticarcinogénicas.

En la actualidad, uno de los principales objetivos es la búsqueda de soluciones tecnológicas encaminadas a realizar un máximo aprovechamiento de las diferentes fracciones que se generan en el procesado de la fruta y de los compuestos vegetales. Estas fracciones presentan un potencial biotecnológico importante ya que una vez caracterizadas e identificadas, pueden ser el punto de partida para la formulación y preparación de nuevos productos.

Para conseguir este objetivo, es importante el uso de metodologías que permitan la identificación de cada una de las diferentes fracciones que son susceptibles de ser valorizadas como son los extractos concentrados clarificados del zumo de fruta. Estos extractos poseen un alto o un bajo contenido en azúcares y extractos ricos en agentes antioxidantes, donde los procesos convencionales de clarificación, tienen por objeto eliminar los sólidos insolubles y destruir las sustancias pécticas degradando la pectina y el almidón con enzimas específicas, floculando la nubosidad con agentes clarificantes (bentonita, gelatina y / o silicasol) (Grampp, 1977), siendo las pectinas las principales causantes de la turbidez presente (Dey y Banerjee, 2014). Con la filtración mediante membranas se asegura un permeado de excelente calidad con un aumento de la claridad y por consiguiente una notable eliminación del color (Jegatheesan et al., 2012).

Una vez identificadas y caracterizadas tanto de forma fisicoquímica, como de forma microbiológica las diferentes corrientes, es necesario evaluar la estabilidad de los productos obtenidos y para ello se deben realizar ensayos o estudios de la vida útil de los productos, con el fin de asegurar la calidad e inocuidad. Durante este proceso se determinará la posibilidad de comercializar de forma directa estos nuevos productos, o su aplicación en diferentes desarrollos (zumos, *smoothies*, *compound* de frutas, bebidas refrescantes, etc.).

Además, debido a los problemas relacionados con la obesidad, en estos últimos años se están desarrollando estudios que buscan reducir el consumo de azúcares refinados y desde el Gobierno de España, se grava con impuestos las bebidas que los contienen. Por lo que encontrar soluciones naturales cobra un gran interés en la

industria de refrescos y bebidas. La OMS recomienda un máximo de 22 gramos de azúcar para un niño de 7 años al día, por lo que evitar el consumo de estas bebidas debe reducirse.

Como solución a estas bebidas con azúcar añadido y consideradas problemáticas, se está prestando especial atención a las propiedades bioactivas de los ingredientes que son subproductos en diferentes industrias. Siendo las empresas dedicadas al sector de zumos y bebidas las que más ventaja pueden sacar en este sentido, debido al aporte de fibra y de antioxidantes presentes en las frutas y verduras.

Por todo ello, el trabajo que se ha desarrollado dentro de la Tesis Doctoral queda perfectamente justificado, al contemplar el desarrollo de nuevos procesos tecnológicos que puedan dar solución a las diferentes fracciones residuales que contienen (pulpa, azúcares, agentes antioxidantes y aceites vegetales, entre otros), valorizando dichos compuestos al darle una salida en nuevas formulaciones y preparados, ya que si no fuera así tendrían que ser eliminados como un residuo.

La valorización de las diferentes fracciones no sólo repercute en mejorar la rentabilidad de las industrias procesadoras de frutas y vegetales, sino que, además, este tipo de acciones basadas en el aprovechamiento íntegro de las frutas y vegetales ayuda a reducir la contaminación ambiental, mediante la minimización de los diferentes residuos.

Esta acción pretende proporcionar una visión más amplia sobre las posibilidades tecnológicas para el aprovechamiento de estos residuos y su posible transformación en productos de alto valor añadido.

El objetivo global es el desarrollo de nuevos procesos tecnológicos que puedan dar solución al aprovechamiento de estos residuos y la valorización de los subproductos. La consecución del objetivo global implica, por tanto, alcanzar los siguientes objetivos parciales:

- ✚ Caracterizar las diferentes corrientes residuales generadas en la industria, con posibilidad de aprovechamiento
- ✚ Realizar una búsqueda bibliográfica sobre posibilidades y alternativas desde la perspectiva ambiental como la sanitaria en la posibilidad de reutilizar estos residuos

- ✚ Desarrollar nuevos procesos tecnológicos con membranas para llevar a cabo el aprovechamiento de estos productos
- ✚ Identificar de forma fisicoquímica y microbiológica cada una de las fracciones susceptibles de ser valorizadas
- ✚ Analizar la posibilidad de separar los azúcares mayoritarios presentes en los cítricos para obtener azúcares de origen natural
- ✚ Estudiar los nuevos procesos desarrollados desde la perspectiva de su viabilidad técnica y económica mediante la realización de estudios de vida útil
- ✚ Elaborar un estudio in vivo doble ciego para determinar la existencia de propiedades bioactivas en los nuevos productos desarrollados
- ✚ Realizar el seguimiento en la implantación y desarrollo de estos productos y procesos.

Para la consecución de estos objetivos se actualizará la bibliografía disponible en el equipo de trabajo de investigación en relación con las diferentes alternativas de valorización de estos residuos. A partir de este estudio, se llevarán a cabo la realización de ensayos tanto en laboratorio, como en planta piloto, con el objetivo de obtener un subproducto a partir del procesado del zumo de frutas. Se realizará los diferentes ensayos fisicoquímicos y microbiológicos del producto. Se llevará a cabo estudios de vida útil. Se optimizará dicho proceso y se estudiará su posible aplicación a diferentes tipos de productos como zumos, *smoothies* y bebidas de zumo de frutas.

Como elemento diferenciador, se llevará a cabo la obtención de extractos concentrados clarificados con contenido reducido de azúcares, y por tanto bajo contenido calórico, mediante procesos de nanofiltración. Además, mediante este tipo de separación de extractos azucarados se estudiará la obtención de extractos ricos en azúcares de fruta. Para todos estos procesos se realizará la caracterización fisicoquímica y ensayos microbiológicos del producto. Además, se llevará a cabo estudios de vida útil. Se optimizará dicho proceso y se estudiará su posible aplicación a diferentes tipos de productos como zumos, refrescos, bebidas de zumo de frutas, entre otro

2. ANTECEDENTES



2. Antecedentes

Una vez establecidos los objetivos, es necesario ahondar en la base científica y tecnológica, revisando para ello, la literatura especializada. En el presente capítulo, se centra en dar una visión global de los cítricos desde una perspectiva científica e industrial. Por otro lado, se exponen las diferentes tecnologías de clarificación aplicables a zumos y concentrados. Finalmente, se pone de manifiesto la presencia de propiedades bioactivas presentes en las diferentes corrientes y como realizar estudios de vida útil para determinar el tiempo que un producto conserva sus propiedades microbiológicas y organolépticas en unos niveles de máxima seguridad.

2.1. Los cítricos

2.1.1. El origen de los cítricos

El origen de los cítricos procede del sureste asiático, más en concreto, en la zona que abarca la vertiente meridional del Himalaya hasta China meridional, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia (Maroto, 1998). Los primeros datos que se conocen datan del 4000 a.C. que corresponde con *Citrus Medica L.* En el siglo XXIII a.C. el emperador Ta-Yu incluyó la entrega de dos cítricos entre sus impuestos, dado el alto valor que se atribuía a estas especies (González-Sicilia, 1968).

En la figura 2.1 se puede observar en naranja las áreas de origen conocidas para diferentes especies comerciales de cítricos (Zaragoza et al., 2011). La historia de la expansión de los cítricos está relacionada con la apertura de rutas comerciales y con las conquistas de las diferentes civilizaciones (Jiménez y Zamora, 2010).

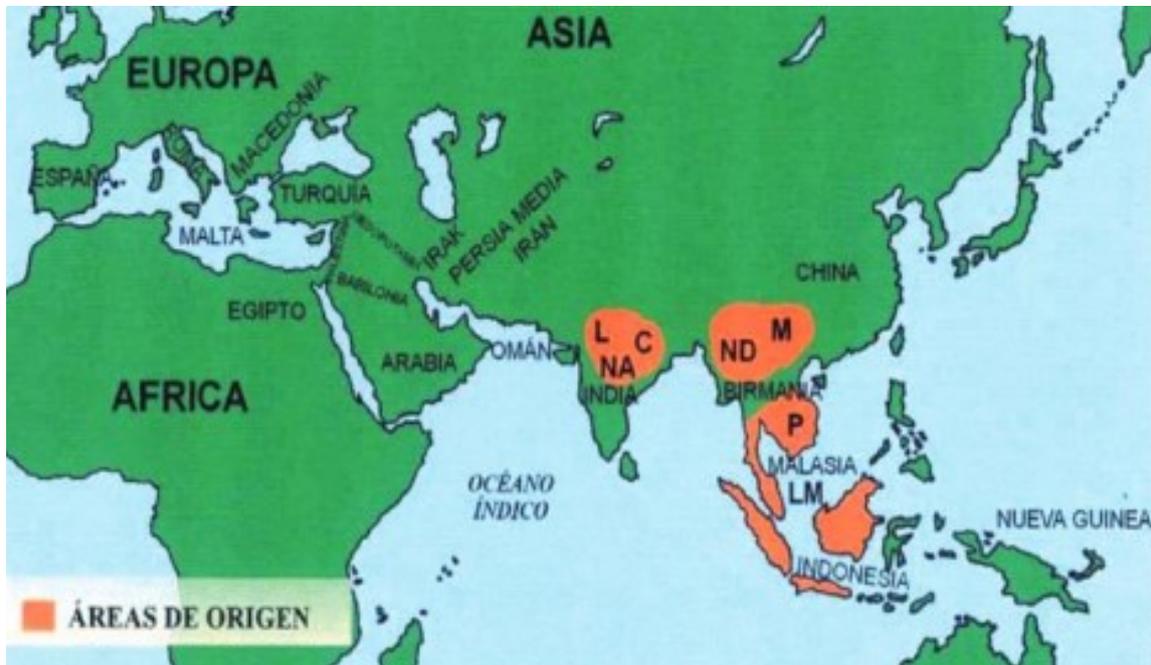


Figura 2.1. Mapa en el que se representan las diferentes áreas donde se originaron las principales especies comerciales de cítricos. C: cidro, L: limonero, LM: limero, M: mandarino, NA: naranja amarga, ND: naranja dulce, P: pomelo.

En los comienzos de la ruta de la seda, hacia el 310 a.C, se introdujo en Europa los frutos y flores de los cítricos por su especial aroma y sabor. A partir de este momento, se extendió a lo largo y ancho del planeta (Rodríguez, 2008).

Los cítricos tienen una larga historia en España, los primeros fueron introducidos al final del Imperio Romano en la península a principios del siglo V procedente de la península itálica donde eran bien conocidos. Al principio se utilizaban con fines medicinales y ornamentales. Más tarde, entre los siglos XI y XII los árabes introdujeron el naranja amargo y el limonero, a través de África procedente de Arabia (Agustí, 2003) con fin culinario. No fue hasta la aparición de la naranja dulce en el final del siglo XV cuando se empezó a comer en fresco, traída por comerciantes italianos y portugueses, y ya al final del siglo XVIII se desarrollaron las plantaciones comerciales y las exportaciones (Abad, 1984).

El cultivo de mandarino (*Citrus reticulata*) se inició a mediados del siglo XIX en Castellón procedente de Palermo y Génova. Finalmente, a principios del Siglo XX llegó una variedad de pomelo llamada “*Marsh*” que se importó desde los Estados Unidos (Zaragoza, 1993).

En la primera mitad de siglo XX aumentaron las exportaciones de frutas en fresco al norte de Europa, especialmente a Reino Unido. Este aumento hizo que se desarrollaran las superficies de regadío y que aumentasen los precios. A nivel industrial, favoreció la creación de negocios alrededor de la exportación: intermediarios, productos fitosanitarios, maquinaria agrícola especializada (Rosauero, 2016). En la actualidad existen infinidad de cítricos, como son la bergamota, yuzu, mano de buda, kumquat, naranja roja, etc.

2.1.2. Importancia del sector

La industria agroalimentaria es uno de los sectores más importantes en España. Representa en torno al 5.8 % del producto interior bruto (PIB) o un 11% si se incluye al resto de la cadena de alimentación, dando trabajo a más de 2.5 millones de personas. Además, es de los que mejor se comportan cuando hay crisis económica o pandémica como las sufridas en 1929, 2009 o la actual debida al SARS-CoV-2.

Dentro del sector agroalimentario, los cítricos son los árboles frutales más importantes del mundo, con una producción anual superior a 102 millones de toneladas. Se cultivan en más de cien países y en diferentes zonas climáticas desde la zona templada, subtropical, tropical y ecuatorial. En una superficie que ronda las 7.5 millones de hectáreas.

Los principales países productores a nivel mundial son Brasil, China, Estados Unidos y México con cerca de 35 millones de toneladas producidas (FAO, 2012), mientras que España se encuentra en quinto lugar y es el principal productor en la Unión Europea (Daifresh, 2017) gracias a la calidad, diversificación varietal y una situación geográfica estratégica (Álvarez, 2017). No todos los países productores dedican sus producciones al mismo fin, mientras que países como España apuesta por la exportación en fresco, con unos elevados estándares de calidad, debido principalmente al mejor precio del producto y situándose como el principal exportador de cítricos del mundo (IVIA, 2015), Brasil utiliza su producción mayoritariamente para industria de zumos y

concentrados, mientras que Estados Unidos combina la producción industrial con el consumo interno en fresco.

En España, el cultivo de cítricos se centraliza en toda la cuenca mediterránea, encontrándose el 60% en la Comunidad Valenciana, seguida de Andalucía con un 24% y Murcia con el 13% (Navarro, 2013). Es una fuente de riqueza para los habitantes de las comarcas o regiones que los explotan comercialmente. A partir de la creación de la Estación Naranjera de Levante que hoy se conoce como el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), comenzó a estudiarse los cítricos, profundizando en la mejora del cultivo. El desarrollo de la citricultura en las últimas décadas, tanto la exportación como la producción en España viene dado por el ingreso en la Unión Europea y el mercado común. Se estima un aumento del consumo a medio-largo plazo de entre 700 y 800 mil toneladas (García, 2017).

En la figura 2.2, se muestra la distribución de la plantación de cítricos para el año 2018 en España, donde la superficie cultivada supera las 330.000 hectáreas. Destaca las plantaciones de naranjo dulce y mandarina frente al resto con un 47 y 37%, respectivamente, aunque la tendencia en las nuevas plantaciones es la disminución de la naranja frente a la mandarina (García, 2015).

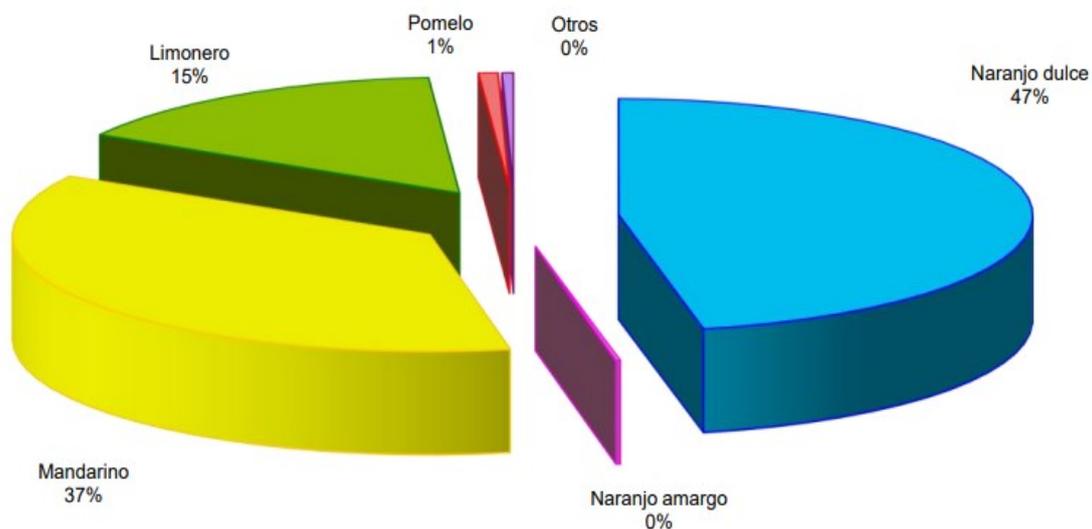


Figura 2.2. Distribución de la plantación de cítricos en España para el año 2018 (Fuente: MAGRAMA).

La razón por la que se encuentra la naranja como principal cítrico cultivado es debido a la gran cantidad de variedades que existen durante casi todo el año; aunque

aproximadamente el 60% de la producción se recolecta entre los meses de diciembre a abril (Murcia, 2010).

Como se ha comentado anteriormente, España tiene un gran potencial como exportador en fresco, donde más del 50% se destina a tal fin, esto es debido principalmente a dos factores, el primero de ellos, es la envidiable tecnificación del sector logístico en el sureste español que hace posible el envío de los cítricos producidos a cualquier parte de Europa en unos pocos días y segundo, las cualidades que poseen los cítricos para la conservación, logrando así superar el transporte a cualquier parte del planeta (Nieto et al., 2021). El consumo doméstico supone en torno al 20% y para la industria se dedica aproximadamente otro 20% y el 10% restante son las pérdidas ocasionadas por condiciones meteorológicas o por los bajos precios del mercado.

En la tabla 2.1 se muestra la superficie plantada y la producción del limón en las principales comunidades autónomas productoras. Cabe destacar a la Región de Murcia como máximo exponente del limón español llegando casi a las 26 mil hectáreas plantadas y superando las 664 mil toneladas producidas.

Tabla 2.1. Superficie (hectáreas) y producción (toneladas) de limoneros por comunidades para el año 2018 (Fuente: MAGRAMA).

Comunidades Autónomas	Superficie (hectáreas)	Producción (toneladas)
Galicia	182	6859
Cantabria	8	68
País Vasco	1	11
Cataluña	28	129
Baleares	185	2161
C. Valenciana	12773	329020
R. de Murcia	25965	664157
Andalucía	6434	121739
Canarias	256	3200
España	45832	1127509

El cultivo del limonero es fuente de riqueza en la Región de Murcia, es sinónimo de calidad y fuente de salud. La importancia socioeconómica justifica cualquier estudio o publicación que aborde diferentes aspectos del mismo.

2.2. Clasificación, composición y propiedades bioactivas de los cítricos

2.2.1. Caracterización botánica y agronómica de los cítricos

La caracterización taxonómica puede llegar a ser una tarea difícil en algunas ocasiones, debido principalmente a la acción del hombre, que ha ido produciendo hibridaciones alejando de la morfología original la especie en cuestión, dando lugar a la creación de nuevas especies que no existían en el medio natural (Laguna, 1997; Laguna, 1998) o incluso a la extinción de algunas variedades. Existen una variedad de tratados o revisiones como las de Heywood y Zohary (1995), Phillips y Rix (1993) y Vaughan y Geissler (1997).

Los cítricos pertenecen al orden *Geraniales*, familia *Rutáceas*, que contiene más de 1500 especies de plantas que crecen en climas templados y cálidos. Dentro de la familia de las *Rutáceas*, los cítricos son las plantas más conocidas, que se enmarcan en el género *Citrus* (Weiss, 1997) aunque comúnmente también se denominan con el género *citrus* a especies de los géneros *Fortunella* y *Poncirus*, a estos tres géneros conjuntamente se les conoce como agrios (Zaragoza et al., 2011).

Tomando como base la lista de 141 especies de cítricos clasificada por Ortiz (1985), los cítricos más comunes cultivados en el sureste español son:

- ✚ *Citrus sinensis* (L.) Osbeck → Naranja (dulce)
- ✚ *Citrus aurantium* L. → Naranja (amarga)
- ✚ *Citrus limon* (L.) Burm. Fil → Limonero
- ✚ *Citrus paradisi* → Pomelo
- ✚ *Citrus reticulata* → Mandarino
- ✚ *Citrus aurantifolia* → Limero

2.2.2. Descripción física de los cítricos

Los cítricos se identifican por ser árboles de hoja perenne y una altura que podría llegar a superar los diez metros. Las características más destacadas entre los cítricos son (Peñaflares, 2017):

- ✚ Cuentan con espinas como medio de autoprotección, más numerosas en limoneros
- ✚ La flor de azahar es la flor de los cítricos. Tiene un aroma muy reconocido y su color es blanco
- ✚ Fruto en forma de baya modificada denominado hesperidio
- ✚ Hojas lanceoladas, difieren en anchura, forma y tamaño. Es fácil distinguir cual es la especie que se está observando
- ✚ Los frutos pueden presentar mayor o menor cantidad de semillas, incluso ausencia de éstas

El fruto de los cítricos es muy usado en nuestra dieta mediterránea se llama hesperidio, y consta de tres partes principales:

- ✚ Epicarpo, también conocido como flavedo, es la parte más externa y comúnmente se denomina corteza, aunque esta nomenclatura no es del todo correcta. El epicarpo está formado por células epidérmicas de color verde cuando el fruto es inmaduro y amarillo, naranja, rosáceo o verde, según la especie, en la madurez
- ✚ Mesocarpo o albedo, se encuentra debajo del epicarpo y antes del endocarpo, es un tejido blanco esponjoso de células parenquimáticas
- ✚ Endocarpo, es la región más interna y está constituido por los lóculos o gajos. Los lóculos contienen las vesículas de zumo

La corteza se constituye por el epicarpo y el mesocarpo (flavedo y albedo). Dentro del endocarpo se encuentran las semillas, aunque puede ocurrir que el fruto no contenga semillas, algo cada vez más demandado entre los consumidores.

En la figura 2.3, se muestra un ejemplo de las diferentes partes de un limón, desde una visión externa del fruto, dos secciones (longitudinal y transversal) donde se

puede observar los carpelos, placenta y tricomas. Por último, se detalla el interior y exterior de una semilla.

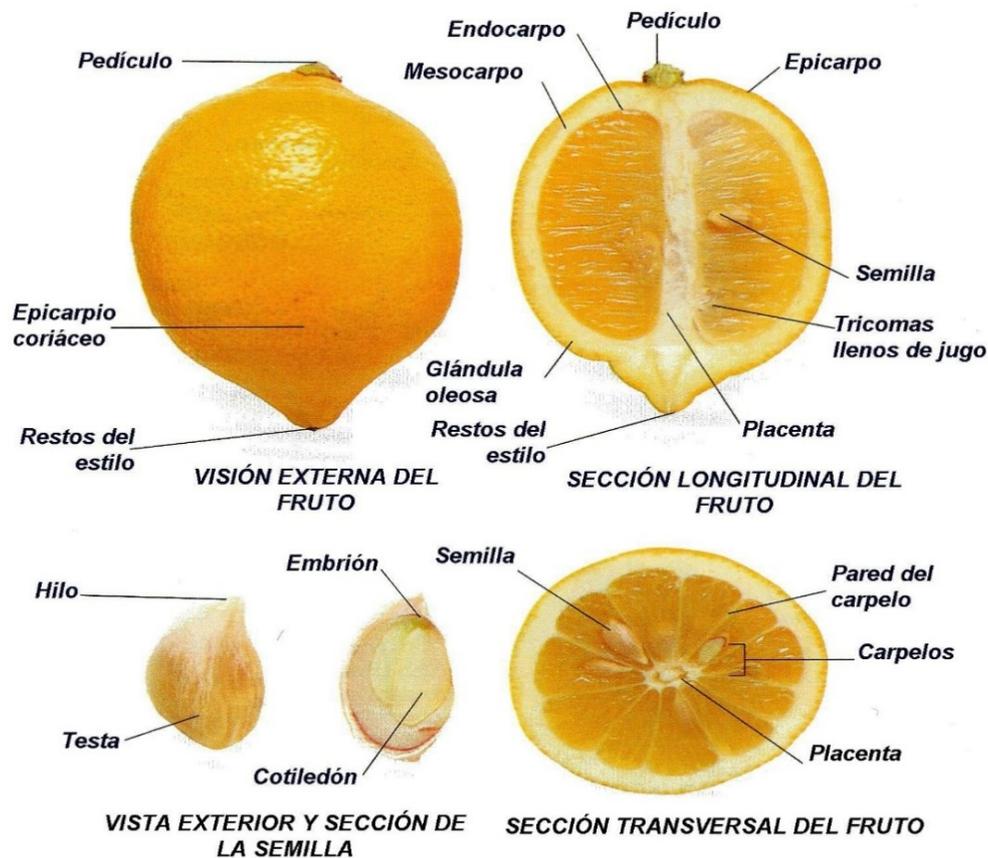


Figura 2.3. Partes del limón, incluyendo vista externa del fruto, corte transversal y longitudinal y vista de la semilla (Bedri, 2016).

2.2.3. Composición química y propiedades bioactivas

Los cítricos se caracterizan por tener unos compuestos químicos muy variados: azúcares, ácidos orgánicos, minerales, vitaminas, compuesto fenólicos, fibra y aceites esenciales entre otros. Se pueden exponer diferenciando entre la composición química y las propiedades bioactivas.

2.2.3.1. Azúcares

Del total de sólidos solubles, aproximadamente el 75% son azúcares. Los principales azúcares presentes en naranja, limón, pomelo y mandarinas son glucosa, fructosa y sacarosa. En la figura 2.4, se muestra una molécula de sacarosa formada mediante enlace glucosídico por una molécula de glucosa y otra de fructosa. Estos

azúcares se van incrementando a lo largo que avanza la maduración en el fruto y dependen en gran medida de las condiciones de cultivo y meteorológicas. En un mismo árbol, frutos del interior tendrán concentraciones más bajas de azúcares que los situados en el exterior, de igual modo ocurre con los frutos orientados al norte respecto a los orientados al sur, incluso dentro de un mismo fruto la concentración aumenta del pedúnculo al estilo.

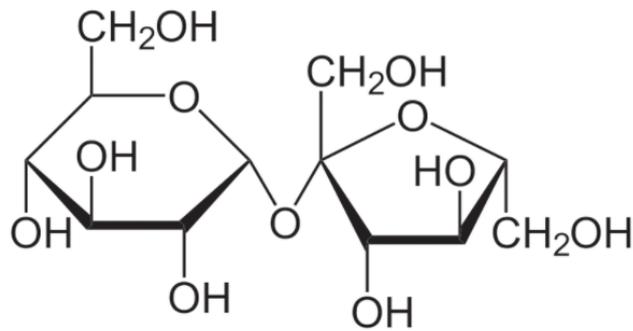


Figura 2.4. Molécula de sacarosa compuesta por glucosa y fructosa.

Conocer la relación entre la glucosa y la fructosa, cantidad de sacarosa y el extracto libre de azúcar puede servir de gran utilidad en la detección de adulteraciones en zumos ya que una desviación de la relación glucosa/fructosa puede indicar indicios de que se han utilizado otros orígenes. Por ejemplo, en Argentina o Brasil valores elevados en la concentración de sacarosa pueden indicar adición de azúcar o proporciones bajas frente al resto de azúcares pueden dar indicios de adición de jarabes de glucosa-fructosa.

2.2.3.2. Ácidos orgánicos

Los ácidos junto con los azúcares caracterizan organolépticamente a los cítricos, dándoles un matiz característico e incluso ocultando algunos defectos producidos durante el procesado. Desempeñan un importante papel frente a los hongos y pueden alcanzar en el caso de las limas y limones hasta el 60-70% del total de sólido solubles. Los ácidos más importantes son el cítrico, ascórbico y málico, aunque también existen en menor proporción el oxálico, láctico, tartárico, succínico entre otros. El ácido cítrico mostrado en la figura 2.5, supone más del 75% del total de acidez.

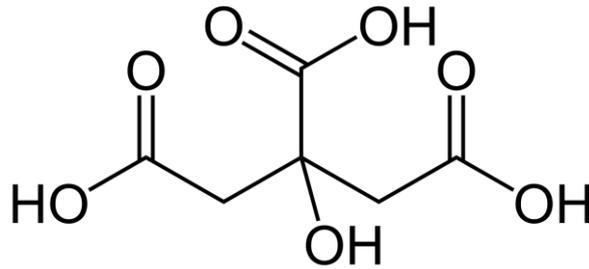


Figura 2.5. Molécula del ácido cítrico.

En naranja, pomelos y mandarinos, la concentración de los ácidos presentes aumenta conformen se desarrolla el fruto, manteniéndose constantes hasta la maduración que disminuyen. Para las naranjas, la madurez va relacionada íntimamente con la ratio, que es el cociente entre los grados brix y el porcentaje de acidez que determina el comienzo de recogida de los frutos.

Cabe mencionar la importancia del ácido ascórbico, ya que actúa como antioxidante del sabor y el color en muchos alimentos y se puede obtener de los cítricos. Comúnmente se conoce como Vitamina C y posee propiedades beneficiosas para la salud, aunque se degrada con facilidad por la acción del calor (procesos de pasteurización) y por la acción del tiempo. Dentro del fruto varía según la zona teniendo una mayor concentración en la zona central y peduncular frente a la exterior próxima a la corteza y al estilar. En cuanto a las diferencias en la distribución en un mismo árbol, los frutos situados en la cara sur y en las zonas altas tendrán una mayor cantidad de ácido ascórbico frente a la cara norte y zonas bajas.

2.2.3.3. Compuestos fenólicos

Los flavonoides son los compuestos mayoritarios en los cítricos, son uno de los grupos más extendidos de metabolitos secundarios de las plantas (Robards et al., 1999) y poseen un esqueleto que está compuesto por dos anillos aromáticos. A su vez, los flavonoides se pueden clasificar en tres grupos: flavanonas, flavonas y flavonoles (Benavente-García et al., 1997).

Las flavanonas más abundantes en cítricos son: hesperidina, eriocitrina, naringina, cuyas estructuras se presentan en la figura 2.6. En los últimos años, estos compuestos han sido ampliamente estudiados por sus importantes propiedades, su potencialidad farmacológica y como posibles marcadores taxonómicos. La hesperidina se presenta en pequeñas partículas blancas y suele clasificarse como un defecto visual

en zumos y concentrados, donde puede aparecer por ciclos largos de procesado en limones, naranjas y mandarinas. La naringina por su parte, es el flavonoide característico de los pomelos y le otorga ese amargor propio e inconfundible. Además, la medición y cuantificación de estos compuestos puede ser de gran utilidad para determinar la contaminación entre especies, o lo que es lo mismo la adulteración.

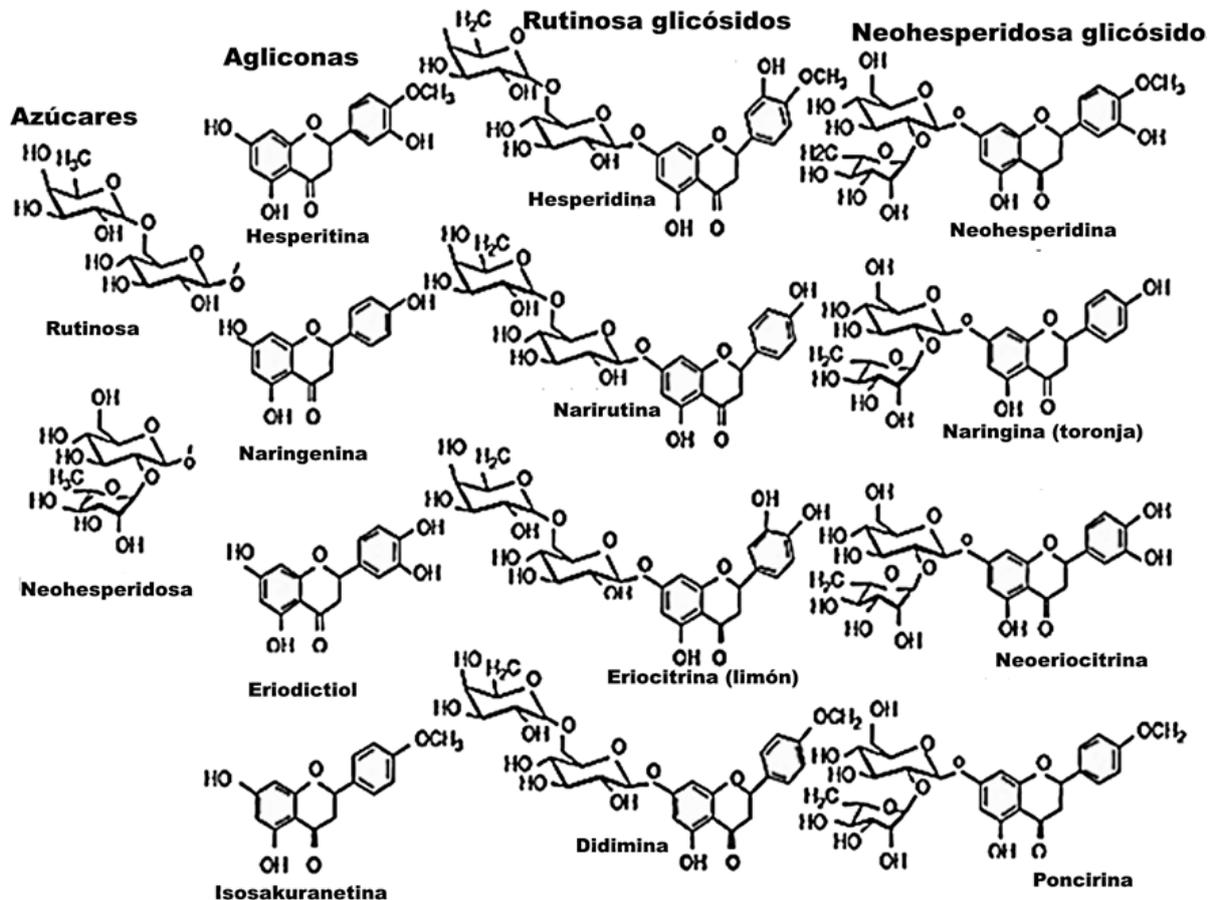


Figura 2.6. Formas agliconas y glicósidos de las flavanonas presentes en los cítricos (De la Rosa-Hernández et al., 2016).

2.2.3.4. Otros compuestos presentes en los cítricos

Además de los compuestos mencionados en los apartados anteriores, existen otros en diferentes proporciones:

- El agua está presente como el componente mayoritario, oscilando entre el 80-90%, varía según el grado de madurez y las condiciones meteorológicas

- ✚ Las sales minerales están presentes en pequeñas cantidades destacando las sales potásicas y cálcicas. Además, éstas contienen sodio, fósforo, hierro y magnesio (Kimball, 2002)
- ✚ Todos los miembros del género *Citrus* contienen aromas característicos (Gergensen y León, 1999), presentes como aceites esenciales
- ✚ Los compuestos nitrogenados están presentes como proteínas, péptidos, aminas y aminoácidos y su valor es máximo en la maduración. Aunque el contenido en proteínas es bajo en los frutos, son importantes en las estructuras celulares y en las enzimas implicadas en el metabolismo de los frutos. En cuanto a los aminoácidos, la arginina y la prolina son los que están en mayor concentración
- ✚ Las pectinas, lignina, hemicelulosa y celulosa componen las fibras presentes en los cítricos, mayoritariamente en la piel de los frutos, de donde en la industria de obtención de pectinas se utiliza como materia prima pieles de naranja principalmente
- ✚ Los pigmentos, son los elementos que producen la coloración particular de cada variedad, la clorofila les aporta el verde inmaduro y los carotenoides las tonalidades amarillas y rojas.

En la tabla 2.2 se muestran las cantidades de los componentes más relevantes de los cítricos.

Tabla 2.2. Principales componentes presentes en los cítricos (Olmos, 1999).

	Naranja	Limón	Mandarina	Pomelo
Agua (g/100g)	87.1	90.1	87.0	88.4
Proteínas (g/100g)	1.0	1.1	0.8	0.7
Lípidos (g/100g)	0.20	0.03	0.20	0.10
Carbohidratos (g/100g)	12.2	8.2	11.6	9.8
Calorías (kcal/100g)	49	27	46	39
Vitamina C (g/100g)	50	45	31	40
Vitamina A (IU)	190-310	20	420	80
Vitamina B1 (mg/100g)	0.10	0.00	0.07	0.04
Vitamina B6 (mg/100g)	0.03	0.04	0.06	0.02
Sodio (mg/100g)	2.9	6.0	2.0	2.0
Potasio (mg/100g)	197	148	110	198
Magnesio (mg/100g)	12.9	9.0	11.0	10.0
Calcio (mg/100g)	45.1	26.0	40.0	17.0
Fósforo (mg/100g)	23.7	8.0	15.0	15.0
Hierro (mg/100g)	0.33	0.40	<0.50	<0.50
Ácido Cítrico (mg/100g)	980	3840	580	1460

2.2.3.5. Propiedades bioactivas

Actualmente, el binomio alimentación-medicina es considerado esencial por parte de la comunidad científica y cada vez más por el público en general. El concepto de alimento funcional que surgió en los años 80 en Japón, para ahorrar costes en los seguros médicos, en la actualidad se encuentra ampliamente extendido y queda demostrado que un mayor número de personas se encuentran concienciadas en que una buena alimentación es fuente de salud. Por lo tanto, cada vez más se apuesta por intentar evitar los alimentos ultraprocesados y sustituirlos por alimentos naturales de origen vegetal y suplementos prebióticos y probióticos. Aquí entran los diferentes estudios que presentan los beneficios de los alimentos funcionales como son prevenir o retardar las enfermedades crónicas, el envejecimiento, las defensas biológicas, entre otras.

Las campañas de publicidad están cada vez más orientadas a explicar las propiedades fisiológicas beneficiosas para la salud del alimento en cuestión, en vez del concepto tradicional de que un alimento es bueno si da energía. Esto está facilitando la aparición de nuevos productos en el mercado y una expansión del I+D+i en el sector agroalimentario.

Históricamente a los cítricos se les ha atribuido buenas propiedades, en mayor medida al contenido en vitamina C en la prevención del escorbuto, debido a numerosos estudios recientes se puede considerar a los flavonoides como constituyentes de propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antialérgicas, antivirales, antimutagénicas y anticarcinogénicas (Proteggente et al., 2002; Wilmsen et al., 2005).

De entre sus actuaciones dentro del organismo, destaca la limitación de la acción de los radicales libres, reduciendo el riesgo de cáncer y enfermedades cardíacas, pero como vieron Silberberg et al. (2006), comprender la biodisponibilidad, el transporte y el metabolismo de los flavonoides es un requisito previo para entender cómo protegerán o cuáles serán sus efectos protectores sobre el organismo. En la actualidad, pese a que la producción de cítricos sea para la exportación, el consumo en fresco o en la industria de procesado de zumos y concentrados, existen pequeñas plantaciones que por las peculiaridades del metabolismo secundario del género *Citrus* y su contenido en flavonoides se están orientando al uso farmacológico y su aprovechamiento industrial.

En este sentido, los flavonoides son utilizados como aditivos con múltiples funciones en la industria agroalimentaria, además de servir como saborizante, actividad antioxidante y protección de la peroxidación. En el fruto o zumo exprimido estos compuestos protegen de la oxidación y de los cambios que puedan verse afectados, como es el perfil organoléptico, ya que protegen la calidad de los alimentos.

2.3 Productos y subproductos en el procesado de cítricos

En la industria en general, no siendo una excepción la industria del procesado de cítricos, se intenta obtener el máximo número de productos a partir de la fruta manteniendo siempre una alta calidad. Para ello, los productos y subproductos (*Products & By-Products*), también llamados productos primarios y productos secundarios se pueden clasificar en:

2.3.1. Productos primarios

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

- ✚ Fruta en fresco. Entre los tratamientos que recibe destaca: inspección visual, lavado, encerado y empaquetado (*packaging*)
- ✚ Zumo. Se puede dividir en dos corrientes FC y NFC. FC son las siglas en inglés de *From Concentrate* y NFC proviene de *Not From Concentrate*. Como ventaja el FC reduce costes de transporte y almacenamiento otorgando una mayor durabilidad. En la figura 2.7 y en la figura 2.8 se presentan los esquemas de obtención de zumo y concentrado

2.3.2. Productos secundarios

- ✚ *Comminute*. Es un producto destacado en Reino Unido. Se obtiene moliendo fruta entera o por mezcla de zumo concentrado con piel triturada. Se utiliza en bebidas de frutas puesto que tiene un intenso sabor y una gran cantidad de aromas y aceites esenciales por ese contenido de corteza presente. Esta propiedad le ofrece una gran ventaja competitiva frente a otros productos ya que habitualmente no se utiliza en un 100%, sino que es mezclado en bebidas refrescantes con jarabes, colorantes, estabilizantes o edulcorantes
- ✚ Celdillas. También se conoce como pulpa, son vesículas o pequeños gajos llenos de zumo presentes en el interior del fruto. Su utilización se debe a que al ser añadida en el producto final da una apariencia de natural y mejora la sensación en boca, conocido como "*mouthfeel*"
- ✚ *Pulp Wash*. También conocido como "*WESOS*" de las siglas en inglés de Water Extracted Soluble Orange Solids. Se utiliza como un agente enturbiante en bebidas de frutas proporcionando también cuerpo y sensación en boca. Su obtención es a partir de los residuos pulposos generados en la extracción
- ✚ Aceites, esencias y limoneno. Se obtienen a partir de la piel. Se vende normalmente a empresas que fabrican aromas ya que se puede utilizar en multitud de industrias como alimentación y bebidas, cosmética y productos químicos. Estos productos se obtienen en diferentes momentos del proceso, tanto en la extracción como una posterior recuperación durante la evaporación

✚ *Peel extract*. Este producto es el objeto de estudio en la presente Tesis y de búsqueda de sus propiedades funcionales, así como un mayor aprovechamiento en diferentes tipos de bebidas y preparados. El “*Peel extract*” se obtiene mediante una maceración de las pieles de los cítricos en presencia de enzima y agua (extracción enzimática). Dentro de sus usos actuales, destaca como agente enturbiante para la industria de refrescos. Además, como se puede evaporar el agua, facilita su transporte y conservación, ahorrando costes de almacenamiento

En la figura 2.9 se muestra un esquema sobre las cantidades de productos obtenidos a partir de una tonelada de naranjas. En ella, se observa que por cada tonelada de fruta se obtienen 553 kg de zumo o 100 kg aproximados de concentrado de naranja a 65 grados brix. Estos datos difieren según la variedad, condiciones climatológicas o estado de la fruta. Para otras frutas (limón, pomelo, mandarina) estos valores también son diferentes.



Figura 2.9. Productos obtenidos a partir de una tonelada de naranjas. Fuente: The Orange Book. Tetrapak.

En la figura anterior se muestra a la izquierda las cantidades que se obtiene a partir de la extracción y a la derecha las cantidades obtenidas tras concentrar el zumo. Si nos fijamos en la parte de la extracción, el 41.3% son desechos que no se aprovecharían si lo que buscamos es obtener zumo solamente. Estos residuos corresponden a piel, bagazo y semillas con algo de zumo impregnado. Por su alto contenido en materia orgánica, agua y azúcares es fácilmente fermentable y representa

un problema de gestión de residuos en la industria. Gracias a la concienciación del “zero waste”, en las últimas décadas se han desarrollado procesos para poder valorizar estas corrientes para que se integren en el proceso como un producto más, disminuyendo el impacto ambiental de los residuos generados a la par de conseguir un beneficio económico por el uso como ingrediente en la industria alimentaria.

Los residuos generados en la industria cítrica poseen un alto valor energético, dada su elevada concentración de carbohidratos. El uso más común es destinar estos residuos a la alimentación animal o fertilizantes. Este uso no es del todo fácil, ya que los animales jóvenes son más reticentes y en general debe estar acostumbrados a un consumo regular cosa que no es posible en los meses de verano. Además, el transporte se ve condicionado a la lejanía entre las granjas y las empresas cítricas y al peso en agua que contienen. Otra desventaja es el poder corrosivo de los ácidos presentes que pueden deteriorar metales y cemento. Otro uso más reciente es conseguir que la piel y pulpa sobrante con alto contenido en fibra (insoluble) pase a estar más disponible como soluble mediante extrusión para así, valorizar este subproducto. Por último, otras rutas de valorización se ven limitadas por el alto coste de secado que imposibilitan su desarrollo e inversión.

El fin es conseguir productos con alto valor añadido, partiendo de subproductos del procesado de la fruta y la necesidad de elaborar bebidas sin el uso de azúcar de caña o de remolacha de acuerdo con las directrices actuales que marca la unión europea. Por norma general cualquier subproducto de la industria cítrica contiene un alto contenido en fibra dietética, polifenoles, carotenoides y vitamina C. Entre los productos que se quiere comercializar se encuentra: bebidas a partir de azúcares procedentes de la fruta, eliminando el uso de otros tipos de azúcar, *smoothies*, concentrados con propiedades funcionales, entre otros.

Para la obtención de estos productos, en la presente Tesis se utiliza como tecnología emergente e innovadora, procesos de clarificación mediante membranas de diferentes tamaños de corte molecular como vía para la valorización de estos subproductos y para la obtención de ingredientes funcionales que sean materia prima en bebidas y formulaciones.

2.4. Clarificación de subproductos

La clarificación en la industria alimentaria se utiliza con asiduidad y existen grandes avances en este sentido. En la presente Tesis se quiere dar un paso más aplicando esta tecnología a los residuos, como idea innovadora del aprovechamiento íntegro del proceso. Actualmente los dos tipos de clarificación más usados son la clarificación mediante tratamientos enzimáticos y mediante membranas.

2.4.1. Clarificación mediante tratamiento enzimático

Los zumos de frutas y vegetales poseen una gran aceptación en el mercado debido a sus propiedades funcionales y a sus beneficios en la salud humana. No obstante, en el aspecto visual de la aplicación final se puede diferenciar dos grandes grupos: productos '*cloudy*' y productos '*clear*'. En la figura 2.10, se puede observar la diferencia entre ambos tipos de productos, a la izquierda un zumo de naranja estándar y a la derecha un zumo de naranja clarificado.

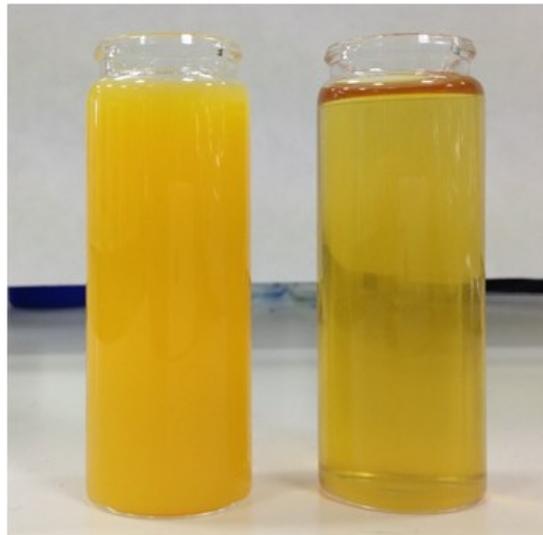


Figura 2.10. Comparativa entre un zumo turbio y otro clarificado.

Para la obtención de los productos '*clear*' existen tres vías principalmente generalizadas en el mercado: filtración mediante membranas, utilización de enzimas y procesos basados en la combinación de ambas. Por lo general, cuando se aplica la combinación de ambas técnicas, se utilizan primero las enzimas para degradar las partículas coloidales y a continuación, la filtración por membranas por lo que se disminuye el ensuciamiento producido en la superficie de la membrana y se frena el descenso del flujo (Maktouf et al., 2014).

La turbidez de los zumos naturales de frutas es debida a la existencia de componentes como hemicelulosas, almidón y pectinas. Por ejemplo, las manzanas inmaduras contienen un 15% de almidón. La realización de un proceso de centrifugación antes de la clarificación puede eliminar alrededor del 10% de ese almidón, aunque aún queda un 5% restante (Utami et al., 2016). Por lo tanto, la degradación de esos componentes con una enzima apropiada puede promover su clarificación, sus características sensoriales y su tiempo de almacenamiento (Shahrestani et al., 2016). Los tratamientos enzimáticos efectivamente degradan polisacáridos, reducen la viscosidad, turbidez y valores de absorbancia e incrementan la recuperación del zumo, los sólidos totales disueltos y la luminosidad (Saxena et al., 2014).

Las enzimas son proteínas catalizadoras de las reacciones bioquímicas. Una de las propiedades fundamentales de las enzimas en relación con su actividad catalítica es su especificidad, esta es una consecuencia de la afinidad de la enzima por su sustrato, que resulta en la acomodación del mismo en su centro activo (Peña et al., 2004).

En términos generales, todos los nombres de las enzimas terminan en asa, llevando como primera parte del nombre el del sustrato sobre el cual actúan, y en algunos casos el del tipo de reacción que catalizan. Como, por ejemplo, las pectinasas que actúan sobre las pectinas.

Los principales factores que afectan a la actividad enzimática son:

- ✚ Efecto de la temperatura
- ✚ Efecto de las radiaciones
- ✚ Efecto de la humedad
- ✚ Efecto del pH y de la fuerza iónica
- ✚ Centro activo y especificidad enzimática

Las enzimas son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria. De entre sus usos destaca la industria del vino (Rincón-Torres, 2007). Pero también se utiliza y existen numerosos estudios en la clarificación de otro tipo de jugos como: cactus (Padrón y Moreno, 2010), maracuyá (Santamaría et al., 2000), membrillo (Zegarra, 2000), manzana (Herrero et al., 2010), limón (Maktouf et al., 2014), kiwi (Cassano et al., 2007), naranja (Widowati et al., 2017; Utami et al., 2016) y sandía (Saxena et al., 2014).

Las principales enzimas que intervienen en el procesamiento de frutas y vegetales son las enzimas pécticas o pectinasas, siendo el 75% de las ventas globales de enzimas en la industria alimentaria (Anuradha et al., 2014). Su uso juega un papel importante en la mejora de la calidad de los productos, aumentando la tasa de extracción y clarificación de ciertos zumos de frutas, así como en la extracción de aceites vegetales como el aceite de oliva, la estabilización de los productos y la mejora del sabor (Domínguez et al., 1994; Sieiro et al., 2012).

El término pectinasas o enzimas pectolíticas concierne sólo a las enzimas que degradan la parte galacturónicas de estas sustancias: comprende dos grupos, aquéllas que desesterifican los residuos metilados del ácido galacturónico y aquéllos que degradan los enlaces (1-4) entre los residuos de dicho ácido. La mayor parte de las preparaciones pectolíticas comerciales son obtenidas a partir de cultivos en superficie o sumergidos de *Aspergillus niger*. Estas contienen, en proporción variable, endopoligalacturonasa, exopoligalacturonasa, pectinestereasa y endopectiniliasa (Zegarra, 2000). La despectinización de zumos de frutas mediante el uso de pectinasas ha sido descrita como una alternativa eficiente para reducir la turbidez en muchos estudios (Kashyap et al., 2001; Landbo et al., 2007; Vaillant et al., 1999). Un tipo de enzima que es capaz de romper el almidón es la amilasa. Esta enzima degrada el almidón y los polímeros relacionados con el rendimiento del producto (Utami et al., 2016).

Existe un incremento en el interés de la inmovilización de pectinasas para la clarificación y despectinización de zumos de frutas aplicando una amplia variedad de soportes y métodos. (Alkorta et al., 1996). Una exigencia en los procesos de inmovilización es que los soportes utilizados para las aplicaciones deben mantener un alto nivel de actividad enzimática y prevenir una posible lixiviación durante la reacción (Lei y Bi, 2007).

En la tabla 2.3, se pueden observar las diferencias de turbidez obtenidas entre enzimas inmovilizadas y libres estudiadas por Shahrestani et al. (2016) en tres tipos de zumos de frutas (naranja, piña y manzana). Además, se incluye también la comparativa entre diferentes tiempos de incubación (0-300 minutos).

Tabla 2.3. Comparativa entre la turbidez de diferentes zumos con enzimas libres e inmovilizadas dependiendo del tiempo de incubación.

Tiempo de incubación (min)	Turbidez zumo de naranja (%)		Turbidez zumo de piña (%)		Turbidez zumo de manzana (%)	
	F	I	F	I	F	I
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
30	94.1	93.6	91.7	94.8	82.5	89.0
60	88.0	83.3	84.3	87.7	74.8	83.0
90	82.6	80.6	79.0	83.0	70.0	78.0
120	73.7	77.4	71.2	76.6	65.0	72.4
180	65.6	69.8	62.6	71.0	60.3	67.5
240	60.0	65.0	54.0	65.2	57.0	63.0
300	52.8	62.2	47.4	60.0	53.3	61.3

F- Enzima libre, I- Enzima inmovilizada

Para determinar el grado de efectividad del tratamiento de clarificación se pueden medir diferentes parámetros: porcentaje de transmitancia, absorbancia, reducción de azúcares (Sassi et al., 2016) y turbidez (NTU). Cabe destacar que una misma enzima en las mismas condiciones de trabajo de temperatura, tiempo de incubación o dosificación, no se comporta de igual manera en diferentes zumos de frutas, ya que existen otros factores como el pH, ácidos orgánicos o la cantidad de pectinas presentes en cada zumo.

2.4.2. Tecnología de filtración mediante membranas

Los procesos de filtración mediante membranas poseen diferentes ventajas: bajos requerimientos de energía, alta eficiencia de separación, fácil escalado (cambio de escala), operación simple, alta producción en términos de flujos de permeado y ausencia de fase de transición. En conjunto, estas ventajas facilitan la recuperación de productos de alto valor añadido (Cassano et al., 2014). Por estas razones estos procesos han sido aplicados en diferentes escalas, desde la escala macroscópica como es el pretratamiento

de corrientes (microfiltración) o como técnica de aislamiento y purificación (ultrafiltración y nanofiltración).

Tradicionalmente los procesos de membrana tales como microfiltración (MF), ultrafiltración (UF) y nanofiltración (NF) utilizan una presión transmembrana como fuerza impulsora. En la figura 2.11 se muestra una clasificación de estos procesos y su capacidad para separar la corriente de alimentación en dos nuevas corrientes (permeado y rechazo) usando una barrera (membrana).

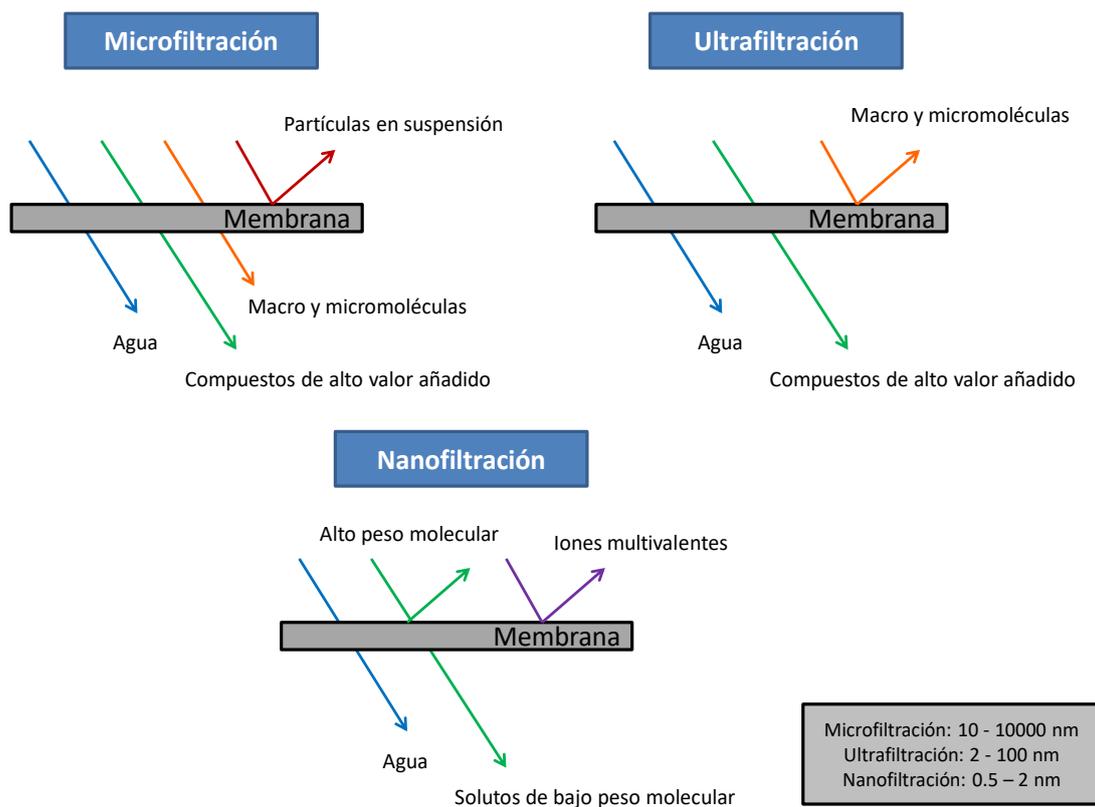


Figura 2.11. Esquema de las tecnologías de microfiltración, ultrafiltración y nanofiltración (Castro-Muñoz et al., 2016).

La eficiencia de separación de estas metodologías depende de un gran número de factores: composición fisicoquímica de la disolución de partida (tipo, peso, polaridad, carga del soluto), parámetros de operación (velocidad de flujo, presión transmembrana, flujo de permeado) y de las características de la membrana (material de la membrana, configuración del módulo de separación, tamaño de poro).

De entre las características que diferencian a los distintos procesos de MF, UF y NF, el tamaño de poro de la membrana es el que juega un papel primordial en el proceso de separación. En la figura 2.12 se muestra un esquema de la clasificación de las membranas en función de su tamaño de corte molecular (MWCO) (Castro-Muñoz et al., 2016).

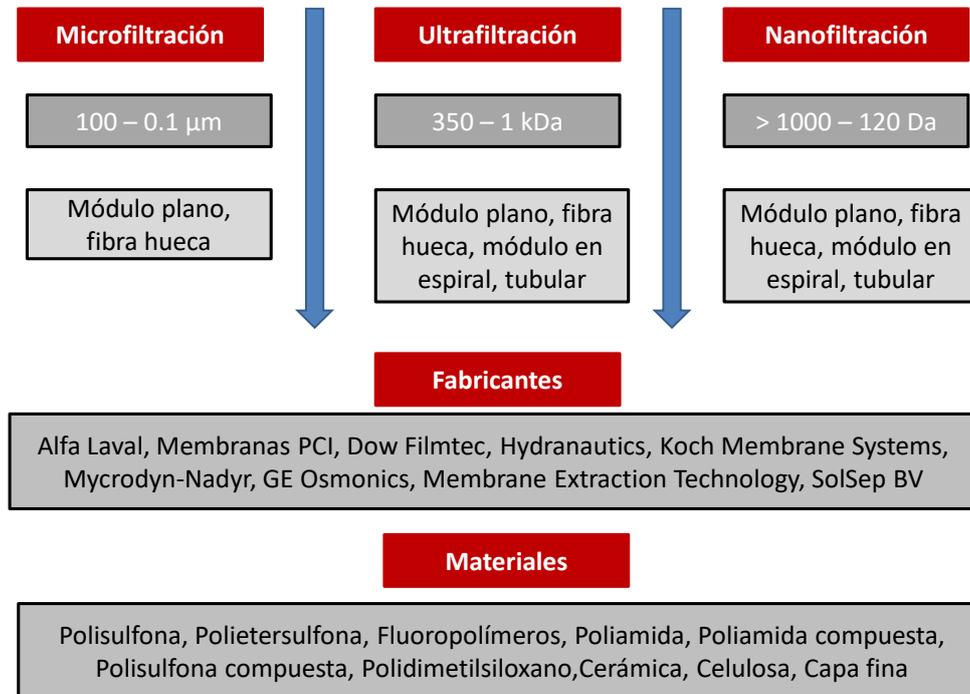


Figura 2.12. Clasificación de los procesos convencionales de membrana en función del tamaño de corte molecular (Castro-Muñoz et al., 2016).

La tecnología de membranas se ha aplicado en dos grandes campos: uno para la clarificación y concentración de los zumos procedentes de cítricos y, en la actualidad, en el aprovechamiento de diferentes subproductos procedentes de los cítricos para obtener nuevos productos de alto valor añadido como son los polifenoles, antocianinas y flavonoides. En la figura 2.13 se muestra un esquema general del proceso.

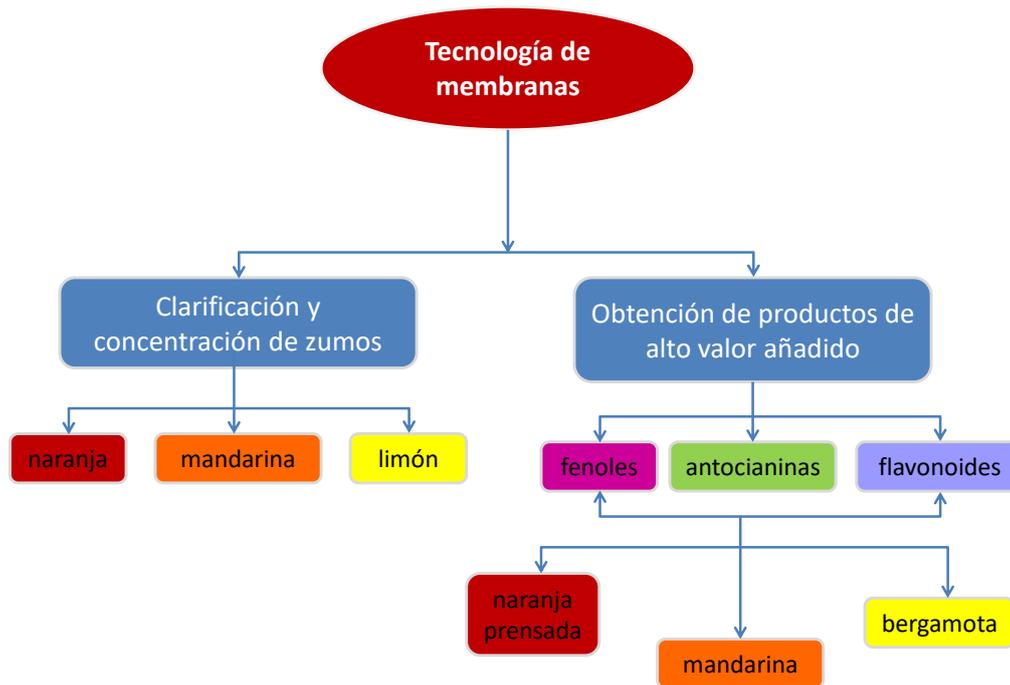


Figura 2.13. Esquema general de la aplicación de la tecnología de membranas en el tratamiento de cítricos (Elaboración propia).

La tecnología de membranas surge como sustitución de los procesos tradicionales de clarificación y concentración de zumos, dado que estos procesos requieren menor potencia (energía), reducen los costes de operación y operan a temperatura ambiente. Las ventajas de estos procesos de membrana sobre los métodos tradicionales son poder trabajar con el producto a menor temperatura, (mejora la estabilidad térmica), el incremento de la retención del aroma, su menor consumo de energía y menor coste de equipamiento. La concentración de zumos de cítricos no sólo suministra estabilidad microbiológica, además permite economía en el envasado y distribución del producto acabado debido a la reducción del peso y volumen aumentando la calidad del zumo debido al efecto del tratamiento de la membrana (Bhattacharjee et al., 2017).

Las ventajas potenciales de los procesos de MF y UF sobre los procesos convencionales de filtración son obvias, dado que obtiene un producto de mejor calidad con bajo consumo energético (Urosevic et al., 2017).

Diferentes autores han encontrado que los tratamientos de microfiltración y ultrafiltración aplicados sobre el zumo de naranja podían obtener un zumo clarificado

en el cual se habían eliminado los sólidos en suspensión, y habían quedado retenidos la mayoría de los sólidos solubles y ácidos (Pagliero et al., 2011; Toker et al., 2014), resultados muy parecidos fueron encontrados por Casano (2007) con el añadido de que los polifenoles eran bien preservados en el zumo clarificado. Los estudios de Toker et al. (2014) pusieron de manifiesto que el ácido ascórbico y el contenido en fenoles en el zumo de naranja clarificado fue alto para un tamaño de corte molecular (MWCO) de las membranas elevado, por lo que se pueden obtener productos con elevada actividad antioxidante total, siendo éstos muy bien recibidos por el mercado, dado que éstos compuestos reducen el riesgo relacionado con los radicales libres y el peligro asociado a un gran número de enfermedades. Por otro lado, Saura et al. (2012) observaron que la filtración tangencial en la producción de zumo de limón clarificado no reduce la calidad sensorial del producto.

Galaverna et al. (2008) evaluaron los cambios de algunas propiedades físico-químicas durante los procesos integrados de membrana aplicados a diferentes zumos entre los que se encontraba el zumo de naranja sanguina (roja), estos autores encontraron una disminución del contenido de actividad total antioxidante del 15-20%, pero tan solo el 15% de la reducción de la actividad total antioxidante fue encontrada en el zumo de naranja sanguina, el concentrado retuvo el color rojo brillante y el agradable aroma. Según el estudio realizado, el proceso de ósmosis inversa produjo un concentrado de zumo de naranja con alto porcentaje en sólidos solubles y vitamina C, el cual mostró una tendencia de aumento de la concentración con el aumento de la presión. El concentrado mediante ósmosis inversa conservó el aroma del zumo de forma muy diferente, respecto al concentrado obtenido por evaporación térmica (Jesus et al., 2007). Estos resultados se muestran en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Evaluación de las propiedades fisicoquímicas del zumo de naranja inicial y el concentrado de zumo obtenido a diferentes presiones (Jesus et al., 2007).

Parámetros	Zumo de la primera etapa	Zumo concentrado		
	Alimentación	20 bar	40 bar	60 bar
pH	4.2	4.1	4.3	4.3
Acidez (%)	0.4	1.0	1.4	1.8
Sólidos solubles (grados brix)	8.2	16.0	28.5	35.7
Contenido en pulpa (% v/v)	3.4	4.9	22.5	28.7
Viscosidad (mPa·s)	1.5	2.3	5.3	10.3
Vitamina C (mg ác. Ascórbico/100 g)	29.3	53.9	82.7	101.1
Luminosidad	14.4	11.0	7.9	7.7
a Hunter	1.0	3.0	5.2	5.8
b Hunter	9.9	7.0	4.4	4.3

Luminosidad (0 = negro y 100 = blanco)

a (-80 hasta 0 = verde, desde 0 a 100 = rojo); b (-100 hasta 0 = azul, desde 0 a +70 = amarillo)

Mirsaeedghazi y Eman-Djomed (2017), obtuvieron de forma exitosa un zumo de naranja amarga clarificado usando un proceso de microfiltración, llegando a eliminar más de un 98% de turbidez.

La aplicación de ultrafiltración al zumo de limón causó una notable reducción en la turbidez (99%) y viscosidad (98%), además obtuvo un alto nivel de clarificación (Maktouf et al., 2014).

Estos autores estudiaron diferentes fracciones volátiles y encontraron un rechazo selectivo de hidrocarburos terpénicos, la fracción más abundante. Este proceso de desterpenificación es de vital importancia debido a las características negativas de los hidrocarburos terpénicos cuando se utilizan en la aromatización de los diferentes tipos de alimentos, por ejemplo, éstos no son solubles en agua y se acumulan en pequeñas gotas en la superficie de las bebidas del líquido preservado.

El permeado del zumo de limón clarificado mediante microfiltración presentó unos valores de acidez, pH y sólidos totales solubles comparables con los del limón fresco sin tratar (Espamer et al., 2006; Chornomaz et al., 2013).

Echavarria et al. (2012) estudiaron el proceso de ultrafiltración del procesado del zumo de mandarina a través de un módulo de membrana tubular de polisulfona (8 kDa) y posterior concentrado mediante ósmosis inversa en un módulo tubular de poliamida de capa fina (del 99% de rechazo de NaCl), con un área de 0.9 m². Además, con el objetivo de obtener mayores flujos de permeado, la alimentación fue previamente tratada con una enzima pectolítica comercial.

Realizaron el seguimiento del proceso analizando los siguientes parámetros: flujo de permeado, sólidos solubles, viscosidad, densidad, pH, acidez, índice de formol, almidón, contenido en pulpa, color y presencia de pectina. El uso de enzimas pectolíticas produjo un incremento en el flujo de permeado de aproximadamente un 40%, conservando las propiedades del zumo inicial. Los resultados mostraron que el zumo de mandarina tuvo menores problemas de ensuciamiento de la membrana (*fouling*) comparado con otros zumos (melocotón, pera y manzana), siendo su valor de aproximadamente de 0.25. Además, obtuvieron un factor de concentración de volumen de 1.49 mediante ósmosis inversa.

Los estudios realizados por Maktouf et al. (2014) en los que el zumo de limón fue tratado con pectinasa de *Penicillium occitanis* a diferentes concentraciones de enzima (0-1200 U/L), distintas temperaturas (25-50 °C) y tiempos de incubación (0-90 minutos), evaluaron el efecto de estos tratamientos enzimáticos sobre la viscosidad del zumo. Estos autores encontraron que las condiciones óptimas del tratamiento fueron, una concentración de enzima de 600 U/L, 30 °C de temperatura y 45 minutos de tiempo de incubación. En estas condiciones llegaron a una reducción de la viscosidad del 77 % y una reducción de la turbidez del 47 %. El tratamiento enzimático se complementó mediante una membrana de ultrafiltración de 15 kDa de corte molecular (MWCO). Los resultados del análisis del zumo clarificado indicaron que la eliminación previa de la pectina de forma enzimática permitió obtener mayores flujos de permeado y un zumo de mayor calidad. El zumo de limón obtenido fue estable y de apariencia clara.

El estudio microbiológico mostró que el zumo de limón estaba libre de microorganismos aerobios, mohos, enterobacterias y coliformes, y fue microbiológicamente estable al almacenamiento durante 3 meses. Los resultados

sugieren que el tratamiento enzimático acoplado a la ultrafiltración puede ser usado en la producción del zumo de limón con un elevado valor comercial.

La aplicación de la ultrafiltración obtuvo una reducción del 99% de la turbidez y del 98% de la viscosidad. En la tabla 2.5 se muestran las características del zumo sin tratar y el zumo clarificado mediante ultrafiltración.

Tabla 2.5. Características fisicoquímicas del zumo de limón natural y el tratado mediante el tratamiento enzimático seguido de ultrafiltración.

	Zumo original	Zumo tratado con enzima + UF
Turbidez (NTU)	1500.00	0.17
Viscosidad (mPa·s)	20.00	0.70
Claridad A_{650 nm}	1.75	0.06
Color A_{420 nm}	2.24	0.23

Además, estos autores demostraron que el tratamiento enzimático afecta al comportamiento de la membrana en su fenómeno de ensuciamiento (*fouling*) durante el proceso de clarificación, dado que al adicionar pectinasa al zumo de limón se produce una capa de "*fouling*" que obtuvo mayores flujos de permeado que el zumo sin tratar.

A nivel del proceso de ultrafiltración, los resultados demostraron que el flujo de permeado se ve afectado por la cantidad de pectinasa presente en el zumo de limón. Una posible explicación podría ser debido a la estructura de las sustancias péptidas, las cuales poseen largas cadenas que dan como resultado un gran volumen molecular. Alvarez et al. (1998), trabajando con zumo de manzana sugirieron que las pectinas forman una capa de gel comprimible que podría traer consigo un severo fenómeno de "*fouling*" en la membrana de ultrafiltración.

El principal problema del uso de los procesos de membrana cuando se utilizan en los procesos de clarificación y concentración de zumos de cítricos es el ensuciamiento de la membrana o "*fouling*". El ensuciamiento de la membrana se manifiesta por sí mismo como una disminución del flujo durante el tiempo de operación, reduciendo así la permeabilidad de la membrana. El grado de ensuciamiento de la misma determina la frecuencia de la limpieza, el tiempo de vida de la membrana, el área necesaria y de

forma consecuente los costes de diseño y operación de las plantas de membrana (Bhattacharjee et al., 2017).

2.4.3. Desarrollo de procesos biosostenibles en la obtención de nuevos productos funcionales

Recientemente, el desarrollo del tratamiento de residuos procedentes del procesado de frutas (cítricos) para su aprovechamiento, se ha centrado en la separación de macro y micro-moléculas funcionales con el objetivo de obtener un valor añadido de estos subproductos. Las tecnologías de membrana emergen como una herramienta para mejorar el “*stock*” de la producción y ser el camino más adecuado para el tratamiento de estos residuos (Galanakis et al., 2013; Galanakis, y Schieber, 2014).

Los flavonoides cítricos han sido investigados por las siguientes actividades biológicas: antiinflamatorias, anticarcinogénicas y antitumorales, que han sido demostradas.

La mayoría de las especies cítricas acumulan cantidades substanciales de flavonoides durante su desarrollo. Entre ellos, la naringina (naringenin 7-O-neohesperidósido), un glicósido de flavanona, es distintivamente dominante en el pomelo (*C. paradisi*), y es responsable del sabor amargo de los zumos de pomelo. La narirutina (naringenin-7-O-rutiósido) se encuentra también presente en el pomelo, pero en menor proporción.

A partir de los artículos seleccionados durante el proceso de revisión bibliográfica se ha elaborado la tabla 2.6 en la que se muestran los principales compuestos recuperados como subproductos de la industria de zumos de cítricos, usando los procesos de membrana convencionales. En la tabla se muestran para los diferentes zumos estudiados, la eficacia del proceso de separación, tipo de membrana, tamaño de corte molecular de la misma, su configuración, y los diferentes compuestos bioactivos obtenidos.

Tabla 2.6. Condiciones del proceso de membranas en la recuperación de productos de alto valor añadido.

Compuestos	Eficacia	Subproducto	Proceso	MWCO	Material	Configuración	Referencia
Polifenoles	58.30%	Licor prensado naranja	UF	100 kDa	Polisulfona	Fibra hueca	Figueroa et al., 2011 y 2012
Antocianinas y flavonoides	>90%	Licor prensado naranja	NF	180 Da	Poliamida-polisulfona	Módulo en Espiral	Conidi et al., 2012
	>80%		NF	300 Da	Polipiperazina amida de capa fina		
	>80%		NF	400 Da	Polietersulfona		
	>70%		NF	1000 Da	Polietersulfona		
Antocianinas, flavonoides	>65%	Licor prensado naranja	NF	Rechazo Na ₂ SO ₄ > 25-50 %	Polietersulfona	Módulo en Espiral	Cassano et al., 2014
Carotenos y flavonoides		Zumo de naranja y clementina	MF+DF	0.2 µm	Cerámica	Membrana tubular	Polidori et al., 2018
Polifenoles y flavonoides	91-97% Flav.	Bergamota	UF+NF	100 kDa +450 Da	Polisulfona + TiO ₂	Membrana plana	Conidi et al., 2011
	43-62 % Polif. 44 %			100 kDa +750 Da	Polisulfona + TiO ₂	Fibra hueca Membrana tubular	

Polidori et al. (2018) evaluaron los procesos basados en microfiltración seguida de una etapa de diafiltración con el objetivo de concentrar y purificar los principales compuestos flavonoides y carotenoides en zumos de cítricos. Estos autores utilizaron una planta piloto con una membrana cerámica tubular de un tamaño de poro de 0.2 μm , trabajando a 40 °C y una presión transmembrana (TMP) de 3 bar. Estudiaron diferentes condiciones de operación, variando la relación de reducción de volumen de 2.5 hasta 10, y un volumen de diafiltración por encima de 1.7. El rango de flujos de permeado estuvo comprendido entre 20 hasta 100 $\text{Lh}^{-1}\text{m}^{-2}$ de acuerdo con la reducción de volumen.

El trabajo llevado a cabo por estos autores mostró que es posible de forma simultánea concentrar carotenos y hesperidina de 8 a 10 veces a través de un proceso de microfiltración. El mayor coeficiente de rechazo de estos compuestos puede ser explicado por su baja solubilidad en agua y su fuerte asociación con los compuestos sólidos insolubles. Estos procesos no fueron muy eficientes para la concentración de naringina, la cual fue menos retenida por la membrana pesar de poseer una estructura química muy similar a la hesperidina.

Al evaluar diferentes condiciones de operación se obtuvieron de forma satisfactoria buenos flujos de permeado, especialmente con el zumo de naranja fresco el cual presentó menos potencial de ensuciamiento (fouling) que los procesos industriales propios. Sin embargo, no hubo una correlación clara entre los flujos de permeado, turbidez y sólidos en suspensión.

De forma adicional, la fase de diafiltración durante el proceso llevado a cabo incrementó la pureza de los carotenos y hesperidina desde 17 hasta 21 veces. Dado que el flujo de permeado fue estable o incluso aumentó durante la diafiltración (es interesante comenzar a añadir agua cuanto antes en la diafiltración).

Finalmente, la aplicación de un producto natural, ya por sí mismo enriquecido con carotenos, tal como el zumo de clementina, se podría obtener un extracto mucho más concentrado en carotenos y de gran interés nutricional. En dicho trabajo, el contenido en caroteno fue elevado, particularmente para el β -cryptoxantin, por lo que sería adecuado para el desarrollo de nuevos productos cítricos dietéticos.

Por otro lado, el licor prensado de naranja es generado como un subproducto de la industria del procesamiento de cítricos y contiene gran cantidad de compuestos fenólicos naturales con reconocida actividad antioxidante.

Conidi et al. (2012) evaluaron el potencial del proceso de nanofiltración en la separación y concentración de compuestos fenólicos procedentes de un licor del prensado de la piel de naranja pigmentada. Estudiaron 4 tipos diferentes de membranas de nanofiltración en módulo en espiral de diferentes tamaños de corte molecular (250, 300, 400 y 1000 Da), y distintos tipos de materiales (poliamida, amida de polipiperazida y polietersulfona).

Estos autores investigaron el rechazo de las membranas de antocianinas, flavonoides y azúcares, con el objetivo de identificar la membrana más adecuada para separar los compuestos fenólicos de los azúcares. La eficiencia fue evaluada en términos de flujo de permeado y ensuciamiento.

Los resultados obtenidos indican una reducción media del rechazo de azúcares por el incremento del corte molecular de la membrana, mientras que las antocianinas alcanzaron rechazos superiores al 89% en todas las membranas investigadas. La membrana de polietersulfona NF PES10 mostró el menor rechazo medio hacia los azúcares y el mayor rechazo hacia las antocianinas (89.2%) y flavonoides (70%). Los valores de flujo de permeado a bajas presiones fueron además favorablemente altos comparados con las otras membranas.

El uso de esta membrana consiguió concentrar el licor prensado y obtener la separación de la mayoría de los azúcares en la corriente de permeado produciendo la mejor separación de los compuestos fenólicos de los azúcares. Sin embargo, el carácter hidrofóbico de la membrana de polietersulfona obtuvo el mayor índice de ensuciamiento de estas (74%).

Estudios posteriores fueron realizados por Cassano et al. (2014) sobre el licor de naranja prensado para la recuperación de flavonoides mediante un proceso de membrana integrado a escala de laboratorio. El licor previamente clarificado utilizando un módulo de membrana de fibra hueca de polisulfona (100 kDa) con un contenido en sólidos totales solubles de 10 g/100 g (10 grados brix) fue pre-concentrado hasta 32 g/100 g (32 grados brix) usando un módulo de membrana en espiral de polietersulfona. El proceso de nanofiltración obtuvo una corriente de rechazo del extracto enriquecida en

compuestos bioactivos, debido al elevado rechazo de flavonoides (97%) y antocianinas (98.9%), (Conidi et al., 2018). La última etapa de concentración hasta 47 g/100 g (47 grados brix) fue obtenida usando un equipo de destilación osmótica equipado con una membrana de fibra hueca de polipropileno.

La relación entre los flavonoides y antocianinas en la corriente de rechazo del proceso de nanofiltración se vio afectada por el factor de reducción de volumen, consecuentemente, la capacidad de amargar y poder de coloración del producto final puede ser optimizada a través de la selección específica de valores del factor de concentración de volumen (VRF).

Estos autores proponen un proceso integrado de recuperación y concentración de flavonoides procedentes del licor prensado de naranja, en base a los resultados experimentales obtenidos. En la figura 2.14 se muestra el esquema a seguir.

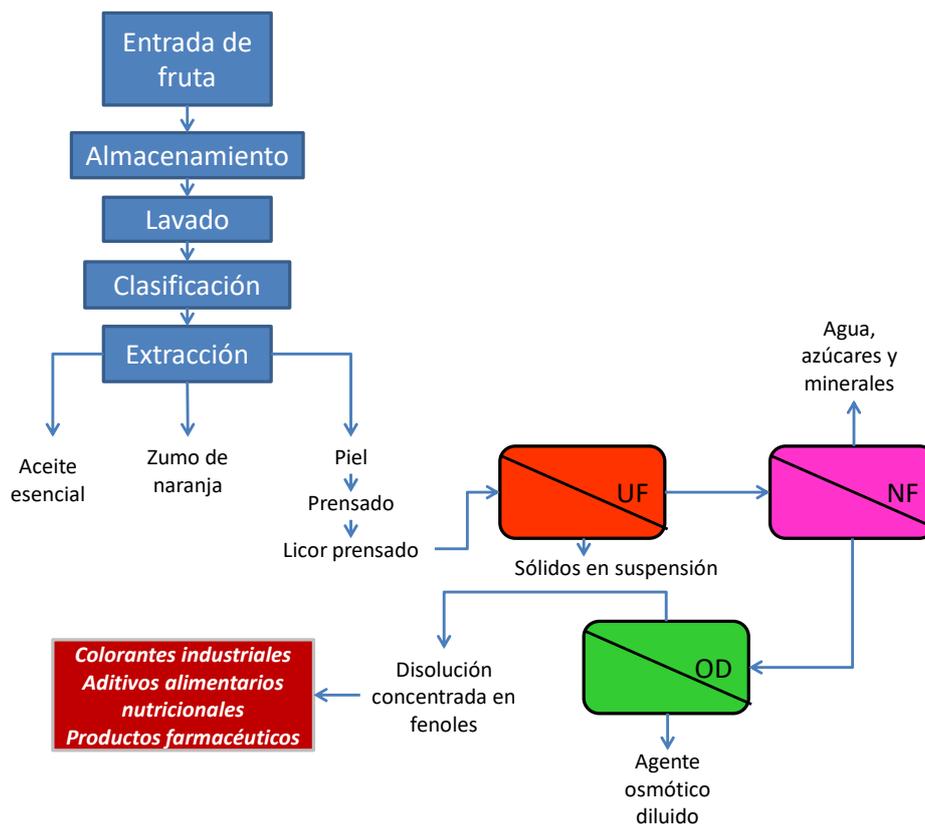


Figura 2.14. Diagrama de flujo del proceso integrado de tratamiento mediante procesos de membrana (Conidi et al., 2018).

La etapa preliminar de ultrafiltración consigue eliminar los sólidos en suspensión procedentes de la disolución de partida, obteniendo un permeado en el que la mayor parte de los flavonoides se han recuperado. Los flavonoides y las antocianinas son pre-concentradas en la etapa de nanofiltración, obteniendo una corriente de permeado compuesta fundamentalmente de azúcares y minerales. En esta etapa el rechazo de la membrana hacia los sólidos totales en disolución fue del 55%. El tratamiento final de la corriente de rechazo mediante destilación osmótica obtiene una disolución concentrada de gran interés con aplicaciones farmacéuticas y alimentarias.

Hay que indicar que los flavonoides son altamente reconocidos por sus propiedades farmacológicas (efecto favorable sobre la fragilidad capilar y el tratamiento de estados inflamatorios) debido a su actividad antioxidante. Adicionalmente, el extracto puede ser usado como colorante alimentario.

Según los estudios recogidos en la bibliografía, en los últimos años los métodos para concentrar y purificar compuestos bioactivos han llegado a generar un gran interés. Por ejemplo, la bergamota es una variedad de fruta cítrica la cual posee una fracción volátil ampliamente utilizada en cosmética y en la industria del perfume. El zumo es considerado un residuo en la producción del aceite esencial, éste contiene una amplia variedad y cantidad de flavonoides y flavonoides glicosilados que poseen importantes aplicaciones en el campo de la salud. Conidi et al. (2011) investigaron un proceso básico de membrana para la separación y concentración de polifenoles del zumo de bergamota, con el objetivo de desarrollar un producto natural enriquecido en polifenoles y adecuado para ser aplicado en nutrición.

El proceso se basó en una clarificación inicial del zumo de bergamota despectinizado mediante ultrafiltración, para eliminar los sólidos en suspensión. El zumo clarificado fue sometido a diferentes procesos de ultrafiltración y nanofiltración con el fin de evaluar el efecto del tamaño del corte molecular (MWCO) de las membranas en el rechazo de los azúcares, ácidos orgánicos y polifenoles. La eficacia de las membranas seleccionadas fue además evaluada en términos de productividad y composición de estos productos en las fracciones de permeado y rechazo.

La etapa de ultrafiltración del zumo sin pectina produjo un zumo clarificado con propiedades fisicoquímicas y nutricionales similares a las del zumo inicial tratado excepto en la ausencia de los sólidos en suspensión.

La mejor separación de los polifenoles y azúcares ocurrió usando una membrana de nanofiltración con un tamaño de corte molecular de 450 Dalton. El permeado obtenido fue una disolución clara enriquecida en azúcares y ácidos orgánicos. Los compuestos fenólicos son recuperados, por tanto, en la corriente de rechazo, por lo que confirma la alta actividad antioxidante del rechazo obtenido mediante el proceso de nanofiltración. En base a los resultados obtenidos el zumo concentrado procedente del proceso de tratamiento de UF/NF integrado puede ser considerado como una fuente de compuestos bioactivos, especialmente en términos de polifenoles, los cuales poseen una aplicación potencial en la industria farmacéutica debido al reciente descubrimiento de los principios activos identificados en el zumo de bergamota y su potencial para combatir el colesterol.

A modo de esquema se adjunta en el anexo I el póster presentado al I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias organizado por la Universidad de Almería.

2.5. Estudios de vida útil en zumos y concentrados

Los estudios de vida útil (EVU), se empezaron a realizar como control de seguridad alimentario, con el objetivo de ver cómo cambiaban los atributos del producto estudiado a lo largo del tiempo. En base a los cambios producidos se determina la vida útil del producto en base a dos razones: calidad y seguridad. El más importante y limitante es la seguridad alimentaria, dado que no se puede dar una fecha de caducidad superior, si se conoce de antemano que a partir de una fecha determinada un parámetro de control como el microbiológico, no es acorde. Además, el número de incidencias asociadas a intoxicaciones que estén asociadas al consumo de alimentos de origen vegetal debe ser una alerta para garantizar la seguridad de los productos que consumimos a diario (Berger et al., 2010; Braden y Tauxe 2013; Lynch et al., 2009), teniendo especial atención a los microorganismos patógenos o alterantes. Respecto a la calidad sensorial, los sentidos juegan un papel importante para determinar hasta cuándo se puede extender la fecha de consumo preferente. Aunque a la hora de comprar un producto, el usuario se fije en la vista, la fidelidad a la marca o producto vendrá por el gusto y olfato, por lo que establecer un periodo de vida acorde a una evolución de las propiedades organolépticas es una tarea muy importante antes de lanzar un nuevo producto al mercado.

2.5.1. Estudios de vida útil en zumos clarificados

Generalmente, los estudios de vida útil en zumos clarificados pretenden simular las condiciones de almacenamiento de los concentrados o zumos, comparando entre el producto refrigerado y congelado. Normalmente se reproducen las condiciones más desfavorables para determinar así el mínimo de tiempo que el producto está en óptimas condiciones de comercialización.

Los ensayos están orientados en obtener un tiempo determinado a partir del cual el producto sea seguro microbiológicamente y además que sea organolépticamente estable. Por otro lado, los zumos y concentrados se utilizan como ingredientes en otras formulaciones tanto en bebidas como alimentos, incluyendo los alimentos funcionales o probióticos. Es por esta razón que debe existir una calidad microbiológica óptima (Grande et al., 2015) sin contar las posibles consecuencias económicas por pérdidas de reputación y monetarias. El control exhaustivo de los microorganismos en las diferentes etapas del procesado y almacenamiento es un reto importante para las industrias que se dedican al sector alimentario.

Dentro de la industria de zumos y concentrados, la medida del color es de gran utilidad ya que es un método rápido y no destructivo. Un ejemplo ocurre en Estados Unidos, donde uno de los parámetros para evaluar la calidad de los zumos es el color. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) asigna 40 puntos a una escala de color, para la clasificación comercial del zumo de naranja. Así, un zumo de nivel A (Premium) debe tener una puntuación de color entre 36 y 40 puntos, mientras un zumo de nivel B tendrá una puntuación de entre 32 y 35 (Lee, 2001; Stewart, 1977). Es por ello, que el color es un buen parámetro de medida de la estabilidad del producto a lo largo del tiempo. Para determinar esta se mide se utiliza el porcentaje de transmitancia y la absorbancia.

En los cítricos clarificados lo que limita su vida útil no son los parámetros microbiológicos que sí son capaces de mantenerse en el tiempo si no la degradación del color. Una posible degradación del color durante el proceso puede ser en la etapa de concentración o en la pasteurización. Los tratamientos térmicos han sido básicos en la conservación de los zumos, pero tienen una gran influencia en el zumo, tanto por provocar un deterioro de las propiedades nutricionales y organolépticas, algunos ejemplos son la pérdida de vitamina C y proteínas, degradación del color, textura, entre

otros (Choi y Nielsen 2005; Jiao et al., 2004). En cuanto al causante de los cambios de color durante el almacenamiento destaca las reacciones de Maillard.

De todas las alteraciones que pueden provocar un deterioro del zumo, el pardeamiento es el problema más importante que presentan muchos concentrados de zumos de fruta (Toribio y Lozano, 1984). Estas reacciones, engloban una serie de reacciones complejas que originan compuestos oscuros, modificando el olor y sabor del zumo. Este fenómeno se presenta como caramelización, oxidaciones de ácido ascórbico y las denominadas reacciones de Maillard, que originan la formación de melanoidinas, que son compuestos oscuros causantes del pardeamiento (Hodge, 1953; Cornwell y Wrolstad, 1981). Además, altas temperaturas en la concentración favorecen el oscurecimiento del producto, dependiendo de los grados brix que se deseen alcanzar (Beveridge y Harrison, 1984). Hay que tener en cuenta que el ácido ascórbico se oxida con facilidad en aire, por ello su concentración disminuye a lo largo de la vida del producto.

Las reacciones de Maillard engloban todas las reacciones entre los azúcares reductores y grupos amino libres (Mazo et al., 1989a,b). Para los zumos, los componentes que mayoritariamente se ven involucrados en el pardeamiento son los azúcares reductores, los aminoácidos, los polifenoles y los ácidos orgánicos (Babsky et al., 1986). Entre los zumos clarificados, es el de limón el que es más sensible a la temperatura, especialmente en lo que respecta al deterioro de color. Generalmente, las industrias cítricas que elaboran zumos clarificados de limón obtienen concentrados de 400 y 500 GPL (gramos por litro de ácido cítrico) y debido a su sensibilidad al pardeamiento, se almacenan a aproximadamente 4 °C con un tratamiento con sulfito. Debido a la problemática de este tipo de tratamiento antioxidante, se han cambiado las condiciones de almacenamiento, y para evitar el sulfitado, dicho almacenamiento se lleva a cabo bajo temperaturas de congelación (Martínez et al., 2010). Estas bajas temperaturas de almacenamiento evitan el deterioro debido a los pardeamientos no enzimáticos. Sin embargo, en el proceso de elaboración del zumo concentrado, en la etapa de concentración por evaporación, el zumo se halla sometido a altas temperaturas que afectan de un modo negativo al zumo, desde el punto de vista del color. Por ello, en el presente trabajo se estudia el efecto de la pasteurización frente a un producto no tratado para estudiar la evolución del color a lo largo de su almacenamiento.

2.5.2. Valoración organoléptica en estudios de vida útil de zumos y concentrados

La valoración organoléptica es fundamental ya que el consumidor final, cada vez es más exigente, es el juez que decidirá si sigue comprando esa referencia o escoge a la competencia. Esta valoración, permite percibir, identificar y apreciar, mediante los órganos de los sentidos, cierto número de propiedades organolépticas en los alimentos. Los ensayos más simples consisten en pruebas sensoriales por discriminación: prueba de triángulo, prueba dúo-trío y comparación pareada. La naturaleza de estos exámenes radica en encontrar cual es la muestra diferente y un tratamiento estadístico posterior de frecuencias y proporciones de los resultados obtenidos (Inungaray y Reyes, 2013).

Para poder realizar una correcta valoración organoléptica en los estudios de vida útil se debe prestar especial atención a:

- ✚ Experiencia de los catadores
- ✚ Ubicación y condiciones de la sala de catas
- ✚ Preparación de las muestras
- ✚ Valoración del producto

La **experiencia de los catadores** es muy importante debido a que son ellos de los que dependerá una valoración correcta del producto y el establecimiento a partir de una fecha la cual el producto no es atractivo para el consumidor. Por consiguiente, los catadores deben conocer perfectamente el producto, tener habilidades en valoración organoléptica y estar formados en análisis sensorial. Además, es apropiado que se les informe sobre el objetivo de la cata. El perfil idóneo para estos análisis es el de analista de calidad o responsable de calidad, ya que conocen bien los productos y están entrenados en la realización de valoraciones organolépticas a diario. El catador debe encontrarse en perfectas condiciones de salud, no se debe comer, beber o fumar previo a la cata y se tiene que evitar utilizar cosméticos o perfumes.

La **ubicación** de la zona delimitada para la valoración organoléptica debe estar cercana a la preparación de las muestras, pero no en la misma sala para evitar contaminación de aromas. La sala tiene que contener mobiliario, iluminación y colores neutros, preferiblemente blanco. No tiene que ser zona de paso de personas ni con excesivos ruidos para conseguir que haya la suficiente concentración para el “examen”

organoléptico que se está realizando. Una temperatura óptima, en las diferentes épocas del año también ayuda a prestar la máxima atención al producto que se está degustando.

Las **muestras** objeto de estudio deben ser valoradas en las mismas condiciones, de volumen, mismo tipo de recipiente y temperatura para no condicionar la valoración del experto. Ya que, por ejemplo, no se aprecian los defectos de igual manera en una bebida fría que en una caliente. De igual modo, muestras de diferentes volúmenes o recipiente pueden inducir al error en la percepción del color o textura.

La **valoración global** se medirá con las puntuaciones de al menos 5 catadores, realizando una media como se presenta en la tabla 2.7, donde se hayan valorado separadamente aspectos genéricos de color, olor, sabor e impresión general junto con las variables seleccionadas que hayan sido objeto de estudio, como puede ser parámetros microbiológicos o fisicoquímicos. Los catadores deben puntuar del 1 al 4. Además, en el examen de aceptación los catadores deben indicar con un SI o un NO a la pregunta de si consumirían el producto en ese estado.

Tabla 2.7. Ejemplo de tabla de valoración organoléptica con los datos obtenidos de diferentes catadores.

Parámetros	Días de estudio								
	0	30	60	90	180	270	360	540	720
Aspecto	4	4	4	4	4	3	3	3	3
Color	4	3	3	3	3	2	2	2	2
Olor	4	4	4	4	3	3	3	3	3
Sabor	4	4	4	4	4	3	3	2	2
Impresión General	4	4	4	4	3	3	3	2	2

Para la realización de una correcta valoración organoléptica es necesario seguir el siguiente orden: color, aromas, sabor y textura. En primer lugar, se hará una inspección visual del producto a valorar, haciendo hincapié en tonalidad, brillo, grado de transparencia entre otros atributos. Seguidamente, se procede con la identificación

de los aromas primarios y secundarios con una leve agitación del recipiente. En casos donde se tenga que valorar diferentes muestras, es aconsejable disponer de granos de café para despejar la nariz y poder así, captar mejor los aromas. Por último, para el análisis del sabor y la textura se realiza una degustación del producto atendiendo a la figura 2.15 donde se muestra el mapa de sabores que tenemos en la lengua para describir el producto.

Por otro lado, en estos últimos tiempos, otro aspecto importante que preocupa al consumidor son las propiedades bioactivas que puedan estar presentes en los zumos y preparados.

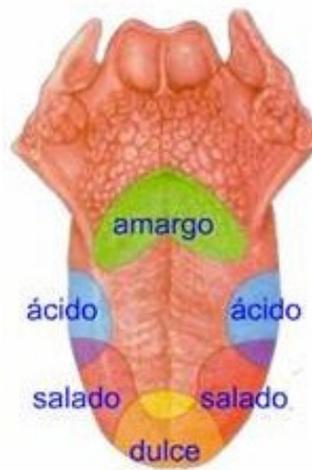


Figura 2.15. Mapa de sabores presentes en la lengua.

2.6. Propiedades bioactivas de los extractos y su papel en la prevención de la obesidad

La obesidad ha aumentado considerablemente durante las últimas décadas hasta alcanzar niveles que suponen un problema tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. De hecho, la obesidad y sus enfermedades derivadas podría convertirse en el problema de salud más común del siglo XXI. En 2016, Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 1900 millones de adultos tenían sobrepeso y 650 millones eran obesos, lo que corresponde al 39% y 13% de la población adulta mundial, respectivamente.

En Europa, la prevalencia de la obesidad en los hombres oscila entre el 4.0% y el 28.3% y en las mujeres entre el 6.2% y el 36.5% con una variación geográfica considerable. Las tasas de prevalencia en Europa central, oriental y meridional son más

altas que en Europa occidental y septentrional (Berghoefer et al., 2008). Si persisten las tendencias observadas, para 2030 el número absoluto de personas obesas podría llegar a un total de 1120 millones, alcanzando el 20% de la población adulta del mundo (Kelly et al., 2008).

El sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede afectar la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió que el sobrepeso tiene un índice de masa corporal $> 25 \text{ kg / m}^2$, mientras que la obesidad comienza con $\geq 30 \text{ kg / m}^2$. El índice de masa corporal (IMC) es un índice simple de peso para la talla que se usa comúnmente para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. La prevalencia de la obesidad está aumentando y su importancia para la salud pública es considerable porque está asociada con un mayor riesgo de diabetes tipo 2, enfermedad coronaria, ciertos tipos de cáncer (Allison et al., 1999) y una esperanza de vida más corta.

Se cree que la obesidad es un trastorno multifactorial. Si bien los factores genéticos pueden predisponer al sobrepeso y la obesidad, existen dos razones principales: la reducción de la actividad física y el aumento de la ingesta de energía, principalmente a partir de alimentos ricos en grasas y ricos en energía (azúcares). En la ecuación del balance de energía, la ingesta de energía es probablemente mucho más sensible a los cambios en la dieta que el gasto de energía (Prentice et al., 1989; Stubbs, 1999). Sin embargo, los mecanismos involucrados en la regulación de la ingesta de alimentos son complejos e implican varios mecanismos diferentes, que involucran factores internos y externos. Algunos de ellos están relacionados con macronutrientes, como, por ejemplo, mecanismos glucostáticos y lipostáticos y otros están relacionados con hormonas y señales aferentes, como la insulina, el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) y la leptina, entre otros. Además, el mantenimiento del peso corporal requiere un manejo multifactorial porque muchos mecanismos complejos están involucrados en esta regulación (regulación de la ingesta de alimentos, homeostasis energética, etc.).

Hoy en día, la mayoría de las dietas con pérdida de peso fallan, principalmente debido a la sensación de hambre, por lo que mejorar la saciedad podría ser una herramienta expectante para ayudar a disminuir la ingesta de alimentos y, por lo tanto, prevenir y tratar la obesidad y el sobrepeso. Ciertos ingredientes son capaces de inducir la saciedad y pueden considerarse agentes funcionales. Estos podrían producir una

disminución del apetito y la ingesta de alimentos que conduce a un balance energético negativo y control de la obesidad.

Existe una extensa literatura sobre la capacidad de macronutrientes saciantes. Numerosos estudios han determinado y evaluado su capacidad de saciedad para formular nuevos alimentos saciantes que puedan reclamar y ayudar en la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad. Con respecto a estas afirmaciones sobre la saciedad, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) exige nuevos ingredientes basados en investigaciones científicas que muestren cambios sostenibles en el apetito y reducciones en la ingesta de alimentos que se mantienen durante mucho tiempo. En 2006, la Comisión Europea adoptó el reglamento 1924/2006 sobre el uso de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en alimentos y bebidas no alcohólicas. Las reclamaciones se basaron en los perfiles nutricionales de los productos, armonizando el uso de las declaraciones nutricionales, asegurando de manera crítica que cualquier afirmación se demuestre mediante evidencia científica (Reglamento CE Nº 1924/2006).

La fibra es un macronutriente complejo y variado con una amplia gama de polisacáridos que no contienen almidón (carbohidratos) y lignina (un derivado de alcohol sin carbohidratos), que son solubles o insolubles y fermentables o no fermentables (Burton-Freeman, 1997). La fibra dietética consiste en carbohidratos no digeribles y lignina. Sin embargo, la fibra funcional consiste en hidratos de carbono aislados y no digeribles que tienen efectos fisiológicos beneficiosos en los seres humanos. La fibra total es la suma de la fibra dietética y la fibra funcional.

El mecanismo de los carbohidratos que inhibe el apetito es muy complejo y no se entiende completamente, pero es probable que sea multifactorial. De hecho, las fibras producen varios mecanismos que respaldan el control del apetito (Wanders et al., 2011), por ejemplo, el papel de la hiperglucemia como un factor postabsortivo involucrado en el apetito, el efecto del aumento de volumen de la fibra en el estómago (retraso del vaciado gástrico), baja densidad energética de fibras o señalización preabsorción del tracto digestivo después de una comida con carbohidratos.

Uno de los mecanismos más importantes por los cuales los carbohidratos regulan la ingesta de alimentos y la saciedad es su efecto sobre la glucosa en la sangre. Jenkins et al. (2002) utilizaron el término "índice glicémico" para definir la calidad de los carbohidratos. El índice glicémico (IG) de cada alimento se define como la capacidad de

ese alimento para aumentar la glucosa en sangre dos horas después de comerlo (Niwano et al., 2009). Originalmente, se expresó como un porcentaje del área bajo una curva de glucosa en sangre de dos horas atribuible al alimento de interés dividido por el de la misma cantidad de carbohidratos estándar, como la glucosa. Se supone que un alimento con un IG más alto da como resultado una respuesta glucémica alta, que induce varios cambios hormonales y metabólicos que pueden afectar negativamente las condiciones de salud. Los alimentos con respuestas glucémicas bajas generalmente deberían inducir beneficios importantes (Aston, 2006; Jenkins et al., 2002).

El concepto de que la glucosa regula la saciedad y la ingesta de alimentos es la base de la teoría glucostática de la regulación de la ingesta de alimentos, que propone que las concentraciones más bajas de glucosa en la sangre se relacionen estrechamente con la ingesta de alimentos. Por el contrario, la saciedad y la interrupción de la comida se producirán después de un aumento de la glucosa en sangre (Mayer, 1955).

En cuanto al papel del índice glicémico como predictor del control del apetito, el hambre y la saciedad, es muy controvertido. Se ha informado una relación inversa entre la respuesta glucémica a las comidas mixtas y la saciedad en 2 a 6 horas (Woodend y Anderson, 2001). Pero las asociaciones entre la saciedad, los alimentos de alto y bajo índice glicémico y las concentraciones de glucosa en la sangre no se han delineado. Por lo tanto, el rápido aumento de la glucosa en sangre después de la ingesta de carbohidratos de alto índice glicémico (digestibles rápidamente) puede aumentar la saciedad, al menos a corto plazo. Por el contrario, el consumo de carbohidratos de bajo índice glicémico (digeridos lentamente) resulta en una eliminación lenta y prolongada de la glucosa, lo que puede ser más efectivo para mantener la saciedad a largo plazo.

La ingestión de alimentos con alto índice glicémico aumentó el hambre y disminuyó la saciedad en los estudios de intervención a corto plazo en humanos. Este efecto a corto plazo puede atribuirse a la rápida disminución del nivel de glucosa en sangre después de una respuesta hiperinsulinémica (teoría glucostática), ya que el efecto a largo plazo es inconsistente (Niwano et al., 2009). Es difícil usar el índice glicémico como un predictor del control del apetito, el hambre y la saciedad a largo plazo, porque existe una gran variación en los valores del índice glicémico, principalmente debido a la variación inter e intraindividual. Se requieren estudios confiables in vivo, ex vivo, incluso in vitro para predecir la tasa de entrada de glucosa de

los alimentos al cuerpo para aclarar la relación entre el índice glicémico y la saciedad a largo plazo (Niwano et al., 2009).

Como ejemplo de alimentos con propiedades bioactivas, en la bibliografía, se ha encontrado descrito el consumo de preparados de remolacha roja, soja y puré de mango (Chang et al., 2018; Serrano et al., 2017; Elizondo-Montemayor et al., 2015).

El consumo de remolacha roja está asociado a un gran número de beneficios saludables. Las propiedades antidiabéticas han sido sugeridas en la bibliografía, aunque todavía se evidencian, pues los estudios in vivo e in vitro son muy limitados. Un reciente estudio elaborado por Chang et al. (2018) ha indicado una moderada reducción de la glucosa postprandial y la respuesta de la insulina siguiendo el consumo de zumo enriquecido con remolacha. La reducción de ambos, glucosa e insulina, fue considerada como beneficiosa con respecto al riesgo de la diabetes tipo 2. El objetivo de este estudio fue investigar el efecto acontecido del consumo de zumo de remolacha en combinación con carbohidratos sobre la respuesta glucémica en humanos. En el estudio participaron 10 voluntarios (1 hombre y 9 mujeres) (Chang et al., 2018).

Por otro, la soja es reconocida como una fuente de compuestos bioactivos en la mejora de la homeostasis de la glucosa. Sin embargo, el mecanismo postprandial de acción no ha sido descrito. El objetivo del estudio de Serrano et al. (2017) fue determinar los cambios de la homeostasis de la glucosa y los factores relacionados después de tomar una bebida de soja. La muestra formada por 29 sujetos (15 mujeres y 14 hombres) de una media de edad 19.5 ± 1.2 ingirieron 50 mL de agua, glucosa (20.5 g/500 mL) y bebida de soja (20 g de carbohidratos) en tres sesiones separadas. La glucosa postprandial en sangre (medida de forma capilar) fue monitorizada cada 15 minutos hasta 120 minutos, y las muestras de sangre fueron recogidas para su análisis como línea base después de 60 minutos, para insulina, incretina, aminoácidos libres, capacidad antioxidante y marcadores inflamatorios.

El incremento de la glucosa (medida capilar) después de la medida fue despreciable. Esto es explicado en parte por un incremento del 83% en los niveles de insulina. Según los autores, con estos resultados pueden concluir que una respuesta baja glucémica de la soja puede ser debida a la relación entre la incretina (hormona efecto saciante) y la segregación de insulina (Serrano et al., 2017).

Por todo ello, se recomienda el consumo diario de frutas en una dieta saludable, sin embargo, salud y diabetes tipo 2 en sujetos, recibe mensajes conflictivos respecto a la ingestión de frutas, tales como mango, debido a su contenido en azúcar.

Elizondo-Montemayor et al. (2015) investigaron el efecto de la elevada presión hidrostática en el procesado del puré de mango fresco, sobre los índices glicémicos y la respuesta postprandial de 38 individuos mexicanos saludables, en un trial clínico randomizado. La caracterización fisicoquímica del puré de mango incluye la caracterización del perfil de azúcares mediante HPLC, almidón, fibra, humedad, viscosidad, capacidad inflamatoria y solubilidad como propiedades. La media de índice glicémico para el puré de mango a través de la elevada presión hidrostática fue menor 32.7 ± 13.4 respecto al no procesado 42.7 ± 19.5 . Una proporción mayor de sujetos de forma significativa mostraron un menor índice glicémico después del consumo de mango procesado comparando con el no procesado (Elizondo-Montemayor et al., 2015).

En las últimas décadas, los estudios realizados han puesto de manifiesto el efecto saciante de la fibra cuando esta se incorpora a zumos y preparados, además se ha demostrado que una dieta con mayor contenido en fibra está asociada a la reducción del riesgo cardiovascular, aunque de momento no es clara la respuesta postprandial respecto a la glucosa y la insulina (Dong et al., 2016).

En el estudio llevado a cabo por Dong et al. (2016), donde el objetivo fue evaluar el efecto de bebidas de naranja con diferentes concentraciones de fibra sobre la repuesta glucémica postprandial, encontraron que el puré de fibra de naranja consumido con el desayuno puede disminuir la repuesta de la glucemia postprandial y la insulina en la ingestión de comida típica en hombres con incremento del riesgo cardiometabólico (Dong et al., 2016).

Además, el puré de naranja, un subproducto de la producción de zumo, rico en fibra, posee un gran potencial para desarrollar nuevas formulaciones dentro de una amplia variedad de productos alimentarios.

Por otro lado, Chen et al. (2017) realizaron la hipótesis de que el puré de naranja podría disminuir la respuesta glucémica postprandial de desayunos y comidas con alta relación carbohidratos/grasa. Estos autores llevaron a cabo un estudio con 34 sujetos los cuales consumieron junto con 255 g placebo, un zumo con bajo (35%) y otro con un alto (77%) contenido en fibra. Demostraron que el puré de naranja disminuyó la

repuesta postprandial para la relación alta carbohidratos/grasa del desayuno y en la segunda comida en hombres con sobrepeso (Chen et al., 2017).

La ingesta de comida posee una gran influencia en la glucosa en sangre en pacientes con diabetes. Shao et al. (2017) determinaron el índice glicémico y la carga glucémica de una variedad de pomelo denominado "*Majia*" y sus efectos sobre la glucosa postprandial en pacientes con diabetes tipo 2. Estos autores encontraron que el consumo de pomelo (*Majia*) en los pacientes diabéticos no causó una fluctuación significativa en la glucosa. Por lo que se pudo concluir que aunque el pomelo posea un índice glicémico alto puede servir como una fruta con baja carga glucémica, si este es consumido de forma limitada en la dieta y por lo tanto puede ser un suplemento en pacientes diabéticos (Shao et al., 2017).

Las bebidas del desayuno con diferentes composiciones nutricionales pueden afectar de forma diferente al control de la glucemia postprandial. Li et al. (2017) encontraron que el pico de glucosa fue mayor en el café frente al agua y al zumo de naranja y leche desnatada. El pico de insulina fue mayor en el café y la leche frente al zumo de naranja y el agua.

En conclusión, el consumo de agua, zumo de naranja de baja energía, o leche desnatada con la comida puede ser preferible respecto al café con azúcar o la glucosa control en adultos de media edad con sobrepeso y obesos (Li et al., 2017).

De Pavia et al. (2019) estudiaron el impacto del zumo de naranja fresco y el zumo de naranja procesado sobre la glucosa y la insulina en la sangre. La ingesta prospectiva de comida y el efecto a corto plazo antioxidante fue medido en una muestra de 36 sujetos hombres y mujeres adultos normales y obesos. En los individuos normales la glucosa en sangre fue 11% menor, con el zumo fresco, y 5% menor respecto al procesado, sin embargo, en los individuos obesos la glucosa en sangre cae un 13% después de los 60 minutos con el zumo procesado y fresco respecto al patrón control (De Pavia et al., 2019).

Por otro lado, en el estudio realizado por Panahi et al. (2013), donde el objetivo del trabajo fue comparar el efecto del consumo, antes de la comida, de una familia de bebidas sobre el apetito, ingesta de comida y respuesta glucémica, en la salud de jóvenes adultos (20-30 años). Estos autores realizaron dos experimentos a tiempos cortos comparando el efecto del consumo a 30 minutos y a 120 minutos, antes de comer

pizza, de una cantidad igual (volumen de 500 mL) de agua (0 kcal), bebida de soja (200 kcal), 2% de leche (260 kcal), 1% leche con chocolate (340 kcal), zumo de naranja (229 kcal) y leche con cereales basada en una fórmula infantil (368 kcal), sobre el consumo de comida, el apetito (subjetivo) y glucosa en sangre, antes y después de la comida.

La ingestión anterior a la comida de leche con chocolate y la fórmula infantil reduce la ingesta de comida comparada con el agua, a los 30 minutos. Sin embargo, las bebidas tipo no afectan a la ingesta a las 2 horas.

La glucosa en sangre antes de la comida fue mayor después de la leche con chocolate que en las otras bebidas calóricas (de 0 a 30 minutos, experimento 1), y después (de 0 a 120 minutos, experimento 2) en la leche con chocolate y zumo de naranja. Solo la leche redujo la glucosa en sangre después de la comida en ambos experimentos, sugiriendo que estos efectos fueron independientes de carga energética y la hora.

Comparando la glucosa en sangre, previa y posterior a la comida estos autores encontraron que fue menor en la leche, comparada con la leche y chocolate y el zumo de naranja, pero no fue diferente a otras bebidas. Por lo tanto, el contenido calórico y los intervalos entre la comida son inicialmente determinantes sobre el consumo de comida en términos cortos, pero la composición de los macronutrientes, especialmente el contenido en proteína y la composición, puede jugar un papel principal sobre el control glucémico.

Por todo ello, para comprender las propiedades bioactivas de los zumos y preparados es importante la realización de ensayos con individuos en las que se mida el comportamiento del índice glucémico después de la ingesta de estos zumos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS



3. Materiales y métodos

En el presente capítulo, se detallan los reactivos y equipos utilizados. Además, se incluyen los métodos operativos y analíticos que se han llevado a cabo en los diferentes ensayos desarrollados.

3.1. Materiales y reactivos

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

3.1.1. Membranas

Contenido totalmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

3.1.2. Reactivos

Para los ensayos realizados se han utilizado los siguientes reactivos:

- ✚ 2-Propanol technical grade (C_3H_8O , N° CAS: 67-63-0), de peso molecular 60.10 g/mol, suministrado por Panreac
- ✚ Acetonitrilo (CH_3CN , N° CAS: 75-05-8), de peso molecular 41.05 g/mol, HPLC Gradient Grade, suministrado por Chem-lab
- ✚ Agua HPLC (H_2O , N° CAS: 7732-18-5), de peso molecular 18.01 g/mol, HPLC Gradient Grade, suministrado por J.T. Baker
- ✚ D(-)-Fructosa ($C_6H_{12}O_6$, N° CAS: 57-48-7), de peso molecular 180.16 g/mol, suministrado por Merck KGaA
- ✚ D(+)-Glucosa ($C_6H_{12}O_6$, N° CAS: 50-99-7), de peso molecular 180.16 g/mol, suministrado por Merck KGaA
- ✚ D-Sorbitol ($C_6H_{14}O_6$, N° CAS: 50-70-4), de peso molecular 182.17 g/mol, suministrado por Ehrenstorfer
- ✚ Eriocitrina ($C_{27}H_{32}O_{15}$, N° CAS: 13463-28-0), de peso molecular 596.54 g/mol, suministrado por Extrasynthese
- ✚ Formaldehído al 37-38% w/w estabilizado con metanol (CH_2O , N° CAS: 50-00-0), de peso molecular 30.03 g/mol, suministrado por Panreac
- ✚ Hesperidina ($C_{28}H_{34}O_{15}$, N° CAS: 520-26-3), de peso molecular 610.19 g/mol, suministrado por Extrasynthese
- ✚ Hidróxido sódico de 0.1 mol/l ($NaOH$, N° CAS: 1310-73-2), de 40 g/mol, suministrado por Panreac
- ✚ Iodina 0.05 mol/l (I_2 , N° CAS: 7553-56-2) de peso molecular 253.81 g/mol, suministrado por Panrec
- ✚ Limonina ($C_{26}H_{30}O_8$, N° CAS: 1180-71-8), de peso molecular 470.52 g/mol, suministrado por Sigma-Aldrich
- ✚ Maltosa monohidrato ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot H_2O$, N° CAS: 6363-53-7), de peso molecular 360.32 g/mol, suministrado por Merck KGaA
- ✚ Patrones de pH (4.01; 7.00; 9.21), suministrados por la firma Hach

- ✚ Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$, N° CAS: 57-50-1), de peso molecular 342.29 g/mol, suministrado por Merck KGaA
- ✚ Disolución de almidón al 1% ($C_6H_{10}O_5$, N° CAS: 9005-84-9), de peso molecular 162.14 g/mol, suministrado por Panreac
- ✚ Disolución de fenolftaleína al 1% ($C_{20}H_{14}O_{14}$), de peso molecular 318.33 g/mol, suministrada por Panreac
- ✚ Disolución patrón de potasio de 1 g/L suministrado por Scharlab S.L.
- ✚ Disolución patrón de sodio de 1 g/L suministrado por Merck KGaA
- ✚ Trietilamina 99.5% ($C_6H_{15}N$, N° CAS: 121-44-8), de peso molecular 101.19 g/mol, suministrado por Panreac

3.1.3. Otros materiales

Otros materiales que se han utilizado como material de laboratorio: cubetas de plástico de 3 mL de capacidad y un paso óptico de 1 cm, probetas de diferentes tamaños para medir volúmenes de permeado y rechazo, matraces para la preparación de las distintas disoluciones, tubos de ensayo para posterior medida de la absorbancia, vasos de precipitados para diferentes medidas de acidez, matraz Erlenmeyer para diferentes valoraciones, tubos de centrifuga, pipetas de vidrio, pipetas Pasteur, viales, jeringuillas y lancetas desechables estériles.

3.2. Equipos

En este trabajo de investigación se han utilizado diferentes equipos para la realización de los ensayos, todos ellos relacionados con la filtración mediante membranas. Estos equipos son modulares y con posible aplicación en otros ámbitos distintos al sector de bebidas y zumos, como aguas residuales, separación y purificación de compuestos, entre otros.

3.2.1 Planta piloto de filtración tangencial

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Para clarificar el *peel extract* se ha utilizado una planta piloto de filtración tangencial. Esta planta piloto es para la filtración de zumos, pectinas, caldos vegetales y aguas residuales.

La unidad tiene una capacidad de 500 litros y tiene los siguientes componentes que se pueden observar en la figura 3.1 y se detallan a continuación:

- ✚ Bancada realizada en acero inoxidable AISI304 altura regulable para la instalación completa de la unidad de filtración
- ✚ Tuberías de acero inoxidable AISI304 y que siguen la norma DIN 11850, superficie mate
- ✚ Válvulas de mariposa fabricadas en acero inoxidable AISI304
- ✚ Bomba de alimentación, bomba centrífuga de acero inoxidable AISI 316L, con motor 1.1 kW
- ✚ Filtro de acero inoxidable AISI304 para evitar el paso de partículas y cuerpos extraños
- ✚ Manómetro
- ✚ Indicador de temperatura 0-120 °C
- ✚ Caudalímetro inductivo magnético realizado en acero inoxidable con pantalla
- ✚ Línea de recogida de permeado consistente en una válvula para la regulación del flujo manual, realizada en acero inoxidable AISI304 con caudalímetro
- ✚ Tanque de alimentación realizado en acero inoxidable AISI304 de 500 litros de capacidad

3.2.2. Módulo de membranas *Triple System model F1*

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Los ensayos llevados a cabo para la optimización del permeado obtenido a través de la filtración tangencial, se han llevado a cabo en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Murcia, en el laboratorio situado en el edificio Rector Soler, donde los ensayos se han realizado con el módulo de membranas *Triple System Model F1*, de la casa comercial MMS que se presenta en la figura 3.2.



Figura 3.2. Imagen del módulo *Triple System Model F1*.

Este equipo consta de las siguientes partes:

- ✚ Tanque de alimentación
- ✚ Bomba de impulsión
- ✚ Módulo de membranas planas compuesto por 3 membranas en serie
- ✚ Bala de nitrógeno
- ✚ Criostato
- ✚ Válvula de tres vías

En la figura 3.3 se muestra el software utilizado para el control del proceso, donde se indica las diferentes presiones en cada punto, el área total de las membranas, la cantidad de producto que dispone el tanque de alimentación, presión transmembrana y la temperatura con la que el producto entra a la membrana.

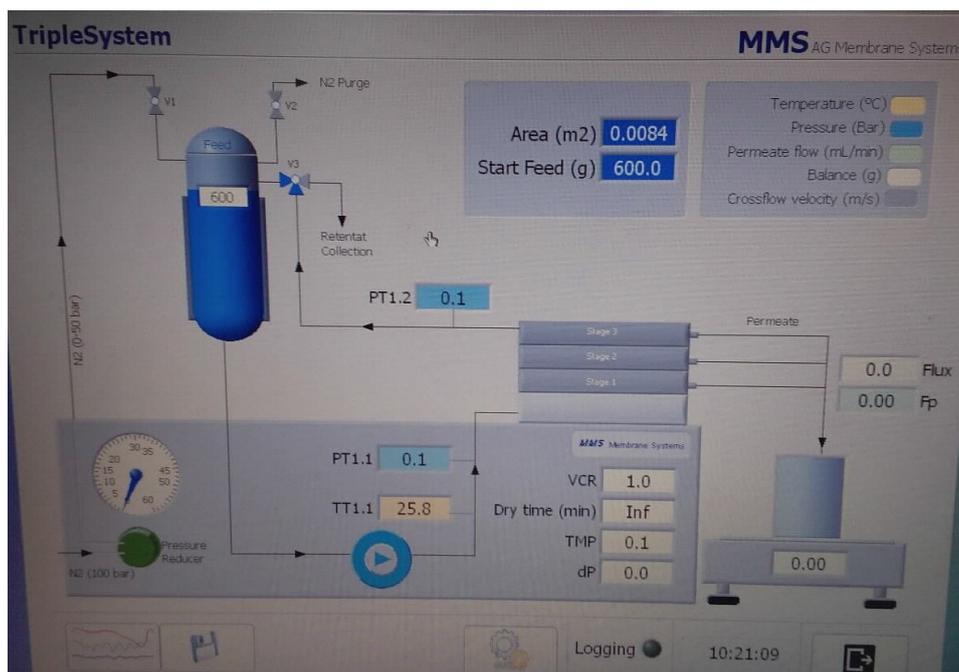


Figura 3.3. Software utilizado para el equipo MMS *Triple System*.

3.2.3. Planta de nanofiltración

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

La separación de los azúcares disacáridos de los monosacáridos, se ha llevado a cabo en un equipo similar al que se muestra en el apartado 3.2.1 pero con diferentes dimensiones y características, tales como la capacidad del tanque que en este caso es algo inferior, siendo de 300 litros, pero con posibilidad de calentar el producto mediante una camisa de vapor, algo útil cuando se dispone de materia prima congelada o se quiere mantener constante la temperatura.

3.2.4. Otros equipos

Además de los equipos de filtración utilizados, se ha dispuesto de diferentes equipos para la realización o como soporte en los ensayos y parametrización de las corrientes obtenidas. Estos equipos se muestran en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Equipos utilizados en los ensayos.

Equipo	Modelo	Medida
Refractómetro	Atago RX5000 α -BEV	Grados brix
pH-metro	Hach Sension	pH
Valorador automático	Metrohm 916 Ti-Touch	Acidez, índice de formol
Espectrofotómetro	Thermo scientific Genesys 10	Transmitancia, absorbancia
Fotómetro de llama	Jenway pfp7	Sodio, potasio
Turbidímetro	Hach 2100AN	Turbidez NTU
Centrífuga	Hettich rotofix 3	Contenido en pulpa
HPLC	Merck LaChrom	Azúcares
HPLC	Agilent 1100 Series	Limonina, eriocitrina, hesperidina
Ultrasonidos	Sonitech	
Balanza de laboratorio	Radwag FS 4500	Masa
Balanza de precisión	Sartorius CP/245	Masa
Balanza	Omrom BF-508	Masa
Congelador	Beko	-
Frigorífico	Beko	-
Glucómetro	Contour® RT	Glucosa en sangre
Tallímetro de columna seca	-	Altura
Pasteurizador de laboratorio	Inoxpaser	-

3.3. Métodos

3.3.1. Métodos analíticos

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Los métodos analíticos utilizados en la caracterización fisicoquímica de las diferentes muestras se recopilan en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Resumen de las diferentes determinaciones fisicoquímicas utilizadas en el desarrollo experimental.

Métodos	Determinaciones analíticas
M-I	Determinación de los grados brix en zumos
M-II	Determinación del contenido en sodio y potasio
M-III	Determinación del pH
M-IV	Determinación del contenido en vitamina C (ácido ascórbico)
M-V	Determinación del porcentaje de acidez y del índice de formol
M-VI	Determinación del porcentaje de pulpa en zumos
M-VII	Identificación y cuantificación de azúcares
M-VIII	Test de turbidez
M-IX	Medición de absorbancia y transmitancia
M-X	Determinación de limonina

M-I. Determinación de los grados brix en zumos

El contenido de **sólidos solubles** o **grados brix** de una muestra se define como la concentración en sólidos solubles del zumo. Están relacionados con el índice de refracción y la densidad ya que, al aumentar la concentración del soluto, aumentan ambos de manera proporcional.

En los zumos, no todos los sólidos disueltos son sacarosa, sino que hay más azúcares como fructosa, glucosa entre otros.

Procedimiento

Para realizar la medición se debe seguir la siguiente operativa:

- Asegurarse que el instrumento está operativo, calibrado, limpio y seco
- Mezclar el material a analizar completamente (zumo o concentrado) con una cuchara
- Poner una cantidad de muestra suficiente que cubra la superficie de la lente
- Apretar el botón de medida para realizar la lectura de los grados brix
- Una vez terminado, limpiar y secar la superficie de la lente completamente con agua destilada y con un paño limpio y suave
- No verificar el material por encima de los 30 °C o por debajo de los 5 °C

NOTA: Es muy importante que no existan burbujas al colocar la muestra en la lente.

Cálculo

El resultado se leerá directamente del equipo y se expresa en grados brix.

Método de referencia

Método IFU N° 8. *Determination of soluble solids (indirect method by refractometry).*

AOAC section 52.012 "International scale of refractive indices of sucrose solutions" (13th Ed. 1980).

M-II. Determinación del contenido en sodio y potasio

El **sodio** y **potasio** se encuentran en las frutas debido a las sales que toman las plantas del suelo. No hay diferencias significativas entre el contenido en la fruta y en el zumo, pero por lo general al exprimir el contenido en potasio disminuye y el de sodio aumenta en el zumo.

La proporción de potasio es más alta que la de sodio en los zumos. Mientras que la Asociación Europea de Zumos de Frutas (AIJN) marca unos límites de 30 ppm para el

sodio en los principales cítricos, para el potasio los límites se sitúan entre 1300-2500 ppm.

Estos dos parámetros son indicadores de adulteraciones en zumos debido a que la adición de determinados compuestos, como por ejemplo una sal de citrato que puede ocasionar un aumento del sodio o del potasio. También puede ser un control de contaminación por una mala limpieza de un tanque.

Cálculo

El equipo mostrará en pantalla un valor entre 0 y 100. La concentración final se obtiene mediante las tablas II.1 y II.2 del anexo II donde se muestra la relación del valor de la lectura del fotómetro con la concentración de sodio y potasio expresado en ppm (mg/L). El valor que se muestra en la tabla es el valor real de la muestra ya teniendo en cuenta la dilución previa.

Método de referencia

Método IFU N° 33. *Determination of sodium, potassium, calcium and magnesium.*

M-III. Determinación del pH

El **pH** se lo proporciona al zumo todos aquellos iones libres que se encuentran en la muestra por la hidrólisis ácida de los ácidos que contiene la muestra.

Los cítricos son frutos que contienen una gran cantidad y variedad de ácidos. Estos ácidos le confieren a la muestra un pH menor de 4, siendo inferior a 3 en el caso del limón, que permite que ciertos ácidos como al ácido cítrico puedan cumplir con una función microbicida bastante eficaz.

Equipos y reactivos

- pH-metro Crison GLP-21
- Disolución de tampón pH 4.01 ± 0.02
- Disolución de tampón pH 7.00 ± 0.02
- Disolución de tampón pH 9.21 ± 0.02

Calibración

Para completar el proceso de calibración hay que realizar los siguientes pasos:

- Pulsar "*Calibrar pH*"
- El equipo pedirá la disolución tampón pH 4.01, introducir el electrodo en el recipiente de este pH, comprobar que está correctamente sumergido y pulsar "*CONTINUAR*"
- Esperar hasta que el valor de los milivoltios (mV) se estabilice en la pantalla y que el equipo solicite valorar la disolución tampón pH 7.00
- Limpiar bien el electrodo con agua destilada
- Cambiar el vaso de tampón pH 4.01 al de pH 7.00 e introducir el electrodo. Pulsar "*CONTINUAR*"
- Esperar hasta que el valor de los milivoltios (mV) se estabilice en la pantalla y que el equipo solicite valorar la disolución tampón pH 9.21
- Cambiar el vaso de tampón pH 7.00 al de pH 9.21 e introducir el electrodo. Pulsar "*CONTINUAR*"
- Esperar hasta que el valor de los milivoltios (mV) se estabilice en la pantalla
- Limpiar bien el electrodo con agua destilada
- Una vez finalizada la calibración del equipo, se realizará la medida de las tres disoluciones tampón para su comprobación

Procedimiento de medida

- Colocar al menos 20 mL de muestra en un vaso de precipitado de 100 mL
- Introducir el electrodo y comprobar que queda bien cubierto, en caso contrario añadir más cantidad de muestra
- Pulsar "*MEDIR pH*" y seleccionar "*Iniciar medida de pH*"

Cálculo

El valor de pH se mostrará en pantalla una vez se estabilice la medida.

Método de referencia

IFU N° 11. *Determination of pH value.*

M-IV. Determinación del contenido en vitamina C (ácido ascórbico)

La **vitamina C**, o **ácido ascórbico**, es el componente más importante de los frutos cítricos, estando presente sobre todo en la corteza, por lo que sólo alrededor de la cuarta parte pasa al zumo. Fácilmente degradable por el calor y la exposición al aire, es un compuesto hidrosoluble de seis átomos de carbono relacionado con la glucosa.

Equipos y reactivos

- Bureta graduada de 25 mL
- Disolución de yodina 0.01 N
- Disolución de almidón al 1 %

Procedimiento

- Introducir 10 mL de zumo en un matraz erlenmeyer y añadir 1 mL de disolución de almidón
- Valorar con la disolución yodina 0.01 N hasta que aparezca un color entre púrpura y negro

Cálculo

- Zumos

$$8.8 \times \text{mL valoración yodo} = \frac{\text{mg Vitamina C}}{100 \text{ mL}} \quad (\text{Ecuación 3.1})$$

- Concentrados

$$\frac{8.8 \times \text{grados brix del concentrado} \times \text{mL valoración yodo}}{\text{Peso específico zumo} \times \text{grados brix del zumo}} = \frac{\text{mg Vitamina C}}{100 \text{ mL}} \quad (\text{Ecuación 3.2})$$

Método de referencia

JBT. Cap IV. N° 27: *Ascorbic acid by iodine titration.*

M-V. Determinación del porcentaje de acidez y del índice de formol

En los alimentos el **grado de acidez** indica el contenido en ácidos libres de la muestra. Se determina mediante una valoración (volumetría) con un reactivo básico.

La **acidez valorable** es la medida del contenido de minerales y ácidos orgánicos por titulación potenciométrica con una disolución estándar volumétrica de hidróxido sódico a pH 8.1. Se trata de un indicativo de calidad del zumo y puede variar considerablemente dependiendo de la variedad, zona, cultivo y maduración de la fruta.

El resultado se expresa como el porcentaje del ácido predominante en el material. Por ejemplo, en aceites es el ácido oleico; en zumo de frutas en ácido cítrico; o en leche en ácido láctico.

Por otra parte, el **índice de formol** es un parámetro que refleja la presencia de ciertos aminoácidos en el zumo y, por tanto, el índice de la calidad de las frutas utilizadas. La adición de ácido cítrico y/o azúcar lo disminuyen.

Procedimiento

Valoración manual

- Introducir 10 mL de zumo en un vaso de precipitados de 100 mL y adicionar agua (unos 20 mL) hasta que cubra el electrodo
- Medir el pH de la muestra, lo ideal es seleccionar la opción de “medida en continuo”
- Valorar con NaOH 0.1 N hasta alcanzar pH 8.1. NOTA: Se pueden adicionar 2 o 3 gotas de fenolftaleína y valorar con NaOH 0.1 N hasta que vire el color, pero la valoración más precisa es utilizar el pH-metro
- Anotar los mL gastados. Con estos mL se calcula el porcentaje de acidez
- Añadir 10 mL de formaldehído calibrado y volver a valorar con NaOH 0.1 N hasta pH 8.1. Anotar el volumen de NaOH 0.1 N consumido

Cálculo

Porcentaje de acidez

Los mililitros gastados de NaOH 0.1 N se multiplica por el factor 0.064 para expresarlo en porcentaje de ácido cítrico según la ecuación:

$$\% \text{ Acidez} = \text{mL gastados NaOH 0.1 N} \times 0.064 \quad (\text{Ecuación 3.4})$$

NOTA: Para expresar el porcentaje de acidez como otro ácido hay que multiplicar por el factor correspondiente según la tabla 3.7:

Tabla 3.7. Factores de multiplicación según los ácidos principales de las frutas.

Ácido	Factor
Ácido cítrico	0.064
Ácido málico	0.067
Ácido tartárico	0.075

Índice de formol (IF)

Los mililitros gastados de NaOH 0.1 N se multiplican por 10.

$$IF \left(\frac{\text{mL}}{100\text{mL}} \right) = \text{mL gastados} \times 10 \quad (\text{Ecuación 3.5})$$

Método de referencia

Método IFU N° 3. *Titrateable acidity.*

Método IFU N° 30. *Determination of formol number.*

M-VI. Determinación del porcentaje de pulpa en zumos

La **pulpa** del zumo es el tejido celular vegetal cuyo objeto es mejorar la dispersión de las semillas, además de jugar un importante papel en la nutrición ya que contiene un elevado contenido en fibra.

Procedimiento

- Llenar los tubos de ensayo con 10 mL de zumo
- Meter los tubos de ensayo en la centrífuga durante 10 minutos a 1500 rpm
- Cuantificar la cantidad de sedimentos en los tubos (en mL)

Cálculo

$$\% \left(\frac{V}{V} \right) \text{ pulpa en zumo} = \text{mL de sedimento tubo ensayo} \times 10 \quad (\text{Ecuación 3.6})$$

Métodos de referencia

IFU N° 60. *Determination of centrifugeable pulp.*

M-VII. Identificación y cuantificación de azúcares

Los principales **azúcares** presentes en los cítricos son: fructosa, glucosa y sacarosa. La glucosa y fructosa son monosacáridos mientras que la sacarosa es un disacárido formado por glucosa y fructosa.

La fructosa es el azúcar con mayor poder endulzante, superando a la sacarosa, por lo que se utiliza como un endulzante natural, ya que aporta menos calorías que otros azúcares como la glucosa o la sacarosa para obtener el mismo dulzor. Existen otros azúcares como el sorbitol, la maltosa y la isomaltosa que son de interés en la industria cítrica.

El orden de aparición de los azúcares en el cromatograma es el siguiente:

Fructosa
Sorbitol
Glucosa
Sacarosa
Maltosa
Isomaltosa

Limpieza en el equipo

Limpieza de la jeringa. Tras cada inyección, la jeringa se enjuagará 3 veces en agua grado HPLC.

Limpieza de la columna. Para el lavado de la columna se ha de inyectar agua caliente al equipo para disolver los posibles restos de azúcar y se deja pasar fase móvil durante 15 minutos a 0.6 mL/min de flujo.

M-VIII. Test de turbidez

Se entiende por **turbidez** o **turbiedad** la falta de transparencia de un líquido debido a la presencia de partículas en suspensión. Cuantos más sólidos en suspensión haya en el líquido más alta será la turbidez.

Preparación de las muestras

Muestras de zumo y concentrados

Las muestras de zumo y concentrados se medirán directamente.

Procedimiento de medida

- Introducir la muestra en los tubos del turbidímetro y colocar el tapón
- Limpiar bien la superficie del tubo de vidrio
- Observar que en el equipo está seleccionado “*SAMPLE*”
- Introducir el tubo con la muestra en posición correcta
- Sin pulsar nada, el equipo dará el valor de la medida cuando se estabilice

Cálculo

El equipo mostrará en pantalla el resultado en NTU.

Método de referencia

Método IFU Recommendation N° 7. *Turbidity Measurements*.

M-IX. Medición de absorbancia y transmitancia

El color de los zumos es un criterio de calidad importante. Se determina espectrofotométricamente midiendo por absorbancia o transmitancia en la región visible del espectro.

La **absorbancia** se define como la luz que absorbe un cuerpo respecto del haz de luz que incide sobre él. A mayor cantidad de luz absorbida, mayor será el valor de absorbancia, y menor la cantidad de luz transmitida.

Según el tipo de producto se seleccionará una longitud de onda concreta. Por ejemplo, productos amarillos o marrones tales como manzana, pera y uva blanca la longitud de onda de medida es de 440 nm, mientras que, en los productos rojos como frambuesa, uva roja, grosella la longitud de onda de medida es de 520 nm.

$$\text{Absorbancia} = -\log_{10} \frac{\text{Intensidad luz que pasa por la muestra}}{\text{Intensidad de luz incidente}} \quad (\text{Ecuación 3.7})$$

La **transmitancia óptica** se define como la cantidad de luz que atraviesa un cuerpo en una determinada longitud de onda. Cuando un haz de luz incide sobre un cuerpo traslúcido, una parte de esa luz es absorbida por él mismo, y otra fracción de ese haz de luz atravesará el cuerpo, según su transmitancia. Se suele expresar en porcentaje según la siguiente fórmula:

$$\% T = \frac{\text{Luz transmitida por la muestra}}{\text{Cantidad total de luz incidente}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3.8})$$

Equipos y reactivos

- Espectrofotómetro
- Agua destilada

Preparación de las muestras para medidas de absorbancia y transmitancia

Productos concentrados. Se diluirán a los grados brix de referencia del producto.

Resto de zumos. Se mide directamente.

Procedimiento de medida para absorbancia y transmitancia

- Encender el espectrofotómetro al menos 10 minutos antes de realizar la medición. Tras esto, seleccionar el modo de trabajo y longitud de onda deseada
- Verter en una cubeta agua destilada y hacer el cero en el espectrofotómetro. Asegurarse de que las paredes de la cubeta estén bien limpias y secas
- Limpiar la cubeta y secar bien

- Verter en la cubeta la muestra, introducir en el equipo y medir

Cálculo

El resultado será el que indique el equipo directamente.

Método de referencia

IFU N° 80. *Measurement of the color of clear and hazy juices.*

M-X. Determinación de limonina

La **limonina** es un limonoide, una sustancia amarga, blanca y cristalina que se encuentra en frutas de naranja y limón. Su determinación indica el grado de amargor y se relaciona con el estudio organoléptico.

Método de referencia

JBT. Cap. IV, N° 30. *Limonin by HPLC.*

3.3.2. Métodos de cálculo

El análisis de los resultados se ha realizado utilizando el programa estadístico R. La respuesta glicémica postprandial se evaluó como el área de incremento bajo la curva de respuesta de la glucosa de ambos zumos estudiados (IAUC). Se ha utilizado el test de *Kolmogorov-Smirnov* para analizar la normalidad de los datos, realizándose ANOVA o test no paramétricos (Wilcoxon) para contrastar las medias. En concreto, se han comparado tanto los índices glicémicos como el IAUC entre los zumos A, B y el control (10.4% de dextrosa). Además, se han realizado análisis de correlación de Pearson entre las variables antropométricas, el sexo y los datos obtenidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4. Resultados y discusión

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Es habitual encontrar este tipo de producto en la industria cítrica a partir de subproductos junto con el denominado WESOS (*water extracted soluble solids*) aunque este tipo de recuperación de subproductos es más común en Brasil y Estados Unidos, en España cada vez más empresas optan por incluir en sus líneas la recuperación de la corteza con el fin de aprovechar al máximo todas las fracciones durante el procesado y para minimizar los residuos generados.

El desarrollo del estudio realizado puede resumirse en el esquema de la figura 4.1, donde se pueden apreciar las diferentes etapas que se han llevado a cabo para conseguir separar los distintos componentes. El subproducto de la piel de los cítricos se pasa a través de una membrana de ultrafiltración obteniéndose un producto clarificado. Posteriormente, se optimiza la corriente de permeado mediante un paso por ultrafiltración, con un tamaño de corte molecular de membrana (MWCO) más restrictivo que el anterior para obtener un permeado aún más clarificado, puesto que los consumidores exigen cada vez más unas especificaciones muy restrictivas.

Por último, se introduce el permeado en una etapa de nanofiltración en la que se busca separar los diferentes azúcares presentes en el subproducto, obteniendo así azúcares naturales procedentes de la fruta.

4.1. Clarificación mediante ultrafiltración

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

El principal objetivo de esta etapa ha sido clarificar el producto. Este proceso es capaz de aumentar la rentabilidad a corto plazo ya que así se puede ampliar el tiempo de su utilización, debido a que el subproducto *orange peel extract* o el *lemon peel extract*, habitualmente presenta un sabor fuertemente amargo y aromas tostados. Mediante el uso de esta etapa se puede aumentar la producción de este subproducto, por lo tanto, podría aumentar la rentabilidad considerablemente porque en la actualidad no se puede hacer frente al aprovechamiento de todo este subproducto cuando se trabaja al 100% de capacidad de la planta y, en estos casos, parte de la corteza es desechada. Este proceso podría lograr dar un aprovechamiento posterior o un segundo uso a la totalidad de las pieles.

Según la bibliografía consultada, a partir de la materia prima procedente de corteza de naranja y por otro lado bergamota, los autores Figueroa et al. (2011) y Conidi et al. (2011) optaron por clarificar el producto mediante membranas de ultrafiltración de 100 KDa, del mismo modo, en la presente Tesis se ha seleccionado el mismo tamaño de corte molecular. Los resultados obtenidos en los ensayos se recogen en la tabla 4.1, en dicha tabla se muestran los principales parámetros de las corrientes de alimentación, permeado y rechazo. Además, se incluye una columna con los parámetros de la materia prima utilizada antes de la dilución con agua para alimentar la membrana.

En la tabla se puede apreciar que el porcentaje de acidez, índice de formol, potasio y el pH prácticamente no varían, mientras que el porcentaje de pulpa y el porcentaje de transmitancia tienen una variación importante debido al proceso de clarificación que retiene el contenido en pulpa y pectinas principales causantes de la turbidez tal y como indica Dey y Banerjee (2014).

Basado en el conocimiento previo se decidió realizar un ensayo utilizando un sistema de ultrafiltración, dicho ensayo consistió en introducir al tanque el "*orange peel extract*" e ir aumentando el caudal de la bomba hasta conseguir unos valores de presión

máximos tolerables por la instalación, principalmente los valores admisibles por la membrana.

Cada ensayo tuvo una duración de 3 horas, al no disponer de un sistema de refrigeración la temperatura fue aumentando desde los 30 °C iniciales hasta un máximo de 60 °C, temperatura limitante para que el producto no se degrade sensorialmente puesto que la membrana puede soportar hasta los 90 °C. A las 2 horas de funcionamiento, se alcanzaron los 60 °C. Para bajar la temperatura se volvió a introducir el producto al tanque y la temperatura descendió hasta los 46 °C.

Con el ensayo realizado, se pretende obtener los grados brix máximos a los que se puede introducir el producto en el equipo de filtración trabajando al 100% de rendimiento para así ahorrar costes energéticos en la etapa posterior de concentración. Además de los costes de concentración también se produce un ahorro en costes logísticos por volumen de materia prima transportada y en tanques de acumulación debido al menor volumen trabajado. El sumatorio de todos estos pequeños costes asociados a una concentración superior de clarificación puede llegar a imposibilitar económicamente el proyecto, por tanto, conocer los grados brix óptimos de clarificación es un dato que hay que tener en cuenta, tal y como se refleja en los estudios de Figueroa et al. (2012).

A partir de los ensayos realizados se obtuvieron muestras a diferentes tiempos para realizar análisis a las diferentes corrientes del proceso. En la tabla 4.3, se muestra la variación del porcentaje de transmitancia a lo largo del proceso medida a una longitud de onda de 650 nm.

Tabla 4.3. Evolución del porcentaje de transmitancia durante el proceso de clarificación.

t (min)	%T ₆₅₀
Muestra sin clarificar	0.20
15	98.02
60	98.13
120	97.91
205	97.95
Rechazo final	0.10

En la tabla anterior se aprecia una disminución del porcentaje de transmitancia conforme va permeando el producto. No obstante, durante todo el ensayo se mantiene por encima del 95% un valor por el cual se considera que la clarificación se ha producido de manera correcta. Según Jegatheesan et al. (2012) la filtración con membranas es capaz de conseguir corrientes de permeado con una excelente calidad y una eliminación casi total de la turbidez y color.

La figura 4.2, muestra de izquierda a derecha una comparación entre el permeado diluido a 11.2 grados brix, el permeado obtenido y la corriente de rechazo, donde se aprecian perfectamente las diferencias entre las corrientes obtenidas con un visual atractivo para la corriente de permeado y su dilución. Se diluye a 11.2 grados brix ya que son los grados brix de referencia para un zumo de naranja reconstituido a partir de un concentrado.



Figura 4.2. Corrientes obtenidas tras el paso por membrana

A continuación, en la tabla 4.4 se indican los azúcares presentes en el permeado y la alimentación frente a los valores marcados por la Asociación Europea de Zumos de Frutas (AIJN), creada en 1962 y con sede en Bruselas. AIJN es la asociación representativa de la industria de zumos de frutas, y elabora guías de referencia para cada tipo de fruta donde se incluye los valores usuales de los principales parámetros respecto a la composición, requisitos medioambientales e higiénicos. El zumo de naranja estándar está analizado a 11.2 grados brix.

Los principales azúcares presentes en los cítricos son glucosa, fructosa y sacarosa, la presencia de otros azúcares pueden ser indicios de adulteración de los zumos o concentrados. El porcentaje de sacarosa y el extracto libre de azúcar se obtienen mediante las ecuaciones:

$$\%Sacarosa = \frac{\sum \text{concentración total de azúcares}}{\text{concentración de sacarosa}} \quad (\text{Ecuación 4.1})$$

$$\text{Extracto libre de azúcar} = \text{Sólidos solubles} \left(\frac{g}{L} \right) - \sum \text{Concentración total de azúcares} \quad (\text{Ecuación 4.2})$$

El aumento de los monosacáridos al clarificar (glucosa y fructosa) está íntimamente relacionado con la disminución del extracto libre de azúcar, puesto que parte de la composición de este extracto lo componen pectinas, pulpa y flavonoides entre otros, que son rechazados en la membrana mientras que los monosacáridos y disacáridos sí que atraviesan la membrana.

En ambos casos se ve descompensada la concentración de sacarosa y la relación glucosa/fructosa, esto es debido a que la composición de azúcares presentes en la corteza no es del todo similar al zumo y por la propia extracción enzimática llevada a cabo, tal como señala Maktouf et al. (2014). Por último, en la tabla 4.5 se muestran parámetros más específicos analizados.

De entre los valores obtenidos en la tabla anterior, destaca la reducción de la hesperidina, AIJN en su guía para la naranja, ya indica la reducción de la hesperidina debido al proceso de clarificación, puesto que el tamaño de corte no deja pasar este flavonoide presente, quedándose en la corriente de rechazo. Esta corriente recuperable puede ser útil en un futuro para la extracción de flavonoides y otros compuestos de alto valor añadido. Existe también un importante descenso de las pectinas totales y solubles en agua. La consecuencia de la reducción de pectinas fue descrita por Kashyap et al. (2001), para reducir la turbidez al igual que se ha podido observar en la presente Tesis. En la figura 4.3, se describen las diferentes corrientes del proceso de ultrafiltración (UF) con los productos más representativos presentes.

La figura 4.3 describe de una forma visual las diferentes corrientes presentes en el proceso de ultrafiltración (alimentación, permeado y rechazo) junto con los principales componentes de éstas. En la corriente de rechazo, la membrana es capaz de eliminar toda la pulpa presente, la turbidez que ocasionan los compuestos, la mayoría de los flavonoides para conseguir así un sabor más neutro y que el permeado obtenido se pueda aplicar en más productos.

4.2. Optimización de la corriente de permeado clarificada

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Una vez obtenido el producto clarificado mediante el proceso de ultrafiltración, se abrieron dos vías de investigación. Estas vías se muestran en la figura 4.1 descrita anteriormente.

La primera de ellas fue la optimización de la corriente de permeado obtenido y su posible concentración de los azúcares presentes. Para ello, a partir del permeado anterior se han llevado a cabo ensayos utilizando dos membranas de ultrafiltración de diferente composición química, Como objetivo global en estos ensayos, se planteó estudiar la posibilidad de separar azúcares de mayor tamaño molecular (disacáridos), de los de menor tamaño (monosacáridos), así como la posibilidad de concentrar los azúcares en la corriente de rechazo.

Además, con estos ensayos se ha tratado de optimizar el permeado procedente de la clarificación, donde se ha utiliza una membrana de ultrafiltración y mejorar el perfil organoléptico. Cabe destacar, que al utilizar un proceso de ultrafiltración respecto a un proceso de nanofiltración los consumos energéticos se ven reducidos considerablemente ya que opera a menores presiones. El equipo utilizado se muestra en la figura 4.4, donde se puede apreciar a la izquierda el tanque de alimentación y el módulo de membranas, a la derecha de la figura se sitúa el portátil que se utiliza para controlar el ensayo a través del software y en el centro se sitúa la balanza y la zona de medidas volumétricas.



Figura 4.4. Imagen del equipo experimental utilizado en la realización de los ensayos de separación de azúcares mediante distintas membranas de ultrafiltración.

El producto utilizado como materia prima es el permeado clarificado obtenido tras una etapa de ultrafiltración anterior. Las membranas utilizadas para la optimización y concentración de azúcares fueron dos. Las características y condiciones de operación de las membranas utilizadas se muestran en el apartado 3.1.1 del capítulo 3 materiales y métodos.

Como paso previo se ha llevado a cabo la caracterización inicial de las membranas, realizando un estudio de permeabilidad al disolvente. Dicho ensayo se ha llevado a cabo para cada una de ellas antes y después de los ensayos con el *orange peel extract* clarificado.

La ecuación 4.3 expresa el flujo de agua a través de la membrana mediante una fuerza impulsora, que es el gradiente de presión:

$$J_w = A_w \times (\Delta P - \Delta \Pi) \quad (\text{Ecuación 4.3})$$

Siendo:

A_w : coeficiente de permeabilidad de la membrana al agua (h/m)

J_w : flujo de agua en el permeado ($\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{h}$)

ΔP : gradiente de presión hidráulica a través de la membrana (bar)

$\Delta \Pi$: gradiente de presión osmótica a través de la membrana (bar)

4.2.1. Determinación de la permeabilidad de las membranas utilizadas mediante ensayos con agua destilada

Experimentalmente, se observa que existe una relación lineal entre el flujo de disolvente y el gradiente de presión a través de la membrana, cuando se realizan los ensayos con agua. En ese caso, no hay sales ni solutos orgánicos en la alimentación. Cuando las concentraciones de soluto son bajas, el gradiente de presión osmótica es muy bajo, y se puede despreciar frente al gradiente de presión hidráulica. Así pues, la ecuación 4.3 quedará reducida a la 4.4:

$$J_w = A_w \times \Delta P \quad (\text{Ecuación 4.4})$$

Al representar el flujo de permeado (J_w , en $\text{m}^3/\text{m}^2 \cdot \text{h}$) frente a la presión hidráulica (bar) y realizar un ajuste mediante regresión lineal, se obtiene una recta cuya pendiente será igual al coeficiente de permeabilidad de la membrana al agua (A_w , en h/m). No obstante, para poder realizar una comparación con otros autores y de los datos obtenidos en los ensayos, este coeficiente se expresa en otras unidades (s/m) y la representación se ha realizado como el flujo de permeado J_w medio, en $\text{kg}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$. Hay que tener en cuenta, a la hora de realizar los cálculos, que el área útil de la membrana acoplada en el módulo es de $8.48 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$.

Se han realizado varios ensayos con agua para determinar experimentalmente la permeabilidad inicial (A_{wi}) de las membranas GR60PP y GR90PP. Para ello, se varió la presión de operación entre 4-10 bar. Con los datos experimentales obtenidos, se ha realizado la representación gráfica y el ajuste lineal pertinente, obteniéndose así las permeabilidades de cada membrana antes de su uso en la figura 4.5, donde las permeabilidades se corresponden a la pendiente de las rectas de cada membrana.

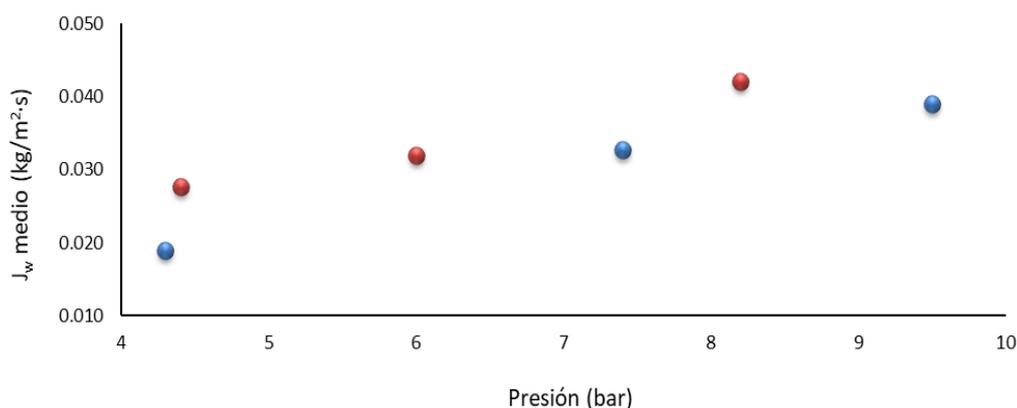


Figura 4.5. Representación del flujo de permeado frente a la presión para determinar la permeabilidad de las membranas estudiadas mediante paso de agua destilada. Membrana GR60PP=● ; Membrana GR90PP=●.

Además, se ha realizado un estudio comparativo entre los datos experimentales obtenidos de permeabilidad inicial para cada membrana. Se ha comparado con la bibliografía las dos membranas utilizadas. En la tabla 4.6, se muestran los valores de permeabilidad de las membranas ensayadas y la bibliografía consultada para los ensayos con agua destilada.

Tabla 4.6. Comparación de los coeficientes de permeabilidad de las distintas membranas (los obtenidos experimentalmente y los consultados en la bibliografía).

Experimental A_{wi} (s/m)	Bibliografía A_{wi} (s/m)
1.083×10^{-8}	6.690×10^{-8}
1.056×10^{-8}	5.060×10^{-8}

En ella, se observa, que los valores de los coeficientes de permeabilidad obtenidos experimentales y los consultados en la bibliografía son del mismo orden. Sánchez-Moya et al. (2020), utilizaron las membranas GR60PP y GR90PP para la separación de la lactosa y la proteína del suero de la leche, obteniendo valores del coeficiente de permeabilidad (A_{wi}) en s/m del mismo orden de magnitud que los obtenidos experimentalmente para dichas membranas.

Las membranas utilizadas poseen similar composición química, pero no son exactamente iguales, tienen ciertas características propias. En la figura 4.6, se muestra las unidades estructurales de la composición química de la membrana GR60PP (polisulfona) y de la membrana GR90PP (polietersulfona).

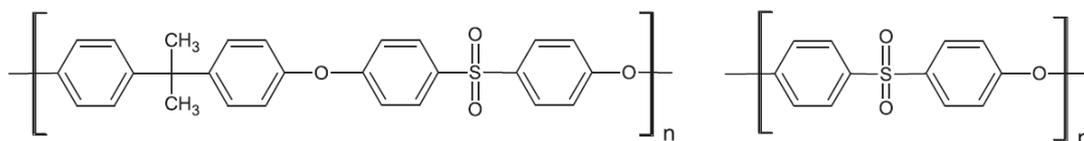


Figura 4.6. Composición química de las membranas GR60PP (a la izquierda) y GR90PP (a la derecha) (Galanakis, 2015).

En la figura 4.6 se muestra como la polisulfona está compuesta por unidades aromáticas y alifáticas de manera secuencial, que le otorga el perfil hidrofóbico del polímero al repeler el agua y los compuestos hidrofílicos. Ocasionalmente, esta estructura tiene un carácter hidrofílico debido a la formación de enlaces de hidrógeno por la conexión existente entre las moléculas de oxígeno (aril-O-alquilo) y dióxido de azufre (aril-SO₂-alquilo). Por otro lado, la estructura de la polietersulfona es similar, pero menos hidrófoba, por la presencia de un mayor número de moléculas de dióxido de azufre (Galanakis, 2015), esto es debido a los átomos de oxígeno presentes en la molécula de SO₂ que pueden unirse al agua. Además, las membranas de composición química de polietersulfona presentan resistencia a las proteínas y polisacáridos (Ma et al., 2007; Peng et al., 2011).

4.2.2. Caracterización de las corrientes de permeado y rechazo

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Una vez realizados los ensayos de filtración en el módulo de pruebas, los resultados del análisis de las corrientes de alimentación y permeado para cada una de las membranas ensayadas se muestran en la tabla 4.7.

En la tabla 4.7 se puede observar que los grados brix descienden ligeramente debido a la eliminación de compuestos que aportan grados brix, pero se mantiene el pH, porcentaje de acidez, índice de formol, potasio y ácido ascórbico. Castro y Gerla (2005) observaron que la capacidad antioxidante tras la filtración por membranas se mantenía invariable e incluso superior al filtrado tradicional por tierra de diatomeas, coincidiendo

con los datos obtenidos en los ensayos, donde el ácido ascórbico se mantiene aproximadamente en los mismos niveles tras pasar por la membrana.

Con este proceso de ultrafiltración y, al igual que en los estudios de Maktouf et al. (2014), se logra reducir la turbidez y viscosidad, obteniendo un producto más transparente, de aspecto y sabor más neutro, disminuyendo la percepción de amargor siendo la membrana de menor tamaño de poro, la que alcanza unos valores de porcentaje de transmitancia mayores.

Esto es muy útil, ya que algunos clientes buscan un producto que aporte el menor sabor o color posible para poder aplicarlo en diferentes referencias y no limitar el uso, manteniendo como en este caso los minerales y los ácidos presentes. Luo et al. (2016) justificaron que un paso por una membrana de ultrafiltración “*loose*” seguido de una “*tight*” era capaz de reducir los pigmentos obteniendo así un zumo con una baja coloración. Los términos “*loose y tight*” se corresponden con una membrana de mayor tamaño de poro y otra más pequeña.

A continuación, en la tabla 4.8 se muestran los análisis de los azúcares realizados a las distintas corrientes tanto de alimentación, permeado y rechazo.

El aumento de los grados brix que presentan las corrientes de rechazo frente a las de permeado en ambas membranas es debido a que el sistema trabaja por lotes o “*batches*”, es decir, se introduce una cantidad de producto al tanque de alimentación a la membrana y se obtiene permeado, mientras que el rechazo se devuelve al tanque produciéndose una concentración de los sólidos solubles presentes.

Para poder discutir los resultados de la concentración de azúcares se deben transformar los valores de la concentración de azúcares para expresarlos a 11.2 grados brix, así se obtiene la tabla 4.9, donde se incluye una columna comparativa con los rangos usuales de un zumo de naranja.

En la tabla anterior, se ven alterados los valores de la sacarosa y la relación glucosa/fructosa esto es debido a la composición de los azúcares presentes en la corteza de la naranja (flavedo y albedo) que no es del todo similar respecto del zumo que contiene en el interior y que se compara en la última columna. De igual modo ocurre en el apartado anterior al clarificar el *orange peel extract* directamente y en los estudios realizados por Maktouf et al. (2014).

Por otro lado, se aprecian las diferencias del valor del extracto libre de azúcar en las corrientes de rechazo frente a las corrientes de permeado en ambas membranas ya que los azúcares atraviesan la corriente de permeado mientras que en la corriente de rechazo quedan otros compuestos como pectinas o flavonoides y parte de la sacarosa. El porcentaje de sacarosa como el extracto libre de azúcar se han obtenido mediante las ecuaciones 4.1 y 4.2.

Para determinar como de eficaz es la separación de los monosacáridos de los disacáridos, se ha calculado mediante la ecuación 4.5 el porcentaje de rechazo de los diferentes azúcares (parámetro relacionado con el grado de concentración de la alimentación) siguiendo la ecuación que Cassano et al. (2011) y Conidi et al. (2017) utilizaron para estudiar el rechazo de la membrana en diferentes compuestos fenólicos de un zumo de granada clarificado por membranas de ultrafiltración y nanofiltración. Además, se ha calculado el porcentaje de concentración mediante la ecuación 4.6. Estos valores se muestran en la tabla 4.10.

Las ecuaciones utilizadas han sido:

$$\% \text{ Rechazo} = \frac{C_a - C_p}{C_a} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.5})$$

$$\% \text{ Concentración} = \frac{C_r}{C_a} \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.6})$$

Siendo:

C_a : Concentración de alimentación (g/L)

C_p : Concentración del permeado (g/L)

C_r : Concentración de rechazo (g/L)

Los resultados obtenidos, indican que la membrana con menor tamaño de corte molecular, es capaz de rechazar hasta un 15 % de los disacáridos mientras que en la membrana la composición porcentual se mantiene prácticamente invariable.

4.2.3. Estudio del ensuciamiento (fouling) de la membrana GR60PP

Uno de los problemas que presentan las membranas durante su funcionamiento está relacionado con los fenómenos de ensuciamiento o *fouling* que pueden llegar a producirse. Para comprender los fenómenos de ensuciamiento o *fouling* que sufren las membranas durante su utilización se ha llevado a cabo un estudio donde se ha seleccionado la membrana GR60PP, debido a que su composición química en base a la polisulfona es muy común dentro del campo de las membranas poliméricas de ultrafiltración y nanofiltración.

Con el fin de observar las diferencias de los coeficientes de permeabilidad de la membrana GR60PP se ha elaborado la figura 4.7, cuya representación compara los valores experimentales obtenidos durante la realización de los ensayos con agua destilada a diferentes presiones antes y después de pasar el *orange peel extract*. A partir de estos datos, se ha llevado a cabo la representación gráfica y el ajuste lineal pertinente, obteniéndose así las permeabilidades.

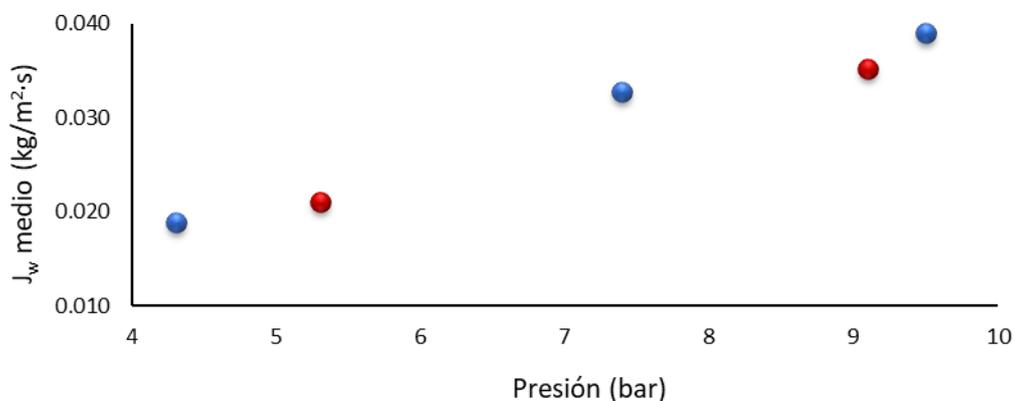


Figura 4.7. Representación del flujo de permeado frente a la presión para determinar la permeabilidad de las membranas mediante paso de agua destilada antes y después del paso del *orange peel extract* en la membrana GR60PP. Flujo inicial= ● , Flujo después del paso del *orange peel extract* = ●.

Además, se ha realizado un estudio comparativo entre los datos experimentales de permeabilidad obtenidos antes y después del paso del *orange peel extract*. En la tabla 4.11, se muestran los valores de permeabilidad de la membrana ensayada y la bibliografía consultada para los ensayos con agua destilada.

Tabla 4.11. Comparación de los coeficientes de permeabilidad (los obtenidos experimentalmente y los consultados en la bibliografía) al inicio y final de los ensayos con agua destilada para la membrana GR60PP.

Membrana	Experimental A_w (s/m)		Bibliografía A_w (s/m)
	GR60PP	Inicio	1.083×10^{-8}
Final		1.028×10^{-8}	5.710×10^{-8}

Se puede observar, que los valores de los coeficientes de permeabilidad obtenidos experimentales y los consultados en la bibliografía son del mismo orden. Sánchez-Moya et al. (2020) en sus estudios para la separación de la lactosa y la proteína del suero de la leche, obtuvieron valores del coeficiente de permeabilidad (A_w) en s/m del mismo orden de magnitud que los obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, se ha utilizado la ecuación 4.7 para valorar el grado de ensuciamiento irreversible (IF) de la membrana tal y como lo describen Warczok et al. (2004) y Echavarría et al. (2012) en sus estudios, donde se comparan los flujos de permeado con agua destilada antes y después de ser utilizada la membrana. Además, se ha utilizado la ecuación 4.8 para definir el índice de ensuciamiento (FI) de la membrana de acuerdo con otros autores como Conidi et al. (2017), donde se compara la permeabilidad de la membrana mediante el paso de agua destilada antes y después del paso del zumo. Los resultados del índice de ensuciamiento y del ensuciamiento irreversible para la membrana GR60PP de polisulfona se muestran en la tabla 4.12.

$$IF = \frac{J_{wi} - J_{wf}}{J_{wi}} \quad (\text{Ecuación 4.7})$$

$$FI = \left(\frac{A_{wf}}{A_{wi}} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 4.8})$$

Donde:

A_{wi} : coeficiente de permeabilidad inicial de la membrana para el agua destilada (s/m)

A_{wf} : coeficiente de permeabilidad de la membrana después del paso del producto para el agua destilada (s/m)

J_{wi} : flujo de permeado inicial de la membrana para el agua destilada ($\text{kg/m}^2\cdot\text{s}$)

J_{wf} : flujo de permeado de la membrana después del paso del producto para el agua destilada ($\text{kg}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)

Tabla 4.12. Índice de ensuciamiento y ensuciamiento irreversible de la membrana GR60PP después de utilizar el extracto clarificado del zumo de naranja.

Membrana	Índice de ensuciamiento (%)	Ensuciamiento irreversible
GR60PP	94.92	0.095

Los datos obtenidos indican que se ha alcanzado un valor del 94.92 % para el índice de ensuciamiento, siendo este valor muy elevado ya que lo que nos indica este índice de ensuciamiento es cuanto baja la permeabilidad después de pasar el producto, pero antes de la regeneración de la membrana, por lo que valores superiores al 90% son aceptables. Por otro lado, el grado de ensuciamiento irreversible para la membrana ha sido de 0.095, este valor tan bajo significa que la membrana no se ve afectada por el paso del producto. Estos excelentes resultados obtenidos tanto para el índice de ensuciamiento como para el ensuciamiento irreversibles son debidos en gran medida por utilizar la materia prima procedente de una clarificación anterior (apartado 4.1). Otros autores como Conidi et al. (2017) y Echavarría et al. (2012) obtuvieron datos inferiores para el índice de ensuciamiento y superiores para el ensuciamiento irreversible debido a que utilizaron zumo sin una clarificación previa. A raíz de los resultados obtenidos, para el índice de ensuciamiento y el ensuciamiento irreversible se puede estudiar la posibilidad de alargar los ciclos entre cada limpieza en el tiempo logrando así un aumento de la producción.

Por último, en las figuras 4.8 y 4.9 se muestra unas imágenes correspondientes a la membrana GR60PP capturadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB), siendo la figura 4.8 la membrana previa al uso y la figura 4.9 después de su utilización.

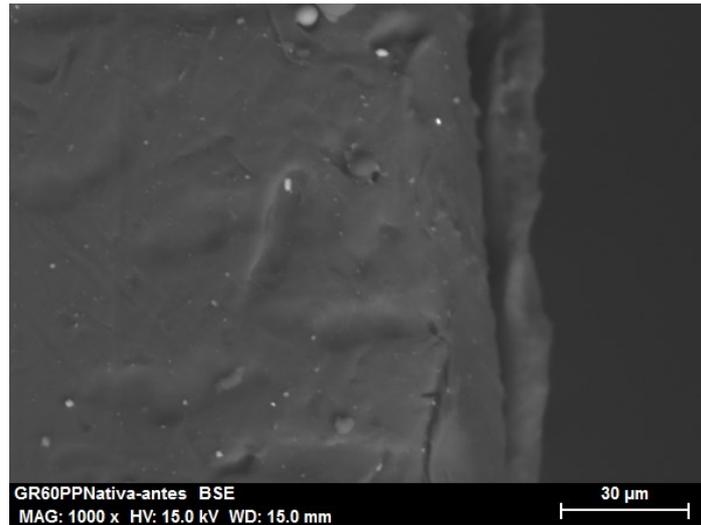


Figura 4.8. Microscopía electrónica de barrido para la membrana GR60PP antes de su uso.

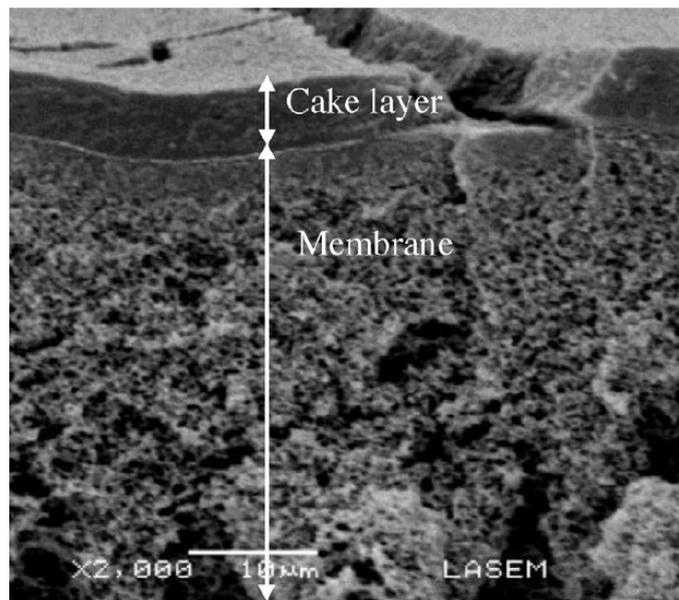


Figura 4.9. Microscopía electrónica de barrido para la membrana GR60PP después de su uso (Romero-Dondiz et al., 2015).

La imagen correspondiente a la figura 4.9, se ha obtenido por microscopía electrónica de barrido después de la filtración de aguas residuales sintéticas durante 4 horas (Romero-Dondiz et al., 2015). Esta membrana posee una estructura altamente porosa que provoca una mayor tortuosidad al fluido, ofreciendo una mayor resistencia al flujo. Las membranas de composición química polisulfona son susceptibles a la polarización por concentración y al ensuciamiento por deposición de polímeros (Mérián

y Goddard, 2012; Saha et al., 2009) que provoca una capa o torta en la superficie de la membrana como se remarca como “*cake layer*”.

En el anexo III, se muestra un esquema en forma de póster el cual fue presentado a las IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia.

4.3. Proceso de separación de azúcares

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

La sociedad está cada vez más concienciada sobre el contenido de azúcares en las bebidas de zumos. La situación en España, similar al resto de los países de la Unión Europea, exige que el aporte de azúcar en las bebidas de zumos sea de manera natural y algunas comunidades autónomas están trabajando en implementar algún tipo de impuesto similar al existente en el Reino Unido donde gravan a las bebidas azucaradas. Con la nueva ley del Gobierno aprobada en 2020 que grava a las bebidas azucaradas y edulcoradas, aún se hace más importante el poder conseguir azúcares naturales procedentes de la fruta.

Debido a esta problemática, en la presente Tesis se ha intentado dar solución al exceso de azúcar añadida en refrescos y bebidas. Para ello, se ha buscado separar azúcares naturalmente presentes a partir de extractos de piel de naranja y limón que son un subproducto en la industria de los cítricos.

Al igual que en los apartados anteriores, se ha utilizado una filtración por membranas, pero buscando en este caso un tamaño de poro que hiciese posible la separación de los azúcares. Por ello se ha considerado utilizar membranas de nanofiltración para llevar a cabo los ensayos.

Las condiciones se fueron modificando durante todo el proceso, como muestra la tabla 4.13 hasta que comenzó a permear el producto. A partir de este momento, se tomaron muestras cada 15 minutos de las corrientes de permeado y de rechazo. Inicialmente, la temperatura del producto fue de 6.5 °C y se recirculó el producto para su acondicionamiento. Para ello, el producto se calentó con la adición de vapor hasta una temperatura de 16.5 °C, pero se produjo un descenso de los grados brix. A partir de este momento, se detuvo el vapor.

Al arrancar el ensayo, el caudal de permeado obtenido tuvo el valor más alto y descendió conforme avanzaba el tiempo de experimentación. En contraposición al caudal, los grados brix de las corrientes de permeado y de rechazo se fueron concentrando al igual que en los ensayos de Almazán et al. (2013) que utilizaron una membrana de mismo corte molecular para concentrar zumo de pomelo. Esto es debido al aumento de presión y temperatura a lo largo del ensayo, ya que fueron aumentando su valor a lo largo del experimento provocando esta concentración. A continuación, en las figuras 4.10 y 4.11 se muestran dos fotografías donde se pueden apreciar diferentes muestras recogidas de las corrientes de permeado y de rechazo a diferentes tiempos de operación.

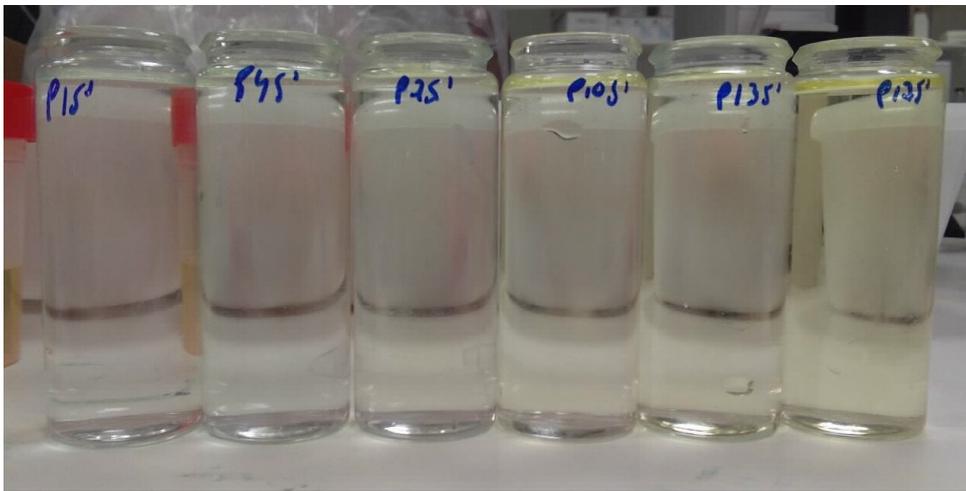


Figura 4.10. Muestras de la corriente de permeado a diferentes tiempos.

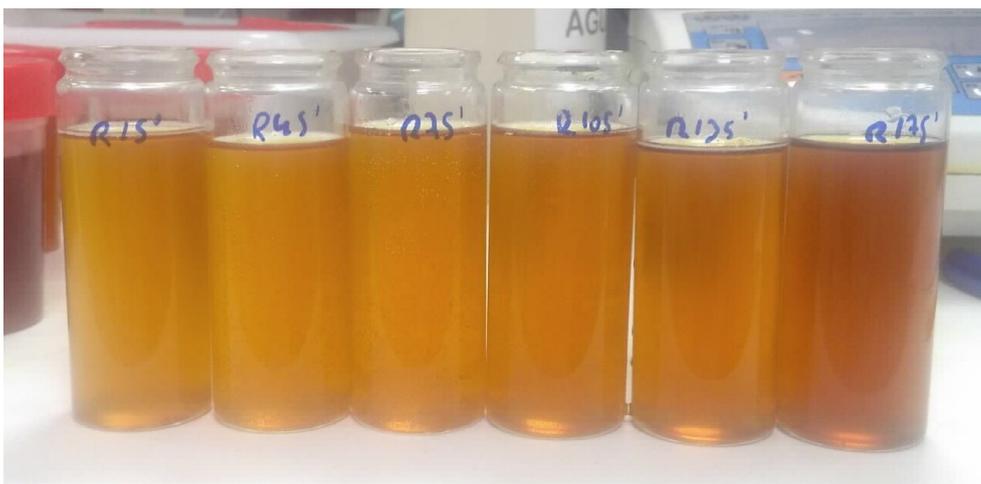


Figura 4.11. Muestras de la corriente de rechazo a diferentes tiempos.

En las figuras, las muestras se corresponden con las corrientes de permeado y rechazo respectivamente, mostrándose de izquierda a derecha la evolución del color conforme avanzaba el tiempo. Para el caso del permeado, evoluciona de incoloro a un ligero color amarillo, pero sin perder la transparencia. Por otro lado, la evolución del color con el tiempo es más acusada para la corriente de rechazo, pasando de un amarillo dorado a ámbar. Esta evolución en ambas corrientes se debe a diversos factores como son la evolución de la presión y temperatura durante el ensayo, ya que no se disponía de una columna de refrigeración para mantener constantes estas variables. El aumento de temperatura fue estudiado por Álvarez-Quintana et al. (2020), comprobando que provoca dos efectos, el primero de ellos es el descenso de viscosidad que facilita el paso de producto a través de la membrana, el segundo de ellos y relacionado con el primero es el ensanchamiento del tamaño de poro. De igual modo, Soltane et al. (2013) estudió que un aumento de presión puede hacer que se facilite que los compuestos pasen a la corriente de permeado por modificación de la estructura.

Los principales azúcares presentes como son la glucosa, fructosa y la sacarosa se han analizado mediante cromatografía líquida de alta resolución. Para poder comparar las concentraciones de los diferentes azúcares en la tabla 4.14 se expresa en g/kg de materia seca (g/kg m.s.).

La tabla superior, pone de manifiesto las diferentes concentraciones de monosacáridos y disacáridos presentes en el *orange peel extract* y como se distribuyen después del proceso de nanofiltración. Luo et al. (2016) constataron que las membranas de nanofiltración son capaces de separar los azúcares monosacáridos de los disacáridos. García Martín (2014) también comprobó que al pasar por nanofiltración mostos y vinos se reducía entre un 30-60 % los azúcares dependiendo de la membrana utilizada, condiciones de operación y cantidad de azúcares presentes inicialmente. Por otro lado, David (2016) comprobó que con membranas de nanofiltración además de separar lactosuero también se puede separar la sacarosa.

Por último, se ha calculado mediante la ecuación 4.9 el factor de concentración de azúcares en la corriente de permeado, observándose que la glucosa y fructosa se concentran hasta 1.4 veces en el permeado.

$$\text{Factor de concentración} = \frac{C_p \text{ m.s.}}{C_a \text{ m.s.}} \quad (\text{Ecuación 4.9})$$

Siendo:

C_p m.s.: Concentración de azúcares en la corriente de permeado expresado en (g/kg m.s.)

C_a m.s.: Concentración de azúcares en la corriente de alimentación expresado en (g/kg m.s.)

Para completar la caracterización de las corrientes obtenidas se han realizado los análisis que se muestran en la tabla 4.15.

Para resumir el proceso de obtención de azúcares, se ha realizado el diagrama de la figura 4.12 donde se muestran las diferentes corrientes que se obtienen con los principales compuestos que se separan en las etapas de ultrafiltración y nanofiltración.

4.4. Estudios de vida útil de los productos clarificados obtenidos

La seguridad alimentaria es uno de los pilares fundamentales en la cadena de suministro en el sector alimentario. Por ello, es de vital importancia evaluar eficazmente la vida útil de los productos que se comercializan. Para ello, establecer que factores son los que limitan la vida útil y que acciones encaminadas a alargar la caducidad son esenciales en estos días. Los principales factores que puede causar cambios son los químicos, físicos y biológicos que causan una modificación en las cualidades organolépticas de los alimentos (Casp y Abril, 2003).

La calidad de un alimento está en continuo cambio, es decir, es un estado dinámico que se mueve siempre hacia niveles más bajos (Casp y Abril, 2003). Como se ha comentado anteriormente, la vida útil de un alimento es el tiempo finito que en condiciones controladas de almacenamiento un producto es capaz de mantener su propiedades microbiológicas y sensoriales en unos niveles de aceptación tales que garanticen la seguridad de los consumidores.

En base a esta premisa se definen la fecha de caducidad y consumo preferente, donde el tiempo máximo para consumir un alimento con seguridad viene marcado por la fecha de caducidad, mientras que el tiempo que el producto conserva todas sus propiedades sensoriales viene estipulado por el consumo preferente (Inungaray y Reyes,

2013). Una de las causas del establecimiento de estas fechas de consumo viene marcadas por la naturaleza de las materias primas que componen el alimento.

Uno de los parámetros que mejor definen a un zumo de frutas son las propiedades sensoriales del producto. Entre estas, el color es la primera característica que valora el consumidor, por lo que el color inicialmente es el que mejor define a un zumo (Martínez et al., 2010), aunque también ciertos aspectos fisicoquímicos (Mariné, 1981). Al mismo tiempo que los alimentos ofrecen olor, color y sabor, presentan propiedades mecánicas y reaccionan frente a la deformación como el producido al masticar, tocar, morder o estrujar (Manayay y Ibarz, 2010). Un ejemplo de estas modificaciones son las que se presentan en los chicles o gomas de mascar. Por otro lado, se pueden evaluar este comportamiento mediante métodos físicos, en donde el valor no depende del individuo ya que se realiza la medición instrumentalmente (Muller y González, 1978; Barbosa-Cánovas y Ibarz, 2005).

De los diferentes productos obtenidos, se han seleccionado para mostrar en la presente Tesis Doctoral los dos productos que en principio poseen más potencial comercial para venta directa. Estos productos son: *orange peel extract* y *lemon peel extract*. La justificación para seleccionar estos dos productos recae, en el volumen que se espera procesar en los próximos años, el alto porcentaje de aplicabilidad y la demanda actual del mercado. Los estudios de vida útil realizados se han dividido en dos tipos de controles, uno sensorial mediante catas y otro de seguridad donde se engloban los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos. Además, se han estudiado en dos condiciones de tratamiento y almacenamiento diferentes:

- ✚ Producto aséptico refrigerado
- ✚ Producto no aséptico congelado

Algunos autores como Moazzem et al. (2019) han estudiado como ampliar la vida útil con preservantes, aunque en la actualidad el rechazo de la sociedad por este tipo de técnicas está haciendo que esta vía no sea la más popular entre los consumidores. Cobra mucha importancia estudiar los posibles efectos que tienen los tratamientos de conservación con el fin de comprender los mecanismos que llevan a modificar los atributos o características de los alimentos.

Un producto envasado asépticamente, por norma general tendrá una vida útil mayor que si se ha envasado sin tratamiento térmico. Es común en la industria de los

zumos realizar un tratamiento térmico para su conservación, pero debido al coste del proceso se siguen estudiando alternativas más económicas (Llorens, 2018). En el supuesto caso que se opte por no dar tratamiento térmico es necesario que las condiciones higiénicas tanto en el diseño previo de la instalación como durante todo el proceso de elaboración, equipos utilizados, tanques y líneas sean impecables para evitar que el producto final contenga una carga microbiana siendo un peligro de seguridad alimentaria. Cabe destacar que dar un tratamiento térmico no elimina todos los microorganismos (ya que algunos de ellos no se eliminan a las temperaturas de pasteurización habituales en la industria) ni las posibilidades de volver a contaminarse en el llenado por falta de limpieza (Grande et al., 2015).

La utilización de membranas de ultrafiltración ayuda a evitar ciertos microorganismos ya que por tamaño no atraviesan las membranas mientras que las características funcionales de los zumos de frutas contienen un alto valor nutricional ya que poseen vitaminas, minerales y antioxidantes se mantienen intactas (Castro y Gerla, 2005). Del otro lado, si se quiere asegurar que el zumo en seguro en condiciones de refrigeración se debe pasteurizar con las consecuencias que tiene como es el pardeamiento del color.

4.4.1. Evolución de los parámetros fisicoquímicos.

Contenido inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Orange peel extract clarificado

El zumo de naranja y sus derivados es de las bebidas más populares y consumidas a nivel mundial (Rouseff et al., 2009), entre otras razones por sus agradables propiedades organolépticas (Fernández et al., 2010), destacando el color entre los consumidores habituales (Meléndes-Martínez et al., 2004). Es por ello, que el color ocupa un lugar preferente, incluso puede llegar a dar una idea acerca del estado microbiológico del producto (Muñoz, 2016). Para poder entender el cambio de color se han controlado diferentes parámetros fisicoquímicos a lo largo del tiempo.

Para la caracterización de los parámetros fisicoquímicos se han elaborado las tablas 4.16 y 4.17 donde se describen los parámetros analizados a lo largo del estudio de vida útil diferenciando por tipo de almacenamiento, siendo la tabla 4.16 para el almacenamiento en refrigerado con un tratamiento térmico y la tabla 4.17 para el almacenamiento en congelado.

Las condiciones del tratamiento térmico utilizado han sido mediante llenado de botellines de vidrio, sumergidos en un pasteurizador de laboratorio durante 5 minutos a una temperatura de 95-100 °C

Como se puede observar en las tablas, el estudio se ha realizado por un periodo de tiempo de 12 meses, con un número total de seis controles, con un intervalo de 3 meses entre cada control salvo para el inicio del estudio que se analizó al mes de la fabricación. El control realizado en el primer mes se elabora para observar qué cambios ocurren en las primeras semanas de almacenamiento y controlar así mejor su evolución.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos analizados, se puede apreciar que los grados brix se mantienen constantes a lo largo del tiempo en ambos casos que presentan diferentes condiciones de almacenamiento. Ocurre lo mismo con el pH y la acidez. No ocurre de igual manera con la vitamina C donde se observa un descenso a lo largo del tiempo que puede provocar una alteración del color tal y como indica Muñoz (2016) donde la razón principal es la oxidación del ácido L-ascórbico a furfural. Cabe destacar que a tiempo cero y durante todo el estudio el valor de vitamina C es superior en congelado que en aséptico refrigerado, debido principalmente a la oxidación por el tratamiento térmico ejercido sobre el zumo.

En cuanto a los parámetros que marcan el color y la turbidez, como son la absorbancia y el porcentaje de transmitancia, se han medido a una longitud de onda de 430 y 625 nm respectivamente. Ambas mediciones se hicieron mediante una dilución del producto a los grados brix de referencia que para los productos de naranja es de 11.2.

La transparencia de un zumo clarificado es un parámetro crítico de control ya que en el mercado uno de los requisitos que normalmente marcan su venta es que tenga un mínimo de porcentaje de transmitancia. Para los productos cítricos, como es el caso del *orange peel extract*, el mínimo del porcentaje de transmitancia se encuentra en torno al 90-95% por lo que con los datos obtenidos todo ellos superiores al 95% en ambos tipos de almacenamiento, siendo el descenso inferior a un punto porcentual a lo largo del estudio. Se puede afirmar que el producto mantiene un mínimo de 95% de transmitancia durante el primer año.

La absorbancia es una medida muy útil para controlar el color. En zumos clarificados, y sobre todo en los cítricos, al contrario que con el porcentaje de

transmitancia, no hay un valor de referencia que marque un producto apto o no apto. Influye más la finalidad del producto, la dosis y como afecta a la mezcla final. No obstante, valores por encima de 0.3 para naranjas son ya críticos. Los valores obtenidos en cada control y en las diferentes condiciones de almacenamiento no han superado en ninguno de los casos el valor de 0.3 por lo que al menos durante el primer año el color seguirá siendo atractivo para el consumidor, pero sí que ha existido una evolución desde el día de fabricación hasta el final del estudio, siendo un aumento del 40% aproximadamente. Este aumento se produce en las primeras semanas y luego se mantiene prácticamente constante.

Los análisis microbiológicos realizados han sido mohos, levaduras y recuento total medidos en unidades formadoras de colonias por mililitro siguiendo los métodos microbiológicos 2, 3 y 4 de la Asociación Internacional de Zumos de Frutas y Verduras (IFU). En este caso, para el producto aséptico es considerado aptos valores inferiores a 1 mientras que para el producto no aséptico son aptos valores inferiores de 100 para mohos, 500 para levaduras e inferiores a 1000 para el recuento total. Es muy común ver estos límites en cualquier ficha técnica de empresas comercializadoras de zumos y concentrados. Pitt y Hocking (2009) y De Souza et al. (2010) describieron que entre las especies de levaduras alterantes destacan *Saccharomyces*, *Dekkera*, *Kloekera*, *Rhdotorula*, *Candida*, *Zygosaccharomyces* y *Torulaspota*.

Aunque el pH bajo de los cítricos pueda ser una barrera para el crecimiento y supervivencia de los microorganismos (Grande et al., 2015) frente a otros zumos de pH más elevado con la sandía o el melón (Lima et al., 2009; Molinos et al., 2008) es posible que las levaduras crezcan en medios ácidos y bajas temperaturas pudiendo provocar turbidez, sedimentos, producción de gas, incluso separación de fases (Jay y Anderson 2001; Pitt y Hocking, 2009).

Con el proceso de filtración aplicado Gialleli et al. (2016) estudió la estabilización microbiana y Papafotopoulou-Patrinoi et al. (2016) junto con Lipnizki (2010) observó que la filtración por membranas reduce la contaminación microbiana por lo que los valores obtenidos en la presente Tesis para producto no aséptico son tan favorables en parte, debido al proceso de filtración aplicado. El inconveniente que Fuenmayor et al. (2014) determinaron fue debido a la colmatación que sufren las membranas. En este caso, los resultados obtenidos son muy positivos como se puede observar en las tablas 4.16 y 4.17.

El aumento del color puede tener varios orígenes, y se pueden dividir en dos grupos, oxidación enzimática y no enzimática. Mientras que el pardeamiento enzimático implica la oxidación enzimática de los derivados del anillo benceno, seguido de algunas transformaciones no oxidativas y una polimerización final (Braverman, 1980), el pardeamiento no enzimático se corresponde con tres mecanismos: reacción de Maillard, caramelización y oxidación del ácido ascórbico. En los zumos y concentrados según los estudios de Ibarz et al. (1989) el pardeamiento es debido principalmente a las reacciones de Maillard entre los azúcares reductores y grupos amino libres.

A continuación, en la figura 4.13 se compara al final del estudio el color visual de la muestra que se ha mantenido en congelación (muestra de la izquierda) frente a la muestra que ha estado en refrigeración (muestra de la derecha).



Figura 4.13. Comparativa entre *orange peel extract* clarificado al final del estudio en congelado (izquierda) y refrigerado (derecha).

Como se puede observar el color ha evolucionado en mayor medida en refrigeración que en congelación. Una de las posibles razones por la modificación del color como indica Martínez et al. (2010) es la temperatura que sufre el producto durante la pasteurización. Sánchez et al. (2013) también estudiaron la influencia negativa de la pasteurización en el pardeamiento. Como describen Toribio y Lozano (1986), Stamp y Labuza (1983) y Singh et al. (1983) los cambios producidos son debidos a las reacciones de pardeamiento no enzimático entre azúcares reductores y aminoácidos mediante una

cinética de orden cero para zumos y sus derivados. Por otro lado, según Abets y Wrolstad (1979) y Skrede (1985) la destrucción de los pigmentos presentes en las frutas se degrada siguiendo una cinética de primer orden. Debido a la complejidad de las reacciones implicadas, resulta difícil establecer un mecanismo de reacción y un modelo cinético que describa de manera global el proceso de pardeamiento. Por otro lado, Beveridge y Harrison (1984) afirma que mayores concentraciones de sólidos solubles favorecen este oscurecimiento.

Además del color, los pardeamientos enzimáticos modifican el sabor y aroma mediante una serie de reacciones complejas de caramelización y oxidaciones del ácido ascórbico. La formación de melanoidinas ocurre en las denominadas reacciones de Maillard (Hodge 1953; Cornwell y Wrolstad 1981) que dependen del pH del medio, temperatura, tipo de sustrato y concentración inicial del producto (Huang y Feather, 1988).

Como se puede apreciar en la figura representada, donde los puntos rojos son condiciones no asépticas y congeladas mientras que los puntos azules se corresponde al producto aséptico y refrigerado, existe un paralelismo en la evolución de la absorbancia con el tiempo. La principal diferencia radica en el valor de la absorbancia de partida, ya que para las condiciones asépticas fue bastante superior respecto del producto sin tratamiento térmico debido a la pasteurización recibida. Cabe mencionar que el mayor aumento de la absorbancia se produce durante los primeros meses de almacenamiento.

En esta figura, los colores de los puntos representan el mismo almacenamiento que en la figura anterior, pero en este caso el parámetro analizado ha sido el porcentaje de transmitancia. Al igual que para la absorbancia, el comportamiento en ambos almacenamientos es muy similar disminuyendo con el tiempo. Esta ligera turbidez que se forma con el paso del tiempo, Muñoz (2016) aporta que depende de los sólidos en suspensión presentes en el extracto.

Lemon peel extract clarificado

El limón en el sureste español posee una especial relevancia y, de forma destacada, en la Región de Murcia es de gran importancia tal que es considerada como “el limonar de Europa”. Por esta razón, no se ha podido obviar la obtención de este subproducto obtenido a partir de las pieles de los cítricos.

Para la caracterización de los parámetros fisicoquímicos se han elaborado las tablas 4.18 y 4.19 donde se describen los parámetros analizados a lo largo del estudio de vida útil diferenciando por tipo de almacenamiento, siendo la tabla 4.18 para el almacenamiento en refrigerado con un tratamiento térmico y la tabla 4.19 para el almacenamiento en congelado.

Del mismo modo que para el *orange peel extract*, las condiciones del tratamiento térmico utilizado han sido mediante llenado de botellines de vidrio, sumergidos en un pasteurizador de laboratorio durante 5 minutos a una temperatura de 95-100 °C.

Como se puede observar en las tablas, el estudio se ha realizado por un periodo de 12 meses, de igual modo que se ha procedido con el *orange peel extract*, con un número total de seis controles, con un intervalo de 3 meses entre cada control salvo para el inicio del estudio que se analizó al mes de la fabricación. El control a un intervalo de tiempo de un mes se realiza para determinar los cambios que ocurren en las primeras semanas de almacenamiento y controlar así mejor su evolución.

Los parámetros fisicoquímicos controlados han sido los grados brix, porcentaje de acidez, pH, vitamina C, porcentaje de transmitancia y absorbancia. Los grados brix y el porcentaje de acidez se han mantenido prácticamente invariables a lo largo del tiempo. A diferencia del *orange peel extract*, el nivel de concentración del producto es mucho mayor para ahorrar en costes, tanto de almacenamiento como logísticos ya que se prevé una buena salida de este producto pues encaja en el mercado asiático por sus características, pero Martínez et al. (2010) indicó que además de la temperatura, otra variable que influye en el pardeamiento de los zumos es su contenido en sólidos solubles. Con la vitamina C no ocurre lo mismo, ya que disminuye lentamente con el paso del tiempo desde que se ha producido. Al igual que con el *orange peel extract* la vitamina C de partida es menor en el caso del producto aséptico, debido al tratamiento térmico que se le aplica.

En cuanto a los parámetros que marcan el color y la turbidez, como son la absorbancia y el porcentaje de transmitancia, se han medido a una longitud de onda de 430 y 625 nm respectivamente. Ambas mediciones se hicieron mediante una dilución del producto a los grados brix de referencia que para los productos de limón es de 8.

El porcentaje de transmitancia es un parámetro de control en los clarificados de limón. Usualmente se establece en el mercado internacional un mínimo del 90% de

transmitancia para este tipo de productos, aunque algunos clientes más exigentes llegan a solicitar valores superiores al 95%. Los resultados obtenidos en todos los controles superan el 90% a lo largo del primer año de almacenamiento, por lo que el producto es apto.

Al igual que el porcentaje de transmitancia, otro parámetro importante es la medida de la absorbancia, que para los productos de limón suele marcarse un máximo de 0.6 a los grados brix de referencia que para el limón es 8. Este producto al servir como acidulante natural, normalmente se utiliza como un ingrediente más en formulaciones, por tanto, el color, aunque más oscuro que para la naranja, depende de la dosis utilizada para la aceptación final. Aun así, los valores obtenidos son inferiores a 0.6 por tanto el producto no se degrada a niveles que no sea apto.

Para el *lemon peel extract* clarificado, los análisis microbiológicos utilizados han sido mohos, levaduras y recuento total medidos en unidades formadoras de colonias por mililitro siguiendo los mismos métodos que para el *orange peel extract*. En este caso, para el producto aséptico es considerado aptos valores inferiores a la unidad mientras que para el producto no aséptico son aptos valores inferiores de 100 para mohos, 500 para levaduras e inferiores a 1000 para el recuento total. Es muy común ver estos límites en cualquier ficha técnica de empresas comercializadoras de zumos y concentrados. Para el caso en estudio, como se aprecia en las tablas 4.18 y 4.19 los resultados microbiológicos obtenidos son muy favorables y por tanto aceptables dentro de los rangos establecidos.

Respecto a la evolución sufrida por el color, los productos clarificados del limón son muy sensibles a la temperatura, donde en las etapas de procesado y posterior concentración a niveles altos pueden producirse fenómenos de caramelización. Por lo general, se ha estado utilizando la adición de bisulfito como medio conservante, para evitar así el tratamiento térmico, pero cada vez más se está optando por la congelación debido al rechazo de la sociedad a utilizar conservantes. Además, las bajas temperaturas ayudan a mitigar el efecto del deterioro por los pardeamientos no enzimáticos, donde los componentes involucrados son los azúcares reductores, aminoácidos, polifenoles y los ácidos orgánicos (Babsky et al., 1986).

A continuación, en la figura 4.16 se ha comparado el color visual de los diferentes almacenamientos al final del estudio, correspondiendo la muestra de la izquierda al

producto congelado y la muestra de la derecha se corresponde con el producto aséptico y refrigerado.

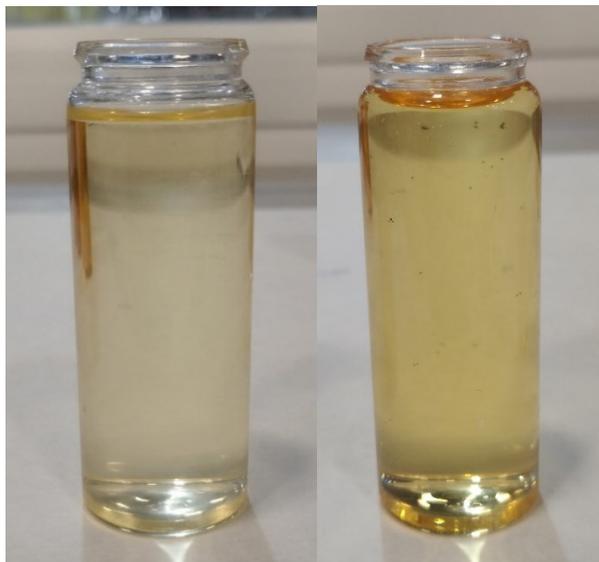


Figura 4.16. Comparativa entre *lemon peel extract* clarificado al final del estudio en congelación (izquierda) y refrigerado (derecha) diluido a 8 grados brix.

En la figura, se puede observar la diferencia de coloración al final del estudio, siendo la muestra almacenada en refrigeración (a la derecha) la más oscura. En este caso, se comparan ambas muestras a los grados brix de referencia, que para el limón es 8, esto es debido al grado de concentración que tienen las muestras, ya que a nivel visual se presentan demasiado oscuras como para apreciar las diferencias existentes.

Como se ha puesto de manifiesto, estos oscurecimientos que se producen son debidos principalmente a los pardeamientos no enzimáticos. Una de las causas es debida a la presencia de azúcares reductores que reaccionan con grupos amino presentes en los zumos (Garza et al., 1996). Por suerte, en los cítricos, junto con los azúcares reductores está presente la sacarosa que no interviene directamente en este proceso, pero no todo son ventajas, puesto que esta sacarosa puede hidrolizarse a altas temperaturas para formar glucosa y fructosa, siendo favorecida esta reacción por medios ácidos.

Por tanto, para evitar pardeamientos no enzimáticos, habría que evitar la hidrólisis de los azúcares no reductores, en este caso la sacarosa, y tener un bajo contenidos de grupos amino. Esta segunda condición, es posible reducirla ya que, si se procesa fruta no excesivamente madura, se dispondrá de un menor contenido de estos

compuestos que durante la evolución de la fruta van aumentando poco a poco sobre todo en la fase final de maduración del fruto.

Las diferencias de color y turbidez entre cada uno de los tipos de almacenamientos estudiados se han representado en las figuras 4.17 y 4.18. donde se muestra la evolución temporal de la absorbancia y el porcentaje de transmitancia, respectivamente.

En ambas figuras, los puntos coloreados en rojo indican las condiciones de almacenamiento congeladas, mientras que en los puntos azules el almacenamiento fue refrigerado. Si se presta atención a la figura 4.17, se observa que existe una evolución de la absorbancia a lo largo del estudio, siendo más acusada durante el primer mes. Esta evolución en términos generales no se presenta como crítica ya que el uso final no es al 100%, sino que se puede utilizar para acidificar bebidas clarificadas. Por otro lado, en la figura 4.18 se aprecia un aumento de la turbidez conforme avanza el estudio hasta llegar al tercer mes que se detiene.

4.4.2. Evolución de las cualidades organolépticas

La evaluación organoléptica comprende un conjunto de técnicas que sirve para medir la respuesta de los consumidores. Los sentidos son los encargados de llevar a cabo esta tarea, y por tanto los catadores expertos tienen ampliamente desarrollados el gusto y el olfato. En la industria alimentaria, especialmente en el mundo vitivinícola los catadores expertos juegan un papel importante en la validación de los productos. En los zumos también se hace importante esa labor ya que además de la evolución propia del producto una vez envasado, se encuentran diferencias sensoriales a lo largo de la campaña de recogida de la fruta.

El ensayo ha sido realizado por un panel de 6 catadores expertos en el que se han puntuado diferentes cualidades de los productos estudiados y de sus diferentes tipos de almacenamiento. En la valoración sensorial, los catadores expertos deben puntuar del 1 al 4 respecto al aspecto, color, aroma, sabor y valoración global. En este caso, se ha identificado cada uno de los descriptores en función del producto estudiado.

En la tabla 4.20 se muestran las diferentes puntuaciones con la definición, donde, por ejemplo, para el aspecto un valor de 4 es que la muestra está totalmente clarificada siendo una puntuación de 1 si el producto presenta turbidez.

Tabla 4.20. Relación de puntuaciones en el examen sensorial.

Puntuación	4	3	2	1
Aspecto	Totalmente clarificado	Clarificado	Ligeramente turbio	Presenta turbidez
Color	Amarillo claro	Ámbar	Ligero oscuro	Caramelo
Aroma	Fresco, cítrico	Bueno, sin defecto	Ligero tostado	Tostado
Sabor	Excelente	Bueno, sin defecto	Presenta ligeros defectos	Amargo, tostado
Valoración Global	Excelente	Buena calidad	Mejorable	Rechazo

Una vez definidos los criterios a puntuar, cada uno de los catadores debe evaluar la muestra al tiempo de almacenamiento designado. Esta evaluación de cada catador se encuentra en el anexo IV para el *orange peel extract* en las dos condiciones de almacenamiento estudiadas y en el anexo V para el *lemon peel extract* en las mismas condiciones de almacenamiento. Posteriormente, se suma cada una de las puntuaciones y se realiza la media, creando para tal fin las tablas 4.21 y 4.22 para el *orange peel extract* y las tablas 4.23 y 4.24 para el *lemon peel extract*. En la suma final, la máxima puntuación posible es 20 y la mínima es de 5. Como criterio de aceptación se considera una valoración superior a 13 puntos que es el entero superior al valor medio que se puede alcanzar.

Tabla 4.21. Puntuación sensorial media del *orange peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4.00	4.00	4.00	3.83	3.83	4.00
Color	3.50	3.33	2.83	2.50	2.50	2.50
Aroma	3.17	3.17	3.00	2.83	2.83	2.50
Sabor	3.50	3.33	3.17	3.00	2.67	3.00
Valoración Global	3.67	3.50	3.33	3.00	2.83	2.83
Puntuación total	17.83	17.33	16.33	15.17	14.67	14.83

Tabla 4.22. Puntuación sensorial media del *orange peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4.00	3.83	3.83	3.83	3.83	4.00
Color	4.00	3.83	3.33	3.17	3.00	3.17
Aroma	3.83	3.83	3.50	3.33	3.33	3.17
Sabor	3.83	3.67	3.50	3.67	3.17	3.50
Valoración Global	4.00	3.83	3.50	3.50	3.33	3.33
Puntuación total	19.67	19.00	17.67	17.50	16.67	17.17

Tabla 4.23. Puntuación sensorial media del *lemon peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4.00	4.00	3.83	4.00	4.00	3.83
Color	3.17	3.17	2.17	2.00	2.00	2.00
Aroma	3.33	3.17	3.17	2.67	3.00	3.00
Sabor	3.50	3.33	3.33	3.17	3.17	2.83
Valoración Global	4.00	3.50	3.17	3.00	3.00	3.00
Puntuación total	18.00	17.17	15.67	14.83	15.17	14.67

Tabla 4.24. Puntuación sensorial media del *lemon peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00	3.83
Color	4.00	3.67	3.17	3.33	3.00	3.00
Aroma	3.83	4.00	3.50	3.33	3.67	3.67
Sabor	4.00	4.00	3.83	3.67	3.50	3.50
Valoración Global	4.00	4.00	3.50	3.67	3.33	3.33
Puntuación total	19.83	19.67	18.00	18.00	17.50	17.33

Los resultados medios obtenidos ponen de manifiesto que el almacenamiento en condiciones de congelación recibe una mejor aceptación en las valoraciones organolépticas frente al producto que ha sufrido un tratamiento térmico. Como contraprestación, el producto no aséptico, no es posible almacenarlo en refrigeración o ambiente debido a la proliferación de microorganismos que lo haría inutilizable. Además, el alto costo del transporte y almacenaje hace que en ciertos países no sea posible esta opción.

Aun obteniendo mejores resultados el producto en congelación, todas las valoraciones han estado por encima de 14.67 que se ha obtenido para el final del estudio del *lemon peel extract*. Por el contrario, las mejores puntuaciones se encuentran en los inicios de los estudios, haciendo hincapié en el producto congelado. Cabe destacar que el aspecto es un parámetro que obtiene una magnífica puntuación a lo largo de todo el estudio y en cualquiera de los tipos de almacenamiento o producto, esto es debido a que el producto en ningún momento pierde su transparencia.

Finalmente, con el fin de comparar la aceptación del producto en diferentes tipos de almacenamiento, se representa la puntuación media en cada control frente al tiempo de estudio para el *orange peel extract* (figura 4.19) y para el *lemon peel extract* (figura 4.20).

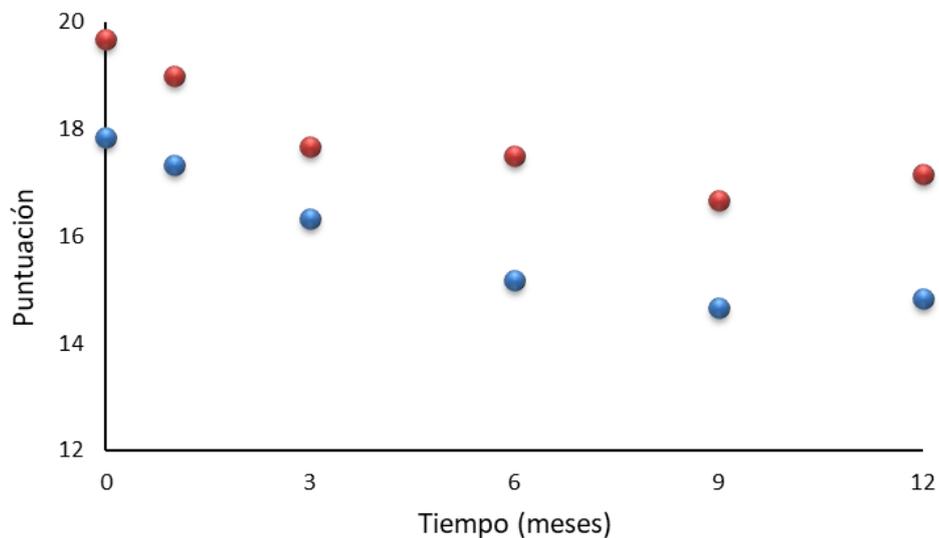


Figura 4.19. Representación de la evolución de la puntuación frente al tiempo para el *orange peel extract* en diferentes condiciones de almacenamiento. ● = Aséptico, refrigerado; ● = No aséptico, congelado.

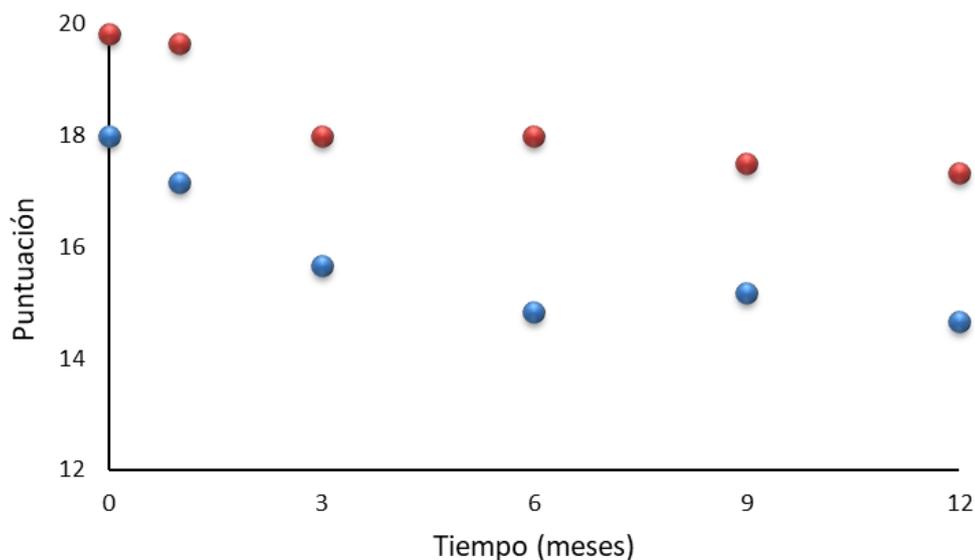


Figura 4.20. Representación de la evolución de la puntuación frente al tiempo para el *lemon peel extract* en diferentes condiciones de almacenamiento. ● = Aséptico, refrigerado; ● = No aséptico, congelado.

Como se puede observar en las figuras 4.19 y 4.20, la evaluación sensorial pone de manifiesto que si el producto no recibe ningún tratamiento térmico y por tanto se conserva en condiciones de congelación, la puntuación recibida es superior frente a la aplicación de una pasteurización y mantenimiento de refrigeración. Los resultados obtenidos coinciden con lo descrito por Osorio-Moya (2008), Lee y Coates (2003) y Manso et al. (2001) donde se estableció que si un zumo se expone a una pasteurización convencional para protegerlo de los microorganismos puede provocar cambios en las cualidades organolépticas que son perceptibles por los consumidores. Además, los consumidores son cada vez más exigentes con la calidad sensorial y nutritiva de los productos (Mejía y Osorio, 2012), por lo que continuamente se buscan métodos alternativos y más eficientes, pero debido a los altos costos, el tratamiento térmico sigue siendo el proceso más usado (Terpinc y Abramovic, 2010). Los efectos de la pasteurización fueron estudiados por Rivas et al. (2006), Osorio-Mora (2008) y Klopotek et al. (2005) para zumos de naranja, fresa y zanahoria obteniendo resultados similares.

A partir de las representaciones gráficas de las puntuaciones se puede establecer un criterio para descartar un producto a una determinada fecha. Esto es posible mediante una regresión lineal, donde fijando previamente una puntuación límite, se puede obtener a partir de que día el producto no se considera apto sensorialmente. En

este caso, no es necesario dicho cálculo puesto que el producto se mantiene correctamente durante todo el estudio.

4.5. Utilización de los extractos con propiedades bioactivas en el desarrollo de bebidas y preparados alimentarios.

4.5.1. Evolución del interés por la influencia de las propiedades bioactivas en zumos

Las frutas y verduras son esenciales en cualquier dieta, por tanto, cualquier producto que derive de ellas, se percibe como natural y saludable por su buena imagen entre los consumidores. Además, aportan fibra y poseen una capacidad antioxidante que le otorga múltiples beneficios para la salud (Rajauria y Tiwari, 2017). Bajo este prisma, la posibilidad de obtener compuestos bioactivos del procesado del zumo de cítricos se plantea como una alternativa viable dentro de los procesos de economía circular, puesto que estos extractos procedentes de la piel podrían ser utilizados como subproductos, en la obtención de compuestos de alto valor añadido. Es por ello, que los estudios relacionados con las propiedades bioactivas y su influencia en el cuerpo humano se ha visto incrementado en los últimos años. Para mostrar la importancia del tema objeto de estudio, se han realizado dos gráficas con el número de publicaciones y el número de citas de los últimos 10 años (periodo 2011-2020) respecto a las siguientes palabras clave:

 *Glycaemic index*

 *Postprandial*

 *Juice*

 *Citrus*

Se han seleccionado estas ‘keywords’ ya que están íntimamente relacionadas con el estudio realizado, puesto que se ha determinado el índice glicémico y la respuesta postprandial en bebidas a base de subproductos de la industria cítrica.

Las ‘keywords’ se han combinado de la siguiente manera:

Glycaemic index – Juice

Glycaemic index – Citrus

Postprandial – Juice

Postprandial – Citrus

En la figura 4.21 se muestran el número de publicaciones resultantes de la búsqueda bibliográfica durante los últimos 10 años (2011-2020) con las palabras clave citadas anteriormente.

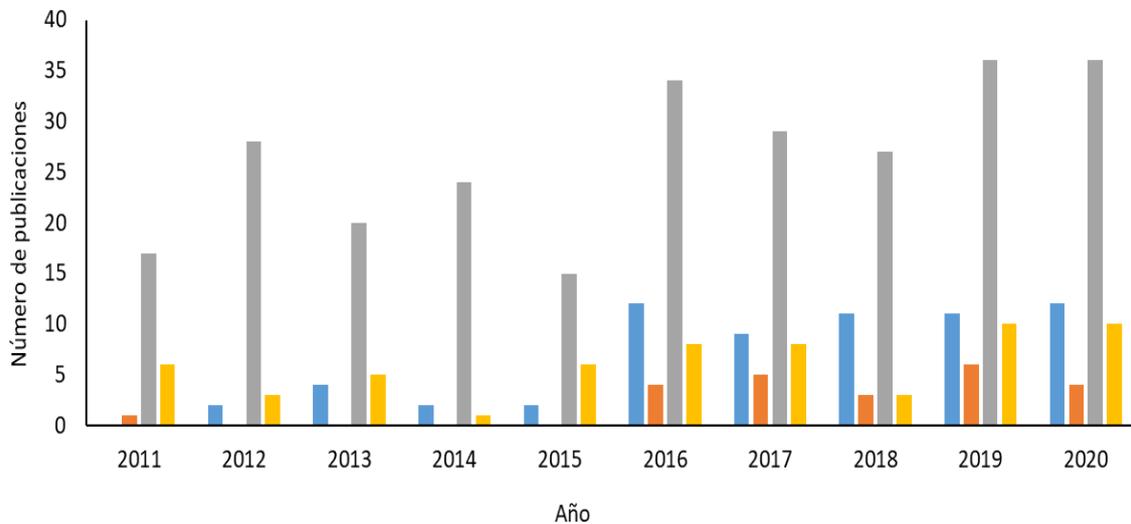


Figura 4.21. Número de publicaciones durante los últimos 10 años. ■ = *Glycaemic index and Juice*; ■ = *Glycaemic index and Citrus*; ■ = *Postprandial and Juice*; ■ = *Postprandial and Citrus*.

Como se puede observar, en los últimos años se han incrementado el número de publicaciones, sobre todo en la segunda mitad de la década frente a la primera mitad. La combinación de palabras clave que más publicaciones ha tenido durante el periodo 2011-2020 ha sido "*Postprandial and Juice*". En contraposición, "*Glycaemic index and Citrus*" ha sido la combinación menos usual. Esta búsqueda se ha realizado en la base de datos de "*Web of science*".

A continuación, en la figura 4.22 se muestran el número de citas bibliográficas durante los últimos 10 años con las palabras clave citadas anteriormente.

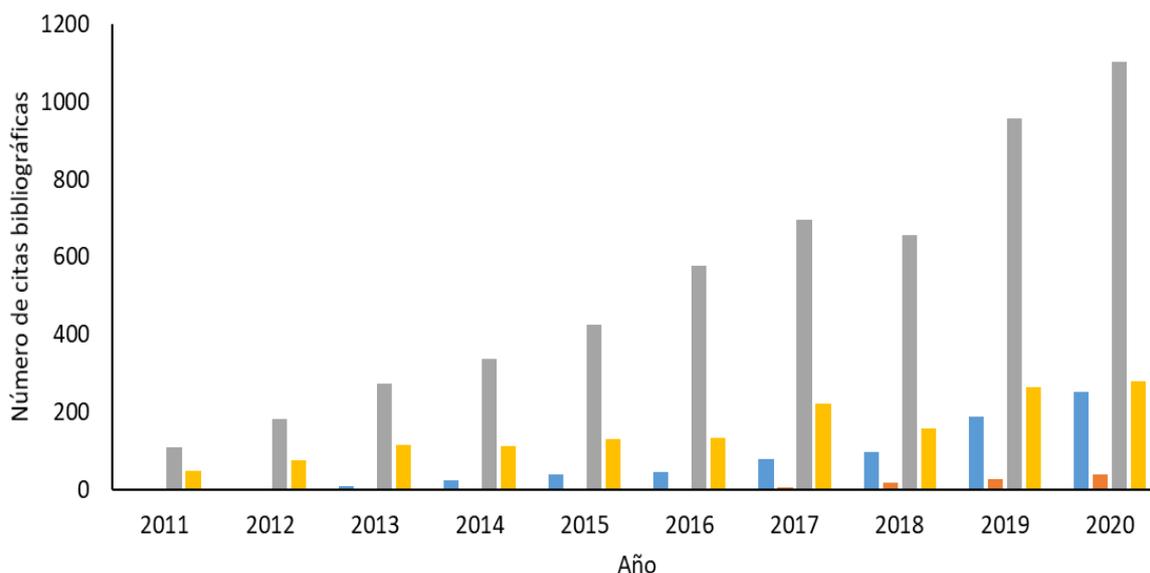


Figura 4.22. Número de citas bibliográficas durante los últimos 10 años. ■ = *Glycaemic index and Juice*; ■ = *Glycaemic index and Citrus*; ■ = *Postprandial and Juice*; ■ = *Postprandial and Citrus*.

En esta figura, cabe destacar el gran aumento de las citas bibliográficas en unos pocos años. Al igual que en la figura 4.21, la combinación de palabras clave “*Postprandial and Juice*” son las que mayor número de citas bibliográficas poseen con un aumento muy significativo a lo largo de la década. Estas dos gráficas ponen de manifiesto el interés creciente por la comunidad científica en los estudios relacionado con las propiedades de los zumos de frutas y su relación con la respuesta postprandial y el índice glucémico.

4.5.2. Procedimiento para la aprobación de los ensayos por el Comité de Bioseguridad en Experimentación

Para conocer el efecto de los nuevos ingredientes sobre la glucosa en sangre, se ha realizado un estudio in vivo doble ciego en la Universidad de Murcia desarrollado por el Grupo de Investigación de Nutrición y Bromatología. En los estudios llevados a cabo con personas/pacientes es necesario obtener previamente la autorización del Comité de Bioseguridad en Experimentación (Ref. ID: 2340/2019).

Para lograr la aprobación, se ha llevado a cabo una serie de informes que se detallan a continuación:

- Formulario Bioseguridad (anexo VI)
- Formulario de Bioseguridad para proyectos (anexo VII)

Una vez evaluados estos informes donde se incluyen los datos del solicitante, cualificación del equipo investigador, metodología, aspectos éticos, medidas de seguridad y protección de la salud, se emite un informe favorable por parte de la Comisión de Bioseguridad en Experimentación (CBE). Este informe favorable se ha incluido en el anexo VIII. A continuación, es necesario solicitar que la experimentación está incluida en una Tesis Doctoral mediante el formulario de Bioseguridad para Tesis Doctorales enmarcadas en proyectos previamente aprobados por el Comité de Bioseguridad (anexo IX).

Una vez, finalizados todos los procesos de documentación previa a los ensayos, se elaboró un tríptico que se presenta en la figura 4.23 con toda la información del estudio, con el fin de promocionar la captación de voluntarios.

ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN		Quién puede participar?
Desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos		<ul style="list-style-type: none"> Adultos sanos (18-50 años), que no tomen medicación, sin embarazo, no diabetes mellitus, enfermedad digestiva, ingesta de suplementos vitamínicos/minerales, con un IMC entre 20 y 30 kg/m², con peso corporal estable.
Beneficios del proyecto <ul style="list-style-type: none"> La extracción, separación y/o transformación de los azúcares naturales procedentes de cítricos permite incrementar el valor añadido y dotar de funcionalidad a ciertos alimentos. La obtención de bebidas saludables con azúcares propios de los subproductos de los cítricos, incorporándose así compuestos funcionales beneficiosos para la salud, como es la fibra, los flavonoides, etc. Mejora en el impacto medioambiental al suponer una valorización y mejor aprovechamiento de los residuos de la industria agroalimentaria, empleando los subproductos que contienen. 	Healthy Food <ul style="list-style-type: none"> La tendencia actual es la elaboración de bebidas refrescantes donde el aporte de azúcar proceda de la fruta y que además tenga un aporte de nutrientes elevado. 	Cómo se desarrolla el estudio? <ul style="list-style-type: none"> En cada día de estudio se hará la ingesta de una bebida a partir de fruta. Posteriormente se tomará una muestra de sangre mediante una punción en el dedo utilizando lancetas estériles de un solo uso.
	¿Qué buscamos en este estudio? <ul style="list-style-type: none"> Se espera determinar si al comparar la ingesta de una bebida convencional del mercado frente a la alternativa propuesta con un mayor contenido en azúcares procedentes de la fruta, el índice glucémico presenta variaciones. 	Duración del estudio? <ul style="list-style-type: none"> Cada participante acudirá una vez por semana al centro aproximadamente 3h por visita, cada 7 días y durante tres semanas.
		A qué me comprometo al participar? <ul style="list-style-type: none"> El participante se compromete a asistir a los 3 días del estudio. Este compromiso se verá recompensado con un lote de productos elaborados por AMC INNOVA a la finalización del estudio.
		Qué se evaluará en los participantes? <ul style="list-style-type: none"> Se evaluará el la evolución de la glucosa en sangre tras la ingesta de una bebida refrescante. Para ello, se le realizará un control 30 minutos. Con los resultados obtenidos se realizará una comparación entre una bebida convencional y la bebida refrescante propuesta.

Figura 4.23. Tríptico informativo sobre el estudio de investigación a realizar.

Por último, después de la selección de los participantes, se les hizo entrega de la hoja de información al participante que se incluye en el anexo X, donde contiene aspectos relacionados con los datos de los investigadores, derechos de los participantes, beneficios de la investigación, duración del estudio y riesgos e inconvenientes, entre otros. Además, también es necesario la entrega del consentimiento informado, que se encuentra disponible en el anexo XI, el cual informa al participante y éste firma, otorgando su consentimiento a la realización del estudio.

4.5.3. Desarrollo de los ensayos

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Los participantes en el estudio se han reclutado en la Universidad de Murcia. Todos ellos, adultos sanos, con edad superior a 18 años e inferior a 60, no diabéticos ni en estado de embarazo, sin enfermedades cardiovasculares, y sin tratamiento con fármacos que pudiesen alterar la glucemia en sangre. Se han reclutado un total de 16 sujetos (5 hombres y 11 mujeres). Todos han sido previamente informados de los objetivos y procedimientos y han firmado el consentimiento informado.

Los ensayos han consistido en un estudio cruzado doble ciego donde todos los participantes han recibido tres tratamientos (2 bebidas A y B, y una bebida control). Las bebidas A y B se han diseñado con una composición diferente en relación con la fuente de hidratos de carbono utilizada, pero en ambos casos la concentración de azúcares fue de 10.4% (ajustada a la utilizada normalmente en bebidas comerciales).

La bebida A es una bebida tipo néctar donde al menos el 50% procede de la fruta mientras que la bebida B se ha preparado a partir de concentrado de naranja clarificado en la misma dosis de fruta que para la bebida A. Obteniendo así dos productos de similares características, contenido en fruta, igual aspecto, color y sabor, al igual que la bebida control, se han administrado en una cantidad de 250 mL. El control fue preparado el día del ensayo diluyendo dextrosa en agua mineral hasta alcanzar la misma concentración. El estudio se ha diseñado con un periodo de lavado de siete días entre cada bebida administrada de tal manera que cada sujeto realiza el ensayo durante 3 semanas, programándose un solo día de toma de muestras durante un periodo total de 3 horas aproximadamente.

El día del ensayo, los participantes han de guardar un periodo de ayuno de 10 horas, y deben evitar la realización de ejercicio tanto la noche anterior como la mañana

del estudio. La toma de muestras se ha realizado en la Unidad de Nutrición y Bromatología (Edificio Vitalis) de la Universidad de Murcia, siguiendo los protocolos de bioseguridad.

Análisis de la glucosa en sangre

El día del ensayo, se procedió a la medición de la glucosa en ayunas de cada participante. Seguidamente se administra la bebida problema y se vuelve a realizar la medida a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos tras comenzar la ingesta. La toma de muestras se ha realizado utilizando el método de la hexoquinasa, mediante punción capilar en los dedos de la mano, con lanceta de un solo uso utilizando un Glucómetro Contour® XT. A continuación, se calcula el área bajo la curva de los incrementos de glucosa en sangre (IAUCs), mediante la regla del trapecioide, utilizando los datos individuales de cada sujeto en los días del ensayo. El índice glicémico de las bebidas se ha calculado mediante la ecuación 4.10.

$$IG = \frac{IAUCs\ bebida}{IAUCs\ control} \times 100 \quad (Ecuación\ 4.10)$$

La masa de cada participante se ha obtenido en ayunas durante la mañana del primero de los ensayos, en una balanza *OMHROM BF-508*, y la altura en un tallímetro de columna seca modelo 213. El índice de masa corporal (IMC) se ha calculado mediante la ecuación 4.11 como la masa corporal (kg) dividido por el cuadrado de la altura en metros.

$$IMC = \frac{masa\ corporal}{altura^2} \quad (Ecuación\ 4.11)$$

El tratamiento de los resultados se ha realizado utilizando el programa estadístico R. Los IAUCs de ambas bebidas se han calculado como el área marcada por los incrementos de la glucosa en sangre ignorando el área situada por debajo de la glucosa basal. Además, se ha realizado el test de Kolmogorov-Smirnov para analizar la normalidad de los datos, realizándose ANOVA o test no paramétricos (Wilcoxon) para contrastar las medias. Se han comparado tanto los índices glicémicos como el incremento de área bajo la curva entre las bebidas A, B y el control (10.4% de dextrosa). Por último, se han realizado análisis de correlación de Pearson entre las variables antropométricas, el sexo y los datos obtenidos.

A continuación, en la tabla 4.25 se muestran los datos descriptivos de los participantes en el estudio.

Tabla 4.25. Medidas antropométricas y características de los participantes.

Participante	Sexo	Masa (kg)	Altura (cm)	Edad (años)	IMC
1	F	68.4	164	51	25.43
2	M	73.0	184	40	21.56
3	M	93.0	169	36	32.56
4	F	62.0	162	32	23.93
5	F	54.0	161	35	20.83
6	F	74.0	177	42	23.50
7	F	56.1	168	21	19.89
8	M	81.5	190	39	22.57
9	M	77.7	176	44	25.08
10	F	68.0	164	42	25.28
11	F	58.0	158	48	23.23
12	F	60.0	166	23	21.77
13	M	68.8	175	21	22.22
14	F	58.0	160	22	22.65
15	F	56.0	170	45	19.37
16	F	74.0	161	57	28.54
	TOTAL	67.66±2.72 (54-93)	169.06±2.28 (158-190)	37.38±2.78 (21-57)	23.65±0.82 (19.37±32.56)

Todos los participantes pertenecen a la Universidad de Murcia, siendo estudiantes de grado, postgrado, personal docente y personal de administración y servicios.

En la tabla 4.26, aparecen los datos numéricos obtenidos (media y error estándar) de las IAUCs de las bebidas A, B y control. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de bebida, pero sí fueron significativamente inferiores ($p < 0.05$) de la bebida con la misma concentración de glucosa. Las gráficas resultantes se muestran en la figura 4.24, donde se han calculado las áreas restando la glucosa basal de cada participante en todos los puntos de las tres curvas obtenidas. Al analizar diferencias en este parámetro debidas al sexo,

encontramos valores superiores marginalmente en las mujeres (1775.0) con respecto a los hombres (1335.5), ($p < 0.05$).

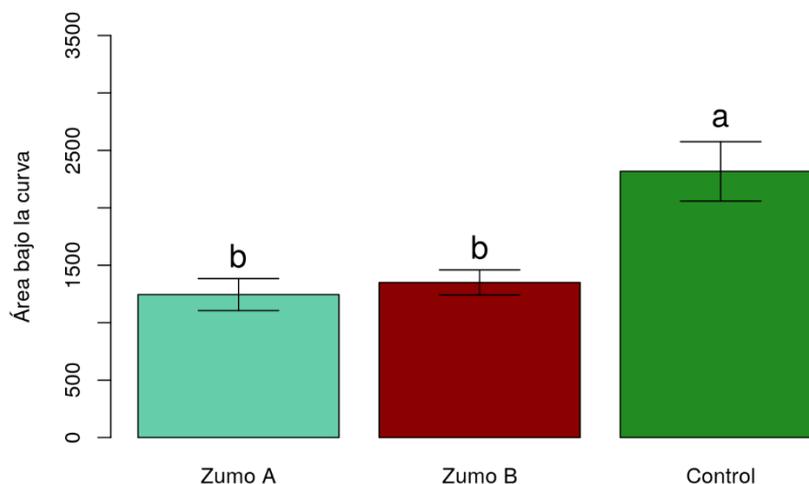


Figura 4.24. Diagrama de cajas obtenido con los valores medios de IUACs. Las barras verticales indican el error estándar, y diferentes letras en minúscula indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

A continuación, en las figuras 4.25, 4.26 se muestra una representación de la glucemia frente al tiempo para las bebidas A, B y control. En la primera de ellas (figura 4.25) la glucosa basal se resta al valor de glucemia mientras que en la figura 4.26 se representa directamente el valor obtenido.

El Índice glicémico indica si los hidratos de carbono llegan lenta o rápidamente a la sangre (Saltaouras et al., 2019), se considera elevado si es mayor de 70, medio si se sitúa entre 56 y 69, y bajo si es menor de 55. Para establecer estos valores se le asigna a la glucosa un valor de 100.

Los hidratos de carbono de los alimentos con bajo IG se digieren y absorben más despacio y son efectivos para controlar la glucosa postprandial en sangre (Lightowler et al., 2018). Según diferentes estudios de intervención, las dietas con bajo IG dan lugar a mayores beneficios sobre la salud en comparación con los alimentos con azúcares de absorción lento. El consumo abusivo de estos últimos, han contribuido a la epidemia de obesidad y a la aparición de diabetes tipo II y enfermedades cardiovasculares. El IG se ve afectado por múltiples factores, pero algunos componentes presentes de forma

natural en los alimentos pueden modificar el IG reduciendo la digestión y la absorción de los azúcares simples (Anderson et al., 2019). Es el caso de los alimentos ricos en polifenoles, como el café, el té verde, los frutos rojos o el zumo de granada (Xu et al., 2018).

El mecanismo parece estar relacionado con la inhibición parcial de enzimas digestivas como la alfa-amilasa y la alfa-glucosidasa, y por el retardo en el transporte de glucosa a través de la barrera intestinal. Los zumos de cítricos como el de naranja, contienen glucosa y fructosa, pero sin embargo su IG es menor que en alimentos con una concentración semejante de hidratos de carbono simples. La alta concentración en polifenoles como la hesperidina y la naringina en los cítricos pueden contribuir a este hecho (Kerimi et al., 2019).

Por último, se han realizado análisis de correlación para estudiar la posible variación de la glucosa en ayunas y IAUCs con el IMC o masa de los participantes. No se encontraron correlaciones estadísticamente significativas en ningún caso. La representación gráfica se presenta en las figuras 4.28,4.29.

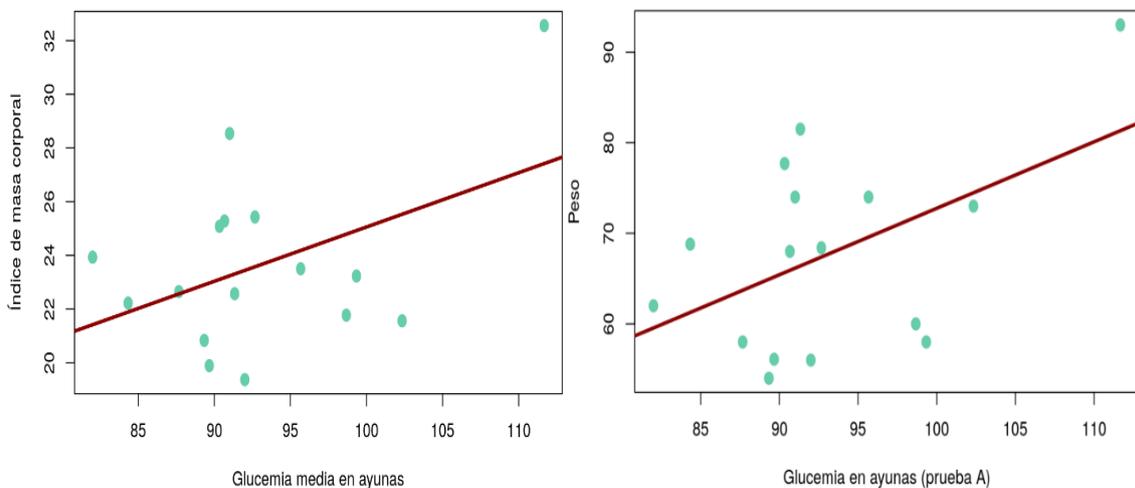


Figura 4.28. Correlación entre IMC y valores medios de glucemia en ayunas, diferencias marginalmente significativas ($p=0.086$) a la izquierda y a la derecha la correlación entre el peso y valores medios de glucemia en ayunas, diferencias marginalmente significativas ($p=0.055$).

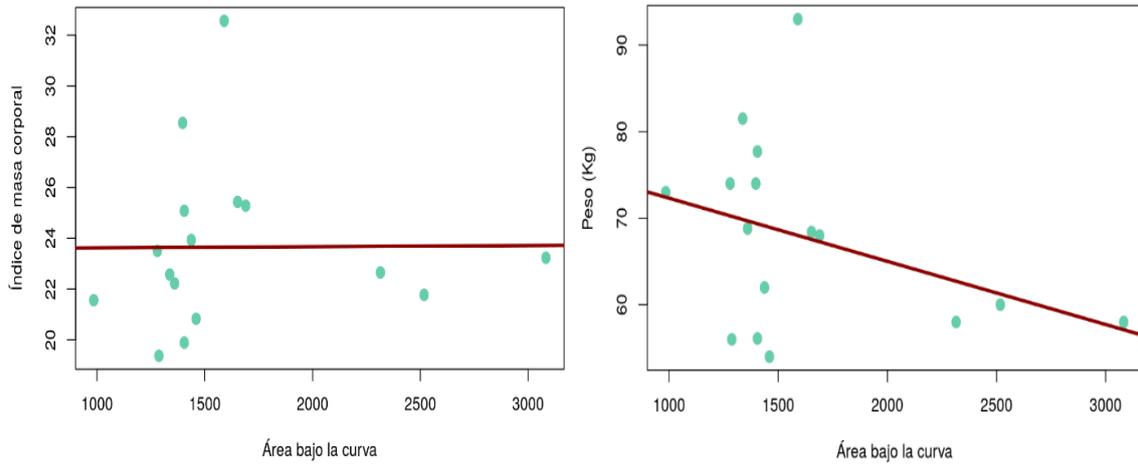


Figura 4.29. Correlación entre el IMC y el área bajo la curva ($\rho=0.28$) a la izquierda y correlación entre el peso y el área bajo la curva ($\rho=0.197$) a la derecha.

En el estudio realizado del análisis de correlación para estudiar la posible variación de la glucosa en ayunas y IAUCs con el IMC o peso de los participantes, no se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

La publicación de los resultados obtenidos en este apartado se plasma en el poster incluido en el anexo XII, presentado al II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias organizado por la Universidad de Almería.

5. CONCLUSIONES



5. Conclusiones

Contenido parcialmente inhibido autorizado por Comisión General de Doctorado de fecha 20/01/2022

Para ilustrar mejor las evidencias de la investigación, el tratamiento de los resultados experimentales obtenidos y sintetizar los razonamientos que han sido objeto de discusión en la presente Tesis Doctoral, se extraen las conclusiones en base a las hipótesis de partida y a los objetivos establecidos al inicio de la investigación.

De esta conclusión emanan los siguientes puntos de interés en cuanto al proceso productivo, parámetros fisicoquímicos y condiciones económicas:

- ✚ El clarificado producido posee una transparencia que desciende a lo largo del proceso de clarificación, pero en todo momento superior al 95 %, lo que hace cumplir con los estándares de calidad internacionales para un producto clarificado.

- ✚ De este modo, se consigue un ahorro energético y, por tanto, económico, en etapas posteriores de concentración, almacenaje y distribución del producto.
- ✚ Los parámetros fisicoquímicos más usuales como son los grados brix, el porcentaje de acidez, índice de formol, potasio y el pH prácticamente se mantienen invariables.
- ✚ Por otro lado, el porcentaje de pulpa y el porcentaje de transmitancia tienen una variación acusada debido al proceso de clarificación que logra retener el contenido en pulpa y pectinas principales causantes de la turbidez en el producto, pasando éstos a la corriente de rechazo.
- ✚ Los azúcares disacáridos como la sacarosa y monosacáridos como la glucosa y fructosa atraviesan la membrana.
- ✚ En ambos casos se ve descompensada la concentración de sacarosa y la relación glucosa/fructosa, esto es debido a que la composición de azúcares presentes en la corteza, que no es del todo similar al zumo y por la propia extracción enzimática llevada a cabo para producir el lemon peel extract y el orange peel extract previamente.

En el proceso de optimización de la corriente de permeado, destacan las siguientes conclusiones:

- ✚ Al tener una etapa previa de clarificación, los flujos de permeado y los rendimientos son elevados
- ✚ Con ambas membranas de ultrafiltración aumentan la transparencia del producto, Con este proceso de ultrafiltración se logra reducir la turbidez y viscosidad, obteniendo un producto más transparente, de aspecto y sabor más neutro, disminuyendo la percepción de amargor y aumentando así las posibles aplicaciones en bebidas de los productos obtenidos pudiendo alcanzar así una mayor cuota de mercado.
- ✚ En cuanto a los parámetros fisicoquímicos como son los grados brix, éstos descienden ligeramente debido a la eliminación parcial de compuestos que aumentan su valor, pero se mantiene constante el pH, porcentaje de acidez, índice de formol, potasio y ácido ascórbico.

- ✚ Los datos obtenidos para el índice de ensuciamiento del 94.92% indican que la permeabilidad después del paso del producto no se ve disminuida, siendo este valor muy positivo ya que lo que nos indica este índice de ensuciamiento es cuanto baja la permeabilidad después de pasar el producto, pero antes de la regeneración de la membrana. Por otro lado, el grado de ensuciamiento irreversible para la membrana ha sido de 0.095, este valor tan bajo significa que la membrana no se ve afectada por el paso del producto. Estos excelentes resultados obtenidos tanto para el índice de ensuciamiento como para el ensuciamiento irreversibles son debidos en gran medida por utilizar la materia prima procedente de una clarificación anterior.
- ✚ A raíz de los resultados obtenidos, para el índice de ensuciamiento y el ensuciamiento irreversible se puede alargar los ciclos entre cada limpieza en el tiempo logrando así un aumento de la producción entre limpiezas.

Durante el proceso de nanofiltración llevado a cabo para separar azúcares monosacáridos (glucosa y fructosa) de los disacáridos (sacarosa), los ensayos realizados han puesto de manifiesto que:

- ✚ Cabe destacar en este proceso, que el contenido en pectinas que aún quedaban tras la etapa de clarificación es totalmente rechazado en la etapa de nanofiltración, sin suponer un inconveniente para la misma.
- ✚ El aumento de color que se percibe a lo largo del proceso de nanofiltración pasando de incoloro a un ligero amarillo para la corriente de permeado, pero sin perder la transparencia, es debido en gran parte a dos factores como son la presión y la temperatura. El aumento de temperatura provoca dos efectos, el primero de ellos es el descenso de viscosidad que facilita el paso de producto a través de la membrana, el segundo de ellos y relacionado con el primero es el ensanchamiento del tamaño de poro. Un aumento de presión puede hacer que se facilite que los compuestos pasen a la corriente de permeado por modificación de la estructura.
- ✚ Por otro lado, la corriente de rechazo o retenido ve modificada su color durante el proceso, pasando de un amarillo dorado a ámbar. Este cambio se produce por la elevada concentración que se produce al trabajar por

“batches”, donde los grados brix se concentran aproximadamente en un 100%.

El estudio de vida útil realizado a los dos productos clarificados a partir de la piel de los cítricos, en dos condiciones de almacenamiento diferentes, aséptico refrigerado y no aséptico congelado, ha concluido con la certeza de que, al menos durante un año el producto es microbiológicamente seguro y organolépticamente satisfactorio. Además, durante este estudio se ha puesto de manifiesto que:

- ✚ Los parámetros fisicoquímicos analizados, como los grados brix se mantienen constantes a lo largo del tiempo en ambos tiempos de almacenamiento. Ocurre lo mismo con el pH y el porcentaje de acidez.
- ✚ En el contenido en vitamina C, se observa un descenso a lo largo del tiempo. Cabe destacar que a tiempo cero y durante todo el estudio, el valor de vitamina C es superior en congelado que en aséptico refrigerado, debido principalmente a la oxidación por el tratamiento térmico ejercido sobre el producto.
- ✚ Se puede afirmar que los dos productos mantienen los estándares de calidad mínimos exigidos para el porcentaje de transmitancia durante el primer año y en ambas condiciones de almacenamiento.
- ✚ Los resultados microbiológicos alcanzados en las diferentes condiciones de almacenamiento para los dos productos estudiados han puesto de manifiesto que la filtración por membranas reduce la contaminación microbiana, por lo que los valores obtenidos en la presente Tesis para el producto no aséptico sean tan favorables, es en parte, debido al proceso de filtración aplicado.
- ✚ Las valoraciones emitidas por el panel de catadores expertos concluyen que el producto en condiciones de congelación recibe una mejor aceptación en las valoraciones organolépticas frente al producto que ha sufrido un tratamiento térmico. Como contraprestación, el producto no aséptico, no es posible almacenarlo en refrigeración o ambiente debido a la proliferación de microorganismos que lo haría inutilizable. Además, el alto coste del transporte y almacenaje hace que en ciertos países no sea posible esta opción.

- ✚ A pesar de obtener mejores resultados el producto en congelación, todas las valoraciones han estado por encima de 14.67 que se ha obtenido para el final del estudio del *lemon peel extract*. Por el contrario, las mejores puntuaciones se encuentran en los inicios de los estudios, haciendo hincapié en el producto congelado. Cabe destacar que el aspecto es un parámetro que obtiene una magnífica puntuación a lo largo de todo el estudio y en cualquiera de los tipos de almacenamiento o producto, esto es debido a que el producto en ningún momento pierde su transparencia.

Tras la realización del estudio in vivo doble ciego elaborado en la Universidad de Murcia y desarrollado por el Grupo de Investigación de Nutrición y Bromatología se han llegado a las siguientes conclusiones:

- ✚ En el análisis de la importancia del estudio, se ha evidenciado que en los últimos años se han incrementado el número de publicaciones y de citas bibliográficas en el tema que ha sido objeto de estudio, sobre todo en la segunda mitad de la década frente a la primera mitad. La combinación de palabras clave que más publicaciones y citas bibliográficas ha tenido durante el periodo 2011-2020 ha sido "*Postprandial and Juice*". En contraposición, "*Glycaemic index and Citrus*" ha sido la combinación menos usual.
- ✚ Los datos numéricos obtenidos (media y error estándar) entre las IAUCs de las bebidas A, B no muestran diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de bebida, pero sí fueron significativamente inferiores ($p < 0.05$) de la bebida control con la misma concentración de glucosa. Al analizar diferencias en este parámetro debidas al sexo, encontramos valores superiores marginalmente en las mujeres (1775.0) con respecto a los hombres (1335.5), ($p < 0.05$).
- ✚ Los hidratos de carbono de los alimentos con bajo IG se digieren y absorben más despacio y son efectivos para controlar la glucosa postprandial en sangre.
- ✚ En el estudio realizado del análisis de correlación para estudiar la posible variación de la glucosa en ayunas y IAUCs con el IMC o peso de los participantes, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas en ninguno de los casos.

6. BIBLIOGRAFÍA



6. Bibliografía

Abad, V. (1984). *Historia de la naranja, 1781-1939*. Valencia, España: Comité Gestión Exportación Frutos Cítricos.

Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Sánchez-Ilárduya, M. B., Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F., y Alonso-Salces, R. M. (2014). Polyphenolic contents in Citrus fruit juices: authenticity assessment. *European Food Research and Technology*, 238(5), 803-818.

Abers, J. E., y Wrolstad, R. E. (1979). Causative factors of color deterioration in strawberry preserves during processing and storage. *Journal of Food Science*, 44(1), 75-81.

Agustí, M. (2003). *Citricultura*. Madrid, España: Mundi-Prensa.

Alfa Laval Iberia S.A. *Membrane filtration*. Disponible en: https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/membranes/it-is-all-about-size.pdf?_ga=2.142166327.466914206.1631475697-1730375740.1631475697 (consultado en octubre de 2019).

Alfa Laval Iberia S.A. *Flat sheet membranas for ultrafiltration - GR types*. Disponible en: <https://www.alfalaval.com/globalassets/documents/products/separation/membranes>

[/flat-sheet-membranes/uf-pht-flat-sheet-membranes_20000332-en-gb.pdf? ga=2.109276672.466914206.1631475697-1730375740.1631475697](#)

(consultado en octubre de 2019).

Alkorta, I., Suarez, M. L., Herranz, R., González-Muñiz, R., y García-López, M. T. (1996). Similarity study on peptide γ -turn conformation mimetics. *Molecular Modeling Annual*, 2(1), 16-25.

Allison, D. B., Fontaine, K. R., Manson, J. E., Stevens, J. y Vanitallie, T. B. (1999). Annual deaths attributable to obesity in the United States. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 282(16), 1530-1538.

Almazán, J. E., Dóndiz, E. M. R., Rajal, V. B., Fani, E., y Vidaurre, C. (2013). LA NANOFILTRACIÓN: UNA NUEVA TECNOLOGÍA PARA CONCENTRAR JUGOS CÍTRICOS.

Álvarez, J. (2017). Frutas y hortalizas. El auge exportador español continúa. *Distribución y Consumo*, 3, 5-7.

Alvarez, S., Alvarez, R., Riera, F. A., y Coca, J. (1998). Influence of depectinization on apple juice ultrafiltration. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 138(2-3), 377-382.

Álvarez-Quintana, S., Carmona, F. J., Palacio, L., Hernández, A., y Pradanos, P. (2020). Water viscosity in confined nanoporous media and flow through nanofiltration membranes. *Microporous and Mesoporous Materials*, 303, 110289.

Anderson, J., Maki, K., Edirisinghe, I., y Spitznagel, M. B. (2019). The Moderating Role of Response to a Blood Glucose Challenge in Postprandial Cognition Following Consumption of Milk, Fruit Juice, and Water (FS05-05-19). *Current Developments in Nutrition*, 3(Supplement_1), nzz052-FS05.

Anuradha, K., Padma, P. N., Venkateshwar, S., y Reddy, G. (2014). Effect of physical factors on pellet morphology of *Aspergillus awamori* MTCC 9166 and polygalacturonase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 271-274.

Aston, L. M. (2006). Glycaemic index and metabolic disease risk. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(1), 125-134.

Babsky, N. E., Toribio, J. L., y Lozano, J. E. (1986). Influence of storage on the composition of clarified apple juice concentrate. *Journal of Food Science*, 51(3), 564-567.

Barbosa-Cánovas, G. V., e Ibarz, A. (2005). *Operaciones unitarias en la ingeniería de alimentos*. Mundi-Prensa Libros. Madrid (España).

Bedri, A. (2016). *Hesperidio*. Disponible en: [http://www.bedri.es/Libreta de apuntes/H/HE/Hesperidio.htm](http://www.bedri.es/Libreta_de_apuntes/H/HE/Hesperidio.htm) (consultado en mayo de 2020).

Benavente-García, O., Castillo, J., Marin, F. R., Ortuño, A., y Del Río, J. A. (1997). Uses and properties of citrus flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12), 4505-4515.

Berger, C. N., Sodha, S. V., Shaw, R. K., Griffin, P. M., Pink, D., Hand, P., y Frankel, G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environmental Microbiology*, 12(9), 2385-2397.

Berghöfer, A., Pischon, T., Reinhold, T., Apovian, C. M., Sharma, A. M., y Willich, S. N. (2008). Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health*, 8(1), 1-10.

Beveridge, T., y Harrison, J. E. (1984). Nonenzymatic browning in pear juice concentrate at elevated temperatures. *Journal of Food Science*, 49(5), 1335-1336.

Bhattacharjee, C., Saxena, V. K., y Dutta, S. (2017). Fruit juice processing using membrane technology: A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 43, 136-153.

Braden, C. R., y Tauxe, R. V. (2013). Emerging trends in foodborne diseases. *Infectious Disease Clinics*, 27(3), 517-533.

Braverman, J. (1980). *Introducción a la bioquímica de los alimentos*. Barcelona, España: Ediciones Omega.

Burton-Freeman, B., Gietzen, D. W., y Schneeman, B. O. (1997). Meal pattern analysis to investigate the satiating potential of fat, carbohydrate, and protein in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 273(6), R1916-R1922.

Casp, A., y Abril, J. (2003). Capítulo 10: Refrigeración. *Procesos de conservación de alimentos*. A. Madrid Vicente Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España.

Cassano, A., Conidi, C., y Drioli, E. (2011). Clarification and concentration of pomegranate juice (*Punica granatum L.*) using membrane processes. *Journal of Food Engineering*, 107(3-4), 366-373.

Cassano, A., Conidi, C., y Ruby-Figueroa, R. (2014). Recovery of flavonoids from orange press liquor by an integrated membrane process. *Membranes*, 4(3), 509-524.

Cassano, A., Donato, L., y Drioli, E. (2007). Ultrafiltration of kiwifruit juice: operating parameters, juice quality and membrane fouling. *Journal of Food Engineering*, 79(2), 613-621.

Cassano, A., Marchio, M., y Drioli, E. (2007). Clarification of blood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. *Desalination*, 212(1-3), 15-27.

Castro-Muñoz, R., Yáñez-Fernández, J., y Fíla, V. (2016). Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies: An overview. *Food Chemistry*, 213, 753-762.

Castro, B., y Gerla, P. (2005). "Pasteurization of orange juice by membrane filtration". Proc. ENPROMER.C4-P-2.

Choi, L. H., y Nielsen, S. S. (2005). The effects of thermal and nonthermal processing methods on apple cider quality and consumer acceptability. *Journal of Food Quality*, 28(1), 13-29.

Chornomaz, P. M., Pagliero, C., Marchese, J., y Ochoa, N. A. (2013). Impact of structural and textural membrane properties on lemon juice clarification. *Food and Bioproducts Processing*, 91(2), 67-73.

Conidi, C., Cassano, A., Caiazzo, F., y Drioli, E. (2017). Separation and purification of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes. *Journal of Food Engineering*, 195, 1-13.

Conidi, C., Cassano, A., y Drioli, E. (2011). A membrane-based study for the recovery of polyphenols from bergamot juice. *Journal of Membrane Science*, 375(1-2), 182-190.

Conidi, C., Cassano, A., y Drioli, E. (2012). Recovery of phenolic compounds from orange press liquor by nanofiltration. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 867-874.

Conidi, C., Drioli, E., y Cassano, A. (2018). Membrane-based agro-food production processes for polyphenol separation, purification and concentration. *Current Opinion in Food Science*, 23, 149-164.

Cornwell, C. J., y Wrolstad, R. E. (1981). Causes of browning in pear juice concentrate during storage. *Journal of Food Science*, 46(2), 515-518.

Daifresh, (2017). *Exportación de cítricos campaña 2016-17*. Disponible en: <http://www.daifresh.com/es/exportacion-de-citricos-daifresh/> (Consultado en septiembre de 2019).

David, L. R. P. (2016). Nanofiltración en el manejo del lactosuero. *Journal of Engineering and Technology*, 5(2), 10-25.

De la Rosa-Hernández, M., Wong-Paz, J. E., Muñiz-Márquez, D. B., Carrillo-Inungaray, M. L., y Sánchez-González, J. M. (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (*Citrus paradisi*) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47(2), 22-35.

De Paiva, A., Gonçalves, D., Ferreira, P., Baldwin, E., y Cesar, T. (2019). Postprandial effect of fresh and processed orange juice on the glucose metabolism, antioxidant activity and prospective food intake. *Journal of Functional Foods*, 52, 302-309.

De Souza Sant, A., Dantigny, P., Tahara, A. C., Rosenthal, A., y de Massaguer, P. R. (2010). Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssoschlamys fulva* in clarified apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3), 299-302.

Dey, T. B., y Banerjee, R. (2014). Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and α -amylase in apple juice clarification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 97-104.

Dominguez, H., Nunez, M. J., y Lema, J. M. (1994). Enzymatic pretreatment to enhance oil extraction from fruits and oilseeds: a review. *Food Chemistry*, 49(3), 271-286.

Dong, H., Rendeiro, C., Kristek, A., Sargent, L. J., Saunders, C., Harkness, L., y Lovegrove, J. A. (2016). Addition of orange pomace to orange juice attenuates the increases in peak

glucose and insulin concentrations after sequential meal ingestion in men with elevated cardiometabolic risk. *The Journal of Nutrition*, 146(6), 1197-1203.

Echavarría, A. P., Falguera, V., Torras, C., Berdún, C., Pagán, J., y Ibarz, A. (2012). Ultrafiltration and reverse osmosis for clarification and concentration of fruit juices at pilot plant scale. *LWT-Food Science and Technology*, 46(1), 189-195.

Elizondo-Montemayor, L., Hernández-Brenes, C., Ramos-Parra, P. A., Moreno-Sánchez, D., Nieblas, B., Rosas-Pérez, A. M., y Lamadrid-Zertuche, A. C. (2015). High hydrostatic pressure processing reduces the glycemic index of fresh mango puree in healthy subjects. *Food & Function*, 6(4), 1352-1360.

Espamer, L., Pagliero, C., Ochoa, A., y Marchese, J. (2006). Clarification of lemon juice using membrane process. *Desalination*, 200(1-3), 565-567.

FAO, (2012). *Cítricos frescos y elaborados. Estadísticas anuales 2012*. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Citrus/Documents/CITRUS_BULLETIN_2012.pdf (consultado en junio de 2020).

Fernández Vázquez, R., Stinco Scanarotti, C. M., Escudero Gilete, M. L., Meléndez Martínez, A. J., Heredia Mira, F. J., y Vicario Romero, I. (2010). Estudio preliminar sobre la utilidad del color para clasificar los zumos de naranja según su elaboración. *Óptica Pura y Aplicada*, 43 (4), 245-249.

Figoli, A., Cassano, A., y Basile, A. (Eds.). (2016). *Membrane technologies for biorefining*. Woodhead Publishing. eBook ISBN:9780071004521.

Figueroa, R. A. R., Cassano, A., y Drioli, E. (2011). Ultrafiltration of orange press liquor: optimization for permeate flux and fouling index by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 80(1), 1-10.

Figueroa, R., Cassano, A., y Drioli, E. (2012). Ultrafiltration of orange press liquor: Optimization of operating conditions for the recovery of antioxidant compounds by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 255–261.

Fuenmayor, C. A., Lemma, S. M., Mannino, S., Mimmo, T., y Scampicchio, M. (2014). Filtration of apple juice by nylon nanofibrous membranes. *Journal of Food Engineering*, 122, 110-116.

Galanakis, C. M., Markouli, E., y Gekas, V. (2013). Recovery and fractionation of different phenolic classes from winery sludge using ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 107, 245-251.

Galanakis, C. M., y Schieber, A. (2014). Recovery and utilization of valuable compounds from food processing by-products. *Food Research International*, 65, 299-300.

Galanakis, C. M. (2015). Separation of functional macromolecules and micromolecules: from ultrafiltration to the border of nanofiltration. *Trends in Food Science & Technology*, 42(1), 44-63.

Galaverna, G., Di Silvestro, G., Cassano, A., Sforza, S., Dossena, A., Drioli, E., y Marchelli, R. (2008). A new integrated membrane process for the production of concentrated blood orange juice: Effect on bioactive compounds and antioxidant activity. *Food Chemistry*, 106(3), 1021-1030.

García J.A. (2015). *El limón Verna español dominará el mercado europeo con unas 300.000 toneladas*. Disponible en: <http://www.freshplaza.es/article/88931/El-lin%C3%B3n-Verna-espa%C3%B1ol-dominar%C3%A1-el-mercado-europeo-con-unas-300.000-toneladas> (consultado en mayo de 2020).

García, J.A. (2017). El sector de los cítricos en España. *Distribución y Consumo*, 3, 36-40.

García Martín, N. (2014). Reducción de azúcar en mostos por nanofiltración para la obtención de vinos de menor grado alcohólico. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, España.

Garza, S., Giner, J., Martin, O., Costa, E., y Ibarz, A. (1996). Colour, sugars and HMF evolution during thermal treatment of apple juice. *Food Science and Technology International*, 2(2), 101-110.

Gialleli, A. I., Bekatorou, A., Kanellaki, M., Nigam, P., y Koutinas, A. A. (2016). Apple juice preservation through microbial adsorption by nano/micro-tubular cellulose. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 416-421.

González-Sicilia, E. (1968). *El cultivo de los agrios*. Editorial Bello, Valencia, España.

Grampp, E. (1977). Hot clarification process improves production of apple juice concentrate. *Food Technology*, 31, 38-43.

Grande Burgos, M. J., Cobo Molinos, A., Gálvez-del-Postigo-Ruiz, A., y Pérez Pulido, R. (2015). Mejora de la seguridad y la vida útil de alimentos de origen vegetal mediante métodos biológicos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental* 28, 179-192.

Herrero, M., Gonzalo, Á., y García, L. (2010). Tecnología de la producción de sidra. Equipamiento industrial. *La manzana y la sidra: bioprocesos, tecnologías de elaboración y control*, 198-207.

Heywood, V.H., y Zohary D. (1995). A catalogue of the wild relatives of cultivated plants native to Europe. *Flora Mediterranea*, 5, 375-415.

Hodge, J. E. (1953). Dehydrated foods, chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1(15), 928-943.

Huang, R. D., y Feather, M. S. (1988). Carbon-13 NMR study of some Maillard reaction products arising from D-glucose-DL-alanine interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(4), 673-676.

Ibarz, A.; Casero, T.; Miguelsanz, R.; Pagán, J. (1989). Cinética de pardeamiento no enzimático de zumo de pera almacenado a distintas temperaturas. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 29(3), 407-413.

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), (2015). *Gestión integrada de plagas y enfermedades en cítricos*. Disponible en: <http://gipcitricos.ivia.es/citricultura-valenciana> (consultado en febrero de 2021).

Inungaray, M. L. C., y Reyes, A. (2013). Vida útil de los alimentos. *Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias: CIBA*, 2(3), 3.

Jay, S., y Anderson, J. (2001). Fruit juice and related products. In: Moir C. J., Andrew-Kabilafkas C., Arnold G., Cox B. M., Hocking A. D., Jenson I., editors. *Spoilage of Processed Foods: Causes and Diagnosis*. Sydney, Australia: Southwood Press; pp. 187-198.

Jegatheesan, V., Shu, L., Keir, G., y Phong, D. D. (2012). Evaluating membrane technology for clarification of sugarcane juice. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 11(2), 109-124.

Jenkins, D. J., Kendall, C. W., Augustin, L. S., Franceschi, S., Hamidi, M., Marchie, A., y Axelsen, M. (2002). Glycemic index: overview of implications in health and disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76(1), 266S-273S.

Jesus, D. F., Leite, M. F., Silva, L. F. M., Modesta, R. D., Matta, V. M., y Cabral, L. M. C. (2007). Orange (*Citrus sinensis*) juice concentration by reverse osmosis. *Journal of Food Engineering*, 81(2), 287-291.

Jiao, B., Cassano, A., y Drioli, E. (2004). Recent advances on membrane processes for the concentration of fruit juices: a review. *Journal of Food Engineering*, 63(3), 303-324.

Jiménez, J. y Zamora, V. (2010). *Principales cultivares y patrones utilizados en la citricultura*. Taller Regional sobre viveros de cítricos 2010. Viveros de cítricos en el contexto fitosanitario actual. La Habana, Cuba.

Jørgensen, P. M., y León-Yáñez, S. (1999). *Catalogue of the vascular plants of Ecuador*. Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 75, 1-1182. St. Louis: Missouri Botanical Garden.

Kashyap, D. R., Vohra, P. K., Chopra, S., y Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 77(3), 215-227.

Kelly, T., Yang, W., Chen, C. S., Reynolds, K., y He, J. (2008). Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. *International Journal of Obesity*, 32(9), 1431-1437.

Kerimi, A., Gauer, J. S., Crabbe, S., Cheah, J. W., Lau, J., Walsh, R., y Williamson, G. (2019). Effect of the flavonoid hesperidin on glucose and fructose transport, sucrase activity and glycaemic response to orange juice in a crossover trial on healthy volunteers. *British Journal of Nutrition*, 121(7), 782-792.

Kimball, D. A. (2002). *Procesado de cítricos*. Zaragoza, España: Acribia.

Klopotek, Y., Otto, K., y Böhm, V. (2005). Processing strawberries to different products alters contents of vitamin C, total phenolics, total anthocyanins, and antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5640-5646.

Laguna, E. (1998). *Catálogo de recursos fitogénicos agrarios olvidados o en abandono en la Comunidad Valenciana*. Fundació Bancaixa, Valencia.

- Laguna, E. (1997). Sobre el origen de algunas especies cultivadas en el Sistema Ibérico. *Flora Montiberica*, 7, 7-31.
- Landbo, A. K., Kaack, K., y Meyer, A. S. (2007). Statistically designed two step response surface optimization of enzymatic prepress treatment to increase juice yield and lower turbidity of elderberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(1), 135-142.
- Lee, H. S. (2001). Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (*Cara Cara*). *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 49(5), 2563-2568.
- Lee, H. S., y Coates, G. A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *LWT-Food Science and Technology*, 36(1), 153-156.
- Lei, Z., y Bi, S. (2007). Preparation and properties of immobilized pectinase onto the amphiphilic PS-b-PAA diblock copolymers. *Journal of Biotechnology*, 128(1), 112-119.
- Li, J., Janle, E., y Campbell, W. W. (2017). Postprandial glycemic and insulinemic responses to common breakfast beverages consumed with a standard meal in adults who are overweight and obese. *Nutrients*, 9(1), 32.
- Lightowler, H., Thondre, S., Holz, A., y Theis, S. (2018). Replacement of glycaemic carbohydrates by inulin-type fructans from chicory (oligofructose, inulin) reduces the postprandial blood glucose and insulin response to foods: report of two double-blind, randomized, controlled trials. *European Journal of Nutrition*, 57(3), 1259-1268.
- Lima Tribst, A. A., de Souza Sant'Ana, A., & de Massaguer, P. R. (2009). Microbiological quality and safety of fruit juices—past, present and future perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(4), 310-339.
- Lipnizki, F. (2010). Membrane processes for the production of bulk fermentation products. In *Membrane Technology* (pp. 121-153). Butterworth-Heinemann. Elsevier Publisier.
- Llorens Guillem, C. (2018). Efecto de la filtración a través de partículas funcionalizadas con compuestos antimicrobianos sobre la calidad y vida útil de zumo de manzana. Trabajo Fin de Máster, Universidad Politécnica de Valencia, España.

- Lynch, M. F., Tauxe, R. V., y Hedberg, C. W. (2009). The growing burden of foodborne outbreaks due to contaminated fresh produce: risks and opportunities. *Epidemiology & Infection*, 137(3), 307-315.
- Luo, J., Hang, X., Zhai, W., Qi, B., Song, W., Chen, X., y Wan, Y. (2016). Refining sugarcane juice by an integrated membrane process: Filtration behavior of polymeric membrane at high temperature. *Journal of Membrane Science*, 509, 105-115.
- Ma, X., Su, Y., Sun, Q., Wang, Y., y Jiang, Z. (2007). Enhancing the antifouling property of polyethersulfone ultrafiltration membranes through surface adsorption-crosslinking of poly (vinyl alcohol). *Journal of Membrane Science*, 300(1-2), 71-78.
- Maktouf, S., Neifar, M., Drira, S. J., Baklouti, S., Fendri, M., y Châabouni, S. E. (2014). Lemon juice clarification using fungal pectinolytic enzymes coupled to membrane ultrafiltration. *Food and Bioproducts Processing*, 92(1), 14-19.
- Manayay, D., y Ibarz, A. (2010). Modelamiento de la cinética de reacciones del pardeamiento no enzimático y el comportamiento reológico, en el proceso térmico de jugos y pulpas de fruta. *Scientia Agropecuaria*, 1(2), 155-168.
- Manso, M. C., Oliveira, F. A., Oliveira, J. C., y Frías, J. M. (2001). Modelling ascorbic acid thermal degradation and browning in orange juice under aerobic conditions. *International Journal of Food Science & Technology*, 36(3), 303-312.
- Mariné, A. (1981). El pardeamiento y color de los alimentos. *Alimentaria*, 32, 13-30.
- Maroto, J.V. (1998). *Historia de la Agronomía*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Martínez, R. I., Pagán, J., Garza, S., y Ribas, A. I. (2010). Pardeamiento de zumos clarificados de limón tratados a altas temperaturas. *Scientia Agropecuaria*, 1(1), 7-20.
- Mayer, J. (1955). Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 63(1), 15-43.
- Mazo, T. C., Ribas, A. I., Miguelsanz, R., y Pagán, J. (1989a). Cinética de pardeamiento no enzimático de concentrado de zumo de pera almacenado a distintas temperaturas. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 29(3), 407-413.

Mazo, T. C., Ribas, A. I., Miguelsanz, R., y Pagán, J. (1989b). Efecto de la temperatura en la cinética de pardeamiento no enzimático en zumos clarificados de pera con diferente contenido en sólidos solubles. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 29(4), 530-537.

Mejia, D. F., y Osorio, O. (2012). Efecto del tratamiento térmico sobre las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del zumo de tamarillo (*Solanum betaceum*). *Vitae*, 19(1), S120-S122.

Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., y Heredia, F. J. (2004). El color del zumo de naranja. Aspectos físicos. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, 23(186), 103-106.

Mérian, T., y Goddard, J. M. (2012). Advances in nonfouling materials: perspectives for the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 2943-2957.

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), (2020). *Cultivos y producciones*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticasagrarias/agricultura/superficies-producciones-anuales-cultivos/> (consultado en febrero de 2021).

Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), (2020). *Superficies y producciones de cultivos*. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/2019/default.aspx?parte=3&capitulo=07&grupo=8&seccion=4> (consultado en febrero de 2021).

Mirsaeedghazi, H., y Emam-Djomeh, Z. (2017). Clarification of bitter orange (*Citrus aurantium*) juice using microfiltration with mixed cellulose esters membrane. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(1), e12738.

Moazzem, M., Sikder, M., Hossain, B., y Zzaman, W. (2019). Shelf-life extension of wood apple beverages maintaining consumption-safe parameters and sensory qualities. *Beverages*, 5(1), 25.

Molinos, A. C., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R., Valdivia, E., y Galvez, A. (2008). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in raw fruits by enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*, 71(12), 2460-2467.

Muller, H. G., & González, J. B. (1978). *Introducción a la reología de los alimentos* (No. TP 372.5. M9418). Zaragoza: Acribia.

Muñoz, M. (2016). *Estudios de vida útil de zumos de fruta envasados*. Tesis Doctoral. Universidad Politècnica de Valencia.

Murcia, L. (2010). Cítricos, sensación agridulce de bienestar. *Distribución y Consumo*, 2, 70-74.

Navarro L. (2013). *La industria de los cítricos españoles, Tecnologías de Horticultura Mediterránea (THM)*. Disponible en: <http://www.horticulturablog.com/2013/04/la-industria-de-los-citricos-espanoles.html> (consultado en diciembre de 2020).

Nieto, G., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., Peñalver, R., Ros-Berruezo, G., y Viuda-Martos, M. (2021). Valorization of Citrus Co-Products: Recovery of Bioactive Compounds and Application in Meat and Meat Products. *Plants*, 10(6), 1069.

Niwano, Y., Adachi, T., Kashimura, J., Sakata, T., Sasaki, H., Sekine, K., y Kimura, S. (2009). Is glycemic index of food a feasible predictor of appetite, hunger, and satiety? *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 55(3), 201-207.

Olmos, R. V. M. (1999). Cítricos valencianos: pura vitamina, fuente de salud. *Vida Rural*, (85), 26-29.

Ortiz, J.M. (1985). Nomenclatura botánica de los cítricos. *Levante Agrícola: Revista Internacional de Cítricos*, (259), 71-81.

Osorio Mora, O. (2008). *Influencia de tratamientos térmicos en la calidad y estabilidad del puré de fresa (Fragaria x ananassa, cv Camarosa)* (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).

Padrón Pereira, C. A., y Moreno Álvarez, M. J. (2010). Evaluation of the use of enzymes and gravity filtration for clarification of diluted mixture of cactus (*Opuntia boldinghii* Britton & Rose) fruits pulp, orange and grapefruit juices. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(1), 5429-5439.

Pagliero, C., Ochoa, N. A., y Marchese, J. (2011). Orange juice clarification by microfiltration: Effect of operational variables on membrane fouling. *Latin American applied research*, 41(3), 279-284.

Papafotopoulou-Patrinou, E., Gialleli, A. I., Kallis, M., Plessas, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., y Koutinas, A. A. (2016). Microbiological assessment of tubular cellulose filters used for liquid foods cold pasteurization. *LWT-Food Science and Technology*, 67, 151-158.

Peng, J., Su, Y., Shi, Q., Chen, W., y Jiang, Z. (2011). Protein fouling resistant membrane prepared by amphiphilic pegylated polyethersulfone. *Bioresource Technology*, 102(3), 2289-2295.

Peña, A., Arroyo, B., Gómez, C., Tapia, D. y Gómez, E. (2004). Bioquímica. México D.F. México: Editorial Limusa, 179-189.

Peñaflores, L. (2017). *Propiedades de los cítricos*. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/citricos.htm> (consultado en octubre de 2020).

Phillips, R. y Rix, M. (1993). *Vegetables*. Londres: Macmillan.

Pitt, J. I., y Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519, p. 388). New York: Springer.

Polidori, J., Dhuique-Mayer, C., y Dornier, M. (2018). Crossflow microfiltration coupled with diafiltration to concentrate and purify carotenoids and flavonoids from citrus juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 320-329.

Prentice, A. M., Black, A. E., Murgatroyd, P. R., Goldberg, G. R., y Coward, W. A. (1989). Metabolism or appetite: questions of energy balance with particular reference to obesity. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 2(2), 95-104.

Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Buren, L. V., Wagner, E., Wiseman, S., y Rice-Evans, C. A. (2002). The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36(2), 217-233.

Rajauria, G., y Tiwari, B. K. (Eds.). (2017). *Fruit juices: Extraction, composition, quality and analysis*. Academic press. Chennai, India.

Rincón, N. (2007). Evaluar la aplicación de enzima pectinasa aislada del hongo *Aspergillus niger* durante el proceso de clarificación y fermentación del mosto de vino

de uva *vitis labrusca* Variedad *Isabella* para la obtención de vino tinto. Trabajo Fin de Grado, Universidad de la Salle, Bogotá.

Rivas, A., Rodrigo, D., Martínez, A., Barbosa-Cánovas, G. V., y Rodrigo, M. (2006). Effect of PEF and heat pasteurization on the physical–chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1163-1170.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., y Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66(4), 401-436.

Rodríguez, V. (2008). Árboles frutales: Productivos y Decorativos. *Acoplafor, La revista*, 1, 46-49.

Romero-Dondiz, E. M., Almazán, J. E., Rajal, V. B., y Castro-Vidaurre, E. F. (2015). Removal of vegetable tannins to recover water in the leather industry by ultrafiltration polymeric membranes. *Chemical Engineering Research and Design*, 93, 727-735.

Rosauro, G. G. (2016). Un pequeño exportador de Beniaján en el siglo XX. *Murgetana*, (134), 43-50.

Rouseff, R. L., Ruiz Perez-Cacho, P., y Jabalpurwala, F. (2009). Historical review of citrus flavor research during the past 100 years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8115-8124.

Saha, N. K., Balakrishnan, M., y Ulbricht, M. (2009). Fouling control in sugarcane juice ultrafiltration with surface modified polysulfone and polyethersulfone membranes. *Desalination*, 249(3), 1124-1131.

Saltaouras, G., Shaw, P. K., Fraser, A. C., Hawes, C., Smith, H., Handley, L., y Lightowler, H. J. (2019). Glycaemic index, glycaemic load and dietary fibre characteristics of two commercially available fruit smoothies. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 70(1), 116-123.

Sánchez-Moya, T., Hidalgo, A. M., Ros-Berruezo, G., y López-Nicolás, R. (2020). Screening ultrafiltration membranes to separate lactose and protein from sheep whey: application of simplified model. *Journal of Food Science and Technology*, 57(9), 3193-3200.

- Sánchez, D. M., Ibarz, A., Martínez, W. C., y Ambrocio, L. P. (2013). Cinética de la diferencia de color y croma en el proceso térmico de pulpa de mango (*Mangifera indica* L.) variedad *Haden*. *Scientia Agropecuaria*, 4(3), 181-190.
- Santamaría, G., Villacís, A. y Jadán, A. (2000). Extracción y clarificación de zumo de maracuyá (*passiflora edulis*) con la aplicación de enzimas pectolíticas. *Alimentos, Ciencia e Ingeniería*, 9 (1), 20-34.
- Sassi, A. H., Tounsi, H., Trigui-Lahiani, H., Bouzouita, R., Romdhane, Z. B., y Gargouri, A. (2016). A low-temperature polygalacturonase from *P. occitanis*: characterization and application in juice clarification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91, 158-164.
- Saura, D., Marti, N., Valero, M., González, E., Carbonell, A., y Laencina, J. (2012). Separation of aromatics compounds during the clarification of lemon juice by cross-flow filtration. *Industrial Crops and Products*, 36(1), 543-548.
- Saxena, D., Sabikhi, L., Chakraborty, S. K., y Singh, D. (2014). Process optimization for enzyme aided clarification of watermelon juice. *Journal of Food Science and Technology*, 51(10), 2490-2498.
- Serrano, J. C., Martín-Gari, M., Cassanye, A., Granado-Serrano, A. B., y Portero-Otín, M. (2017). Characterization of the post-prandial insulinemic response and low glycaemic index of a soy beverage. *PloS one*, 12(8), e0182762.
- Shao, S. Y., Xu, W. J., Tao, J., Zhang, J. H., Zhou, X. R., Yuan, G., y Yu, X. F. (2017). Glycemic index, glycemic load, and glycemic response to pomelo in patients with type 2 diabetes. *Current Medical Science*, 37(5), 711-718.
- Shahrestani, H., Taheri-Kafrani, A., Soozanipour, A., y Tavakoli, O. (2016). Enzymatic clarification of fruit juices using xylanase immobilized on 1, 3, 5-triazine-functionalized silica-encapsulated magnetic nanoparticles. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 51-58.
- Sieiro, C., García-Fraga, B., López-Seijas, J., da Silva, J.F. y Villa T.G. (2012). Microbialpectic enzymes in the food and wine industry, *Food Ind. Processes–Methods Equip*, 11, 201–219.

- Silberberg, M., Gil-Izquierdo, A., Combaret, L., Remesy, C., Scalbert, A., y Morand, C. (2006). Flavanone metabolism in healthy and tumor-bearing rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(9), 529-535.
- Singh, R. K., Lund, D. B., y Buelow, F. H. (1983). Storage stability of intermediate moisture apples: kinetics of quality change. *Journal of Food Science*, 48(3), 939-944.
- Skrede, G. (1985). Color quality of blackcurrant syrups during storage evaluated by hunter L', a', b' values. *Journal of Food Science*, 50(2), 514-517.
- Soltane, H. B., Roizard, D., y Favre, E. (2013). Effect of pressure on the swelling and fluxes of dense PDMS membranes in nanofiltration: an experimental study. *Journal of Membrane Science*, 435, 110-119.
- Stamp, J. A., y Labuza, T. P. (1983). Kinetics of the Maillard reaction between aspartame and glucose in solution at high temperatures. *Journal of Food Science*, 48(2), 543-544.
- Stewart, I. (1977). Provitamin A and carotenoid content of citrus juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(5), 1132-1137.
- Stubbs, R. J. (1999). Peripheral signals affecting food intake. *Nutrition*, 15(7-8), 614-625.
- Terpinc, P., y Abramovič, H. (2010). A kinetic approach for evaluation of the antioxidant activity of selected phenolic acids. *Food Chemistry*, 121(2), 366-371.
- Toker, R., Karhan, M., Tetik, N., Turhan, I., y Oziyci, H. R. (2014). Effect of ultrafiltration and concentration processes on the physical and chemical composition of blood orange juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 1321-1329.
- Toribio, J.L., y Lozano, J.E. (1984). Non-enzymatic browning in apple juice concentrate during storage. *Journal of Food Science*, 49, 889-892.
- Toribio, J. L., y Lozano, J. E. (1986). Heat induced browning of clarified apple juice at high temperatures. *Journal of Food Science*, 51(1), 172-175.
- Urošević, T., Povrenović, D., Vukosavljević, P., Urošević, I., y Stevanović, S. (2017). Recent developments in microfiltration and ultrafiltration of fruit juices. *Food and Bioproducts Processing*, 106, 147-161.

Utami, R., Widowati, E., y Christy, A. (2016). Screening and characterization of amylase enzyme in sweet orange (*Citrus sinensis*) juice clarification. *Nusantara Bioscience*, 8(2), 268-272.

Vaillant, F., Millan, P., O'Brien, G., Dornier, M., Decloux, M., y Reynes, M. (1999). Crossflow microfiltration of passion fruit juice after partial enzymatic liquefaction. *Journal of Food Engineering*, 42(4), 215-224.

Vaughan, J. y Geissler, C. (1997). *The New Oxford Book of Food Plants*. Oxford University Press. Oxford.

Wanders, A. J., van den Borne, J. J., de Graaf, C., Hulshof, T., Jonathan, M. C., Kristensen, M., y Feskens, E. J. (2011). Effects of dietary fibre on subjective appetite, energy intake and body weight: a systematic review of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*, 12(9), 724-739.

Warczok, J., Ferrando, M., López, F., y Güell, C. (2004). Concentration of apple and pear juices by nanofiltration at low pressures. *Journal of Food Engineering*, 63(1), 63-70.

Weiss, E. A. (1997). *Essential Oil Crops*. Cab International.

Widowati, E., Utami, R., y Kalistiyatika, K. (2017, November). Screening and characterization of polygalacturonase as potential enzyme for keprok garut orange (*Citrus nobilis* var. *chrysocarpa*) juice clarification. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 909, No. 1, p. 012088). IOP Publishing.

Wilmsen, P. K., Spada, D. S., y Salvador, M. (2005). Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4757-4761.

Woodend, D. M., y Anderson, G. H. (2001). Effect of sucrose and safflower oil preloads on short term appetite and food intake of young men. *Appetite*, 37(3), 185-195.

Xu, J., Jönsson, T., Plaza, M., Håkansson, Å., Antonsson, M., Ahrén, I. L., y Granfeldt, Y. (2018). Probiotic fruit beverages with different polyphenol profiles attenuated early insulin response. *Nutrition Journal*, 17(1), 1-10.

Zaragoza, S. (1993). *Pasado y presente de la citricultura española*. Valencia, España: Generalitat Valenciana, Serie Div. Téc. nº 8.

Zaragoza, S., Pina, J., Forner, M., Navarro, L., Medina, A., Soler, G. y Fuster, P. (2011). *Las variedades de cítricos. El material vegetal y registro de variedades comerciales de España*. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Madrid.

Zegarra Aliaga, R. I. (2000). Obtención de zumo de membrillo (*Cydonia vulgaria*) mediante el tratamiento enzimático con Poligalacturonasa y Biopectinase LM. Trabajo Fin de Grado, Universidad Nacional Agraria de La Selva, Perú.

7. NOMENCLATURA



7. Nomenclatura

ΔP	Diferencia de presión entre P_1 y P_2 (bar)
$\Delta \Pi$	Gradiente de presión osmótica a través de la membrana (bar)
AIJN	Asociación europea de zumos de frutas
AISI	<i>American iron and Steel institute</i>
A_w	Coefficiente de permeabilidad de la membrana al agua destilada (s/m)
A_{wf}	Coefficiente de permeabilidad de la membrana después del paso del producto para el agua destilada (s/m)
A_{wi}	Coefficiente de permeabilidad inicial de la membrana al agua destilada (s/m)
C	Cidro
C_a	Concentración de la alimentación (g/L)
C_a m.s.	Concentración de azúcares en la alimentación expresado en (g/kg m.s.)

C_p	Concentración del permeado (g/L)
C_p m.s.	Concentración de azúcares en el permeado expresado en (g/kg m.s.)
C_r	Concentración del rechazo (g/L)
EFSA	Agencia europea de seguridad alimentaria
EVU	Estudio de vida útil
F	Enzima libre
FI	Índice de ensuciamiento
FC	<i>From concentrate</i>
GPL	Gramos por litro de ácido cítrico
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
I	Enzima inmovilizada
IF	Ensuciamiento irreversible
IAUC	Incremento de área bajo la curva glucémica
IFU	<i>International fruit and vegetable juice association</i>
IG	Índice glicémico
IMC	Índice de masa corporal
IVIA	Instituto valenciano de investigaciones agrarias
JBT	John Bean technologies
J_p	Flujo de permeado ($\text{kg}/\text{m}^2\cdot\text{h}$)
J_w	Flujo de agua destilada en el permeado ($\text{kg}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)
J_{wf}	Flujo de permeado de la membrana después del paso del producto para el agua destilada ($\text{kg}/\text{m}^2\cdot\text{s}$)

J _{wi}	Flujo de permeado inicial de la membrana para el agua destilada (kg/m ² ·s)
L	Limonero
LM	Limero
M	Mandarino
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MF	Microfiltración
m.s.	materia seca
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
NA	Naranja amargo
ND	Naranja dulce
NF	Nanofiltración
NFC	<i>Not from concentrate</i>
NTU	<i>Nephelometric turbidity unit</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Pomelo
P ₁	Presión de entrada a la membrana (bar)
P ₂	Presión de salida de la membrana (bar)
P ₃	Presión de la bomba de entrada a la membrana
PIB	Producto interior bruto
Q _R	Caudal de recirculado (L/h)
Q _P	Caudal de permeado (L/h)
SEM	Error estándar de la media

t	tiempo (min)
T	Temperatura (°C)
TMP	Presión transmembrana
UF	Ultrafiltración
USDA	Departamento de agricultura de los Estados Unidos
VRF	Factor de concentración de volumen
WESOS	<i>Water extracted soluble orange solids</i>

8. ANEXOS



8. Anexos

Anexo I. Póster presentado al I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias organizado por la Universidad de Almería.

Anexo II. Equivalencia entre la lectura del fotómetro y la concentración de sodio y potasio.

Anexo III. Póster presentado a las IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia.

Anexo IV. Evaluación de los catadores para el orange peel extract en las condiciones de almacenamiento estudiadas.

Anexo V. Evaluación de los catadores para el lemon peel extract en las condiciones de almacenamiento estudiadas.

Anexo VI. Formulario de Bioseguridad.

Anexo VII. Formulario de Bioseguridad para proyectos.

Anexo VIII. Informe favorable de la Comisión de Bioseguridad en Experimentación (CBE).

Anexo IX. Formulario para Tesis enmarcadas en proyectos previamente aprobados por el Comité de Bioseguridad.

Anexo X. Hoja de información al participante.

Anexo XI. Declaración de consentimiento informado.

Anexo XII. Póster presentado al II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias organizado por la Universidad de Almería.

Anexo I. Póster presentado al I Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias organizado por la Universidad de Almería.



1er Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias



ciambital
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



25 años
UNIVERSIDAD DE ALMERÍA



biovegen
sistema tecnológico de biotecnología vegetal



Food for Life Spain



eventos 2018
CEIA3

OBTENCIÓN DE BIOPRODUCTOS PROCEDENTES DEL PROCESADO DE CÍTRICOS MEDIANTE TECNOLOGÍA DE MEMBRANAS

J.A. Macario¹, J.M. Pérez¹, J.L. Gómez², A.M. Hidalgo²

¹Fruit Tech Natural, Ctra Madrid-Cartagena, km 390, Espinardo 3010(Murcia), Spain, joseantonio.macario@um.es;
²Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 3010(Murcia), Spain.



AMC innova
— PART OF THE AMC GROUP —



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Introducción

Los cítricos son las frutas más consumidas en el mundo por sus valores nutricionales y beneficios para la salud. Brasil, China, India, México, España y los Estados Unidos producen más de dos tercios de los cítricos del mundo. Aproximadamente un tercio de los cítricos se utiliza para el procesado, lo que produce un 50-60% de subproductos orgánicos.

Estos subproductos tienen un nivel bajo de pH (3-4) y se caracterizan por tener alta carga de materia orgánica (95% del total sólidos) y alto contenido de agua. Una de las alternativas para solventar la problemática del aprovechamiento de los subproductos es la tecnología de membranas.

En la Figura 1 se muestran los procesos de filtración mediante membranas más utilizados en la industria. Estos procesos poseen diferentes ventajas: bajos requerimientos de energía, alta eficiencia de separación, fácil escalado (cambio de escala), operación simple, alta producción en términos de flujos de permeado y ausencia de fase de transición. En conjunto, estas ventajas facilitan la recuperación de productos de alto valor añadido (Cassano et al. 2014).

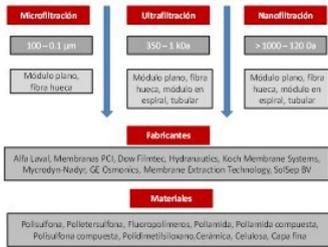


Figura 1. Clasificación de los procesos convencionales de membrana en función del tamaño de corte molecular (Castro-Muñoz et al. 2016).

Resultados

En este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica con el objetivo de conocer las mejores técnicas disponibles en obtención de productos de alto valor añadido. La tecnología de membranas se ha aplicado en dos grandes campos: uno para la clarificación y concentración de los zumos procedentes de cítricos y, en la actualidad, en el aprovechamiento de diferentes subproductos procedentes de los cítricos para obtener nuevos productos de alto valor añadido como son los polifenoles, antocianinas y flavonoides. En la Figura 2 se muestra un esquema de las aplicaciones de la tecnología de membranas en la industria cítrica.



Figura 2. Esquema general de la aplicación de la tecnología de membranas en el tratamiento de cítricos (Elaboración propia).

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado del proyecto de investigación IDI-20171262, financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Siendo beneficiarios: Universidad de Murcia, AMC Innova Juice and Drinks S.L., Zukán S.L. y Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación.

A partir de la bibliografía seleccionada durante el proceso de revisión bibliográfica se ha elaborado la Tabla 1 en la que se muestran los principales compuestos recuperados como subproductos de la industria de zumos de cítricos, usando los procesos de membrana convencionales. En la tabla se muestran para los diferentes zumos estudiados, la eficacia del proceso de separación, tipo de membrana, tamaño de corte molecular de la misma, su configuración, y los diferentes compuestos bioactivos obtenidos.

Tabla 1. Condiciones del proceso de membranas en la recuperación de productos de alto valor añadido.

Compuestos	Eficacia	Subproducto	Proceso	MWCO	Materiales	Configuración	Referencia
Polifenoles	58.30%	Licor prensado naranja	UF	100 kDa	Polisulfona	Fibra hueca	Ruby-Figueroa et al. 2011 y 2012
	>90%		NF	180 Da	Poliimida-polisulfona		
Antocianinas y flavonoides	>80%	Licor prensado naranja	NF	300 Da	Poliisopiracina amida de capa fina	Módulo en Espiral	Conidi et al. 2012
	>80%		NF	400 Da	Polietersulfona		
	>70%		NF	1000 Da	Polietersulfona		
Antocianinas, flavonoides	>85%	Licor prensado naranja	NF	Rechazo Na ₂ SO ₄ >25-50 %	Polietersulfona	Módulo en Espiral	Cassano et al. 2014
Carotenos y flavonoides		Zumo de naranja y clementina	MF+DF	0.2 µm	Cerámica	Membrana tubular	Polidori et al. (2018)
Polifenoles y flavonoides	91-97% Flav. 43-62% Pol. 64 %	Bergamota	UF+NF	100 kDa +450 Da 100 kDa +750 Da	Polisulfona + TiO ₂ Polisulfona + TiO ₂	Membrana plana Fibra hueca Membrana tubular	Conidi et al. 2011

Como ejemplo de la Tabla 1, en el estudio realizado por Polidori et al. (2018), se pretende evaluar la eficacia de un proceso basado en microfiltración seguida de una etapa de diafiltración con el objetivo de concentrar y purificar los principales compuestos flavonoides y carotenoides en zumos de cítricos.

En la Figura 3 se muestra un diagrama de flujo del proceso integrado de tratamiento de licores de naranja mediante procesos de membrana. Estos autores proponen un proceso integrado de recuperación y concentración de flavonoides procedentes del licor prensado de naranja, en base a los resultados experimentales obtenidos.

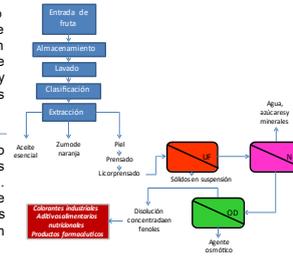


Figura 3. Diagrama de flujo del proceso integrado de tratamiento mediante procesos de membrana (Conidi et al. 2017).

Conclusiones

- ✓ El aprovechamiento de subproductos cítricos es en la actualidad una vía en constante desarrollo, no obstante aún queda mucho por mejorar hasta llegar a la meta del "zero waste".
- ✓ La tecnología de membranas es una de las técnicas más utilizadas para la obtención de productos de alto valor añadido en la industria de cítricos, ya que permite separar biomoléculas que pueden ser de nueva aplicación en los procesos estudiados.
- ✓ A partir del siguiente trabajo se ha empezado a realizar ensayos experimentales para la obtención de productos de alto valor añadido utilizando membranas de diferentes tamaños de corte molecular.

Referencias

>Cassano, A., Conidi, C., Ruby-Figueroa R. (2014). Recovery of flavonoids from orange press liquor by an integrated membrane process. *Membranes*, 4, 509-524.

>Castro-Muñoz R., Yáñez-Fernández J., Fila V. (2016). Phenolic compounds recovered from agro-food by-products using membrane technologies. *Advances in Food Chemistry*, 213, 753-762.

>Conidi, C., Cassano, A., & Drioli, E. (2011). A membrane-based study for the recovery of polyphenols from bergamot juice. *Journal of Membrane Science*, 375, 182-190.

>Conidi, C., Cassano, A., & Drioli, E. (2012). Recovery of phenolic compounds from orange press liquor by nanofiltration. *Food and Bioprocess Technology*, 90, 867-874.

>Conidi, C., Drioli, E., Cassano, A. (2017). Membrane-based agro-food production processes for polyphenol separation, purification and concentration. *Current Opinion in Food Science*, 17, 1-16.

>Polidori, J., Dhuique-Mayer, C., Domier, M. (2018). Crossflow microfiltration coupled with diafiltration to concentrate and purify carotenoids and flavonoids from citrus juice. *Innovative Food Science Emerging Technologies*, 45, 320-329.

>Ruby-Figueroa, R., Cassano, A., & Drioli, E. (2012). Ultrafiltration of orange press liquor: Optimization of operating conditions for the recovery of antioxidant compounds by response surface methodology. *Separation and Purification Technology*, 98, 255-261.

Anexo II. Equivalencia entre la lectura del fotómetro y la concentración de sodio y potasio.**Tabla II.1.** Equivalencia entre la lectura del fotómetro y la concentración de sodio.

Lectura fotómetro	Concentración sodio (ppm)	Lectura fotómetro	Concentración sodio (ppm)	Lectura fotómetro	Concentración sodio (ppm)
0	0	34	65	68	163
1	0	35	68	69	166
2	1	36	70	70	169
3	2	37	73	71	173
4	6	38	75	72	176
5	7	39	78	73	179
6	9	40	80	74	183
7	10	41	83	75	186
8	12	42	85	76	190
9	14	43	88	77	193
10	15	44	91	78	197
11	17	45	94	79	200
12	19	46	96	80	204
13	21	47	99	81	207
14	22	48	102	82	211
15	24	49	105	83	214
16	26	50	107	84	218
17	28	51	110	85	221
18	30	52	113	86	225
19	32	53	116	87	229
20	34	54	119	88	232
21	36	55	122	89	236
22	38	56	125	90	240
23	40	57	128	91	243
24	42	58	131	92	247
25	44	59	134	93	251
26	47	60	137	94	255
27	49	61	140	95	258
28	51	62	143	96	262
29	53	63	147	97	266
30	56	64	150	98	270
31	58	65	153	99	285
32	60	66	156	100	300
33	63	67	159		

Tabla II.2. Equivalencia entre la lectura del fotómetro y la concentración de potasio.

Lectura fotómetro	Concentración potasio (ppm)	Lectura fotómetro	Concentración potasio (ppm)	Lectura fotómetro	Concentración potasio (ppm)
0	0	34	527	68	1184
1	17	35	545	69	1204
2	29	36	563	70	1224
3	42	37	581	71	1244
4	55	38	600	72	1264
5	68	39	618	73	1284
6	81	40	637	74	1304
7	94	41	656	75	1324
8	108	42	675	76	1344
9	122	43	693	77	1363
10	136	44	712	78	1383
11	150	45	731	79	1403
12	165	46	751	80	1423
13	179	47	770	81	1442
14	194	48	789	82	1462
15	209	49	809	83	1481
16	225	50	828	84	1501
17	240	51	847	85	1520
18	256	52	867	86	1539
19	271	53	887	87	1559
20	287	54	906	88	1578
21	303	55	926	89	1597
22	320	56	946	90	1616
23	336	57	965	91	1635
24	353	58	985	92	1654
25	370	59	1005	93	1673
26	386	60	1025	94	1691
27	404	61	1045	95	1710
28	421	62	1065	96	1728
29	438	63	1085	97	1747
30	456	64	1105	98	1765
31	473	65	1125	99	1840
32	491	66	1145	100	2000
33	509	67	1165		

Anexo III. Póster presentado a las IV Jornadas Doctorales de la Universidad de Murcia.

OBTENCIÓN DE AZÚCARES NATURALES PROCEDENTES DEL SUBPRODUCTO DEL PROCESADO DE FRUTAS

J.A. Macario¹, J.M. Pérez¹, J.L. Gómez², A.M. Hidalgo²¹Fruit Tech Natural, Ctra Madrid-Cartagena, km 390, Espinardo 30100 (Murcia), Spain, joseantonio.macario@um.es;²Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 (Murcia), Spain.

Resumen

En la actualidad, un mayor número de consumidores consideran que el azúcar añadido a los alimentos y a las bebidas perjudica seriamente la salud. En algunos países como Reino Unido, se grave con impuestos la adición de azúcar en refrescos y bebidas azucaradas.

Además, la Organización Mundial de la Salud (OMS) advierte del problema que causa el abuso de este tipo de bebidas azucaradas, debido a las enfermedades derivadas de la obesidad, por lo que recomiendan limitar el consumo de azúcar añadida a menos del 10% de la ingesta calórica total. La tendencia en España, al igual que en el resto de países de Europa, es disminuir la cantidad de azúcares añadidos a este tipo de alimentos, ya que la sociedad está cada vez más concienciada y exige que el aporte de azúcar sea de manera natural. En algunas regiones (comunidades autónomas) están trabajando en implementar algún tipo de impuesto similar al del Reino Unido. Debido a esta problemática, en el presente trabajo se ha intentado dar solución al exceso de azúcar añadida en refrescos y bebidas. Para ello, se ha buscado separar azúcares naturales de un extracto de naranja que es un subproducto procedente del procesado de la naranja.



Existen diferentes procesos para la separación de azúcares que pueden ser clasificados en físicos, químicos y biológicos [1]. Entre los procesos físicos se encuentra la tecnología de membranas. Dentro de esta tecnología, la nanofiltración es capaz de separar estos azúcares [2, 3]. En este trabajo, se ha utilizado como tecnología emergente la ultrafiltración, con el objetivo de separar dichos compuestos reduciendo el consumo de energía respecto a la nanofiltración al operar a menores presiones.

Materiales y Métodos

Las Figura 1 y 2 muestran el diagrama de flujo del proceso y una imagen del equipo experimental, respectivamente. Se han utilizado dos membranas planas con soporte de polipropileno, suministras por Alfa Laval. Las características de las membranas se describen en la Tabla 1.

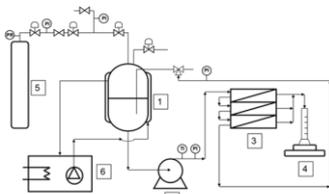


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso: (1) tanque de alimentación, (2) bomba, (3) modulo de membranas, (4) depósito de permeados, (5) bala de nitrógeno, (6) intercambiador.

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado del proyecto de investigación IDI-20171262, financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Siendo beneficiarios: Universidad de Murcia, AMC Innova Juice and Drinks S.L., Zukán S.L. y Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación.

Sistema Experimental

Tabla 1. Principales características de las membranas utilizadas en los ensayos.

MEMBRANA	UF ₁	UF ₂
Composición química	polisulfona	poliétersulfona
Presión máxima tolerada (bar)	10	10
Rango de pH	1-13	1-13
Temperatura máxima (°C)	75	75
MWCO (Da)	25000	5000



Figura 2. Imagen del equipo experimental.

Ensayos realizados

Los ensayos se han realizado en la unidad MMS Tryple System Model F1. El módulo de membranas está dispuesto con tres membranas planas en serie con un área superficial efectiva de 4.66x10⁻³ m² cada una. La determinación de la concentración de azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa) fue obtenida mediante HPLC. En la Tabla 2 se muestran los valores de los principales parámetros analizados en la corriente de alimentación y en los permeados.

Tabla 2. Principales características fisico-químicas de la alimentación y de las corrientes de permeado de las membranas ensayadas.

PARÁMETROS	Alimentación al módulo	Permeado UF ₁	Permeado UF ₂
Grados Brix	21,0	19,5	18,28
Acidez (% ACA)	1,1	1	1
pH	3,60	3,63	3,69
% T _{25nm} a 11,2°Brix	95,8	97,4	99,1
Índice de formol (ml/100ml) a 11,2°Brix	15,96	15,66	15,84

La selectividad de una membrana se expresa generalmente en términos del coeficiente de rechazo de soluto. Este parámetro, R, es una medida de la capacidad de la membrana para separar el soluto de la disolución de alimentación, y se define como un porcentaje según la ecuación:

$$R = 100 \times \frac{C_f - C_p}{C_f} = 100 \times \left(1 - \frac{C_p}{C_f} \right)$$

Donde C_f y C_p son la concentración del soluto en la alimentación y en el permeado, respectivamente. En la Figura 3 se muestran los rechazos obtenidos para los distintos azúcares.

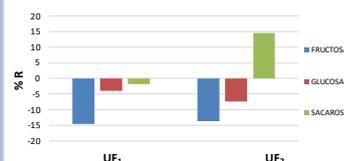


Figura 3. Porcentaje de rechazo de los azúcares principales (glucosa, fructosa y sacarosa) en las corrientes de permeado de las membranas estudiadas.

Conclusiones

Los resultados obtenidos indican que la membrana UF₂ con menor tamaño de corte molecular, es capaz de rechazar hasta un 15 % de disacáridos mientras que en la membrana UF₁ la concentración se mantiene prácticamente invariable.

Además, los valores de transmitancia son mayores para la membrana UF₂ alcanzándose valores superiores al 99%. El resto de parámetros analizados: Acidez, pH, Índice de formol y Potasio, se mantienen similares en los permeados de ambas membranas.

Referencias

- [1] Reife, A. Freeman, H.S. (1996). Environmental Chemistry of Dyes and Pigments. New York, U.S.A: John Wiley & Sons.
- [2] Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technology, 77, 247-255.
- [3] Luo, J., Hang, X., Zhai, W., Qi, B., Song, W., Chen, X. & Wan, Y. (2016). Refining sugarcane juice by an integrated membrane process: Filtration behavior of polymeric membrane at high temperature. Journal of Membrane Science, 509, 105-115

Anexo IV. Evaluación de los catadores para el orange peel extract en las condiciones de almacenamiento estudiadas.

Tabla IV.1. Puntuación sensorial del orange *peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 1	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	3	3	3	3	3
Aroma	3	3	3	3	3	2
Sabor	3	3	3	3	2	3
Valoración Global	4	4	3	3	3	3
Puntuación total	18	17	16	16	15	15

Tabla IV.2. Puntuación sensorial del orange *peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 2	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	3	3	3	2	2	2
Aroma	3	3	3	2	2	2
Sabor	3	3	3	3	3	3
Valoración Global	3	3	3	3	2	2
Puntuación total	16	16	16	14	13	13

Tabla IV.3. Puntuación sensorial del orange *peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 3	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	3	3	3	3
Aroma	3	3	3	3	3	3
Sabor	4	4	4	3	3	3
Valoración Global	4	4	4	3	3	3
Puntuación total	19	19	18	16	16	16

Tabla IV.4. Puntuación sensorial del orange *peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 4	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	3	3	2	2	2	2
Aroma	3	3	3	3	3	3
Sabor	4	4	3	3	2	3
Valoración Global	4	3	3	3	3	3
Puntuación total	18	17	15	15	14	15

Tabla IV.5. Puntuación sensorial del orange *peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 5	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	3	4	4
Color	3	3	2	2	2	2
Aroma	3	3	2	2	2	2
Sabor	4	3	3	3	3	4
Valoración Global	3	3	3	3	3	3
Puntuación total	17	16	14	13	14	15

Tabla IV.6. Puntuación sensorial del orange *peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 6	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	3	4
Color	4	4	4	3	3	3
Aroma	4	4	4	4	4	3
Sabor	3	3	3	3	3	2
Valoración Global	4	4	4	3	3	3
Puntuación total	19	19	19	17	16	15

Tabla IV.7. Puntuación sensorial del *orange peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Catador 1	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	4	3	3	3
Aroma	4	4	4	3	4	4
Sabor	4	4	3	4	3	4
Valoración Global	4	4	4	3	4	4
Puntuación total	20	20	19	17	18	19

Tabla IV.8. Puntuación sensorial del *orange peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Catador 2	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	3	3	3	3
Aroma	4	4	4	3	3	3
Sabor	4	4	3	4	3	4
Valoración Global	4	4	4	4	4	4
Puntuación total	20	20	18	18	17	18

Tabla IV.9. Puntuación sensorial del *orange peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Catador 3	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	4	3	3	3
Aroma	4	4	3	3	3	3
Sabor	3	3	3	3	2	2
Valoración Global	4	4	4	4	3	3
Puntuación total	19	19	18	17	15	15

Tabla IV.10. Puntuación sensorial del *orange peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Catador 4	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	3	3	3	4
Color	4	4	3	3	3	3
Aroma	3	3	3	3	3	3
Sabor	4	4	4	4	4	4
Valoración Global	4	4	3	3	3	3
Puntuación total	19	19	16	16	16	17

Tabla IV.11. Puntuación sensorial del *orange peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 5	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	3	4	4	4	4
Color	4	3	3	3	3	3
Aroma	4	4	3	4	3	3
Sabor	4	4	4	3	3	3
Valoración Global	4	3	3	3	3	3
Puntuación total	20	17	17	17	16	16

Tabla IV.12. Puntuación sensorial del *orange peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 6	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	3	4	3	4
Aroma	4	4	4	4	4	3
Sabor	4	3	4	4	4	4
Valoración Global	4	4	3	4	3	3
Puntuación total	20	19	18	20	18	18

Anexo V. Evaluación de los catadores para el lemon peel extract en las condiciones de almacenamiento estudiadas.

Tabla V.1. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 1	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	3	3	3	2	2	2
Aroma	3	3	3	3	3	3
Sabor	3	3	4	3	3	3
Valoración Global	4	4	4	3	3	3
Puntuación total	17	17	18	15	15	15

Tabla V.2. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 2	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	3	3	2	2	2	2
Aroma	4	4	3	3	3	3
Sabor	4	4	3	3	3	3
Valoración Global	4	4	3	3	3	3
Puntuación total	19	19	15	15	15	15

Tabla V.3. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 3	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	3	4	4	3
Color	3	3	2	2	2	2
Aroma	3	3	4	3	4	3
Sabor	3	3	3	4	4	3
Valoración Global	4	3	3	3	3	3
Puntuación total	17	16	15	16	17	14

Tabla V.4. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 4	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	3	3	2	2	2	2
Aroma	4	3	3	3	2	3
Sabor	3	3	2	3	3	3
Valoración Global	4	3	3	3	3	3
Puntuación total	18	16	14	15	14	15

Tabla V.5. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 5	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	2	2	2	2
Aroma	3	3	3	2	3	3
Sabor	4	3	4	3	4	3
Valoración Global	4	3	3	3	3	3
Puntuación total	19	17	16	14	16	15

Tabla V.6. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* aséptico y refrigerado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 6	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	3	3	2	2	2	2
Aroma	3	3	3	2	3	3
Sabor	4	4	4	3	2	2
Valoración Global	4	4	3	3	3	3
Puntuación total	18	18	16	14	14	14

Tabla V.7. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Catador 1	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	4	4	3	3
Aroma	4	4	3	3	3	4
Sabor	4	4	4	3	3	4
Valoración Global	4	4	4	3	3	4
Puntuación total	20	20	19	17	16	19

Tabla V.8. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
	0	1	3	6	9	12
Catador 2	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	3	3	3	3
Aroma	4	4	4	4	4	4
Sabor	4	4	4	4	4	4
Valoración Global	4	4	4	4	4	4
Puntuación total	20	20	19	19	19	19

Tabla V.9. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 3	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	3
Color	4	3	3	3	3	3
Aroma	3	4	4	3	3	4
Sabor	4	4	4	3	3	3
Valoración Global	4	4	3	3	3	3
Puntuación total	19	19	18	16	16	16

Tabla V.10. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 4	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	3	3	3	3
Aroma	4	4	4	3	4	4
Sabor	4	4	3	4	4	3
Valoración Global	4	4	4	4	4	3
Puntuación total	20	20	18	18	19	17

Tabla V.11. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 5	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	3	3	3	3	3
Aroma	4	4	3	4	4	3
Sabor	4	4	4	4	3	3
Valoración Global	4	4	3	4	3	3
Puntuación total	20	19	17	19	17	16

Tabla V.12. Puntuación sensorial del *lemon peel extract* no aséptico y congelado.

Parámetro	Controles realizados desde la fecha de envasado (meses)					
Catador 6	0	1	3	6	9	12
Aspecto	4	4	4	4	4	4
Color	4	4	3	4	3	3
Aroma	4	4	3	3	4	3
Sabor	4	4	4	4	4	4
Valoración Global	4	4	3	4	3	3
Puntuación total	20	20	17	19	18	17

Anexo VI. Formulario de Bioseguridad.

UNIVERSIDAD DE MURCIA Vicerrectorado de Investigación y Transferencia

CBE Comité de Bioseguridad en Experimentación

cm CAMPUS MARE NOSTRUM

Memoria para el CBE: Proyecto de investigación con (marque lo que corresponda):

- X agentes biológicos / muestras biológicas de origen humano o animal (AB)
 organismos modificados genéticamente (OMG)
 sustancias químicas peligrosas (SQP)^(*)
 sustancias radiactivas /equipos radiológicos / instalaciones radiactivas(SR)^(**)

Nº Ref CBE

Tipo de memoria⁽¹⁾

X Nueva Corrección Modificación relevante Prorroga

Investigador responsable

Apellido 1: Hidalgo Apellido 2: Montesinos Nombre: Asunción Mª NIF: 27452830F

Datos del proyecto

Título: DESARROLLO DE NUEVOS INGREDIENTES BIOACTIVOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS PROCEDENTES DEL PROCESADO DE CÍTRICOS

Financiación ⁽²⁾: CDTI

PARTE I: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Resumen del proyecto

La extracción, separación y/o transformación de los azúcares naturales procedentes de cítricos permite incrementar el valor añadido y dotar de funcionalidad a ciertos alimentos. Además, la separación de la fracción azucarada procedente de estos frutos implica la concentración de compuestos bioactivos de gran interés tecnológico, los cuales añadidos a determinados productos aportarían un valor añadido.

El estudio va encaminado a la obtención de bebidas saludables con azúcares propios de los subproductos de los cítricos, incorporándose así compuestos funcionales beneficiosos para la salud, como es la fibra, los flavonoides, etc, y que sustituyan a los productos con contenidos de azúcares provenientes de la caña de azúcar y la remolacha.

Además, el proyecto supone una mejora en el impacto medioambiental al suponer una valorización y mejor aprovechamiento de los residuos de la industria agroalimentaria, empleando los subproductos que contienen.

- Hipótesis y objetivos.

En este ensayo se pretende comparar el impacto de un nuevo proceso tecnológico aplicado a un zumo de frutas, en la respuesta postprandial de la glucosa en sangre en adultos sanos.

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

Comprobar que los productos obtenidos presentan buenas propiedades funcionales.

Realizar ensayos en sujetos para determinar de forma experimental el índice glucémico.

- Descripción de la muestra (especificando reclutamiento, tamaño, características del grupo control si lo hubiera, etc...):

El número de participantes en el estudio se ha calculado en relación a datos previos de estudios realizados sobre nivel de glucosa en sangre (Paiva et al., 2019). La muestra mínima será de 15 participantes, calculada con un nivel de confianza del 95%. Considerando una tasa de abandono del 15%, aumentamos la muestra a 18. La principal variable respuesta será la modificación de la concentración de la glucosa en sangre inducida por los diferentes tipos de zumos en algún punto de la curva trazada.

Como criterios de inclusión se establece que los sujetos sean adultos sanos (18-50 años), que no tomen medicación, sin embarazo, no diabetes mellitus, enfermedad digestiva, ingesta de suplementos vitamínicos/minerales, sin alergia diagnosticada, con un IMC entre 20 y 30 kg/m², con peso corporal estable.

El reclutamiento se realizará dentro de la comunidad universitaria.

Se trata de un ensayo doble ciego, aleatorizado y cruzado, por lo que todos los participantes recibirán tres tratamientos (los dos zumos problema y una bebida control con la misma cantidad de azúcares que los anteriores).

- Fecha de la recogida de la muestra: (Fecha en la que se tiene previsto recoger los datos de la muestra)

El ensayo se realizará durante el segundo cuatrimestre del curso 2018/2019, realizándose las mediciones y el análisis de los datos de forma inmediata.

- Metodología:

Como hemos comentado se trata de un ensayo aleatorizado, cruzado y doble ciego en el que los participantes recibirán tres bebidas: zumo con tratamiento tecnológico A, zumo con tratamiento tecnológico B (ambos con la misma composición), y bebida control con una concentración de azúcares semejante.

A cada zumo se le asignará un código por el coordinador del estudio, de tal manera que los investigadores y los participantes no conocerán sus características.

Dos días antes del ensayo, se les pedirá a los voluntarios que no tomen alcohol, que mantengan un nivel moderado de consumo de carbohidratos y una actividad física ligera. Los participantes serán informados de la necesidad de no consumir ningún tipo de alimento al menos 10 horas antes del ensayo y no realizar ejercicio intenso durante esa noche o por las mañanas del ensayo. Entre cada tratamiento se realizará un descanso de una semana.

El ensayo se realizará en la 6ª planta del edificio VITALIS de la Universidad de Murcia. Cada participante acudirá una vez por semana al centro (aproximadamente 3h por visita, cada 7 días). A principio de la mañana (8 am aproximadamente) del día del experimento, se tomará una muestra de sangre (tiempo 0) y se les administrará seguidamente una de las bebidas (250 ml) que deberán consumir en unos 10-15 minutos. Posteriormente se seguirán realizando extracciones de sangre a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Tras el comienzo de la ingesta de la bebida.

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

La muestra de sangre se obtendrá mediante una punción en el dedo utilizando lancetas estériles de un solo uso (Verifine® 23G/1.8mm). Previos estudios sugieren que la sangre capilar, más que la venosa, es más fiable para los test de glucosa en sangre. Se pedirá a los participantes que caliente previamente el dedo para incrementar el flujo de sangre y no comprimirlo para extraer la sangre ya que se puede diluir el plasma. La glucosa en sangre se medirá utilizando el dispositivo MultiCareIn®, que se calibrará diariamente siguiendo las instrucciones del fabricante, pudiendo medir glucosa en una muestra de 1µL.

PARTE II: CUALIFICACION DEL EQUIPO INVESTIGADOR

Personal que llevará a cabo las tareas con AB, OMG, SQP y/o SR

Apellidos, Nombre	NIF	Vinculación ⁽³⁾	Nivel Académico ⁽⁴⁾	Experiencia/Formación específica en riesgos AB, SQP y/o SR	Órgano acreditador ⁽⁵⁾	Año
CARMEN MARTÍNEZ GRACIÁ	27466663V	Personal funcionario Universidad de Murcia	Doctor	Seguridad e Higiene en el Laboratorio (NCB1, NCB2, y NCB3)	Universidad de Murcia	2019

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

PARTE III: VALIDEZ CIENTIFICA Y METODOLOGIA**1. Objetivos científicos del proyecto y justificación. (Máx 10 líneas)**

En este ensayo se pretende comparar el impacto de un nuevo proceso tecnológico aplicado a un zumo de frutas, en la respuesta postprandial de la glucosa en sangre en adultos sanos, además comprobar que los productos obtenidos presentan buenas propiedades funcionales y realizar ensayos en sujetos para determinar de forma experimental el índice glucémico. La principal variable respuesta será la modificación de la concentración de la glucosa en sangre inducida por los diferentes tipos de zumos en algún punto de la curva trazada. Como criterios de inclusión se establece que los sujetos sean adultos sanos (18-50 años), que no tomen medicación, sin embarazo, no diabetes mellitus, enfermedad digestiva, ingesta de suplementos vitamínicos/minerales, sin alergia diagnosticada, con un IMC entre 20 y 30 kg/m², con peso corporal estable. Se trata de un ensayo doble ciego, aleatorizado y cruzado, por lo que todos los participantes recibirán tres tratamientos (los dos zumos problema y una bebida control con la misma cantidad de azúcares que los anteriores).

2. Tipo de Exposición

La exposición a los agentes biológicos puede ser de dos tipos:

- Exposición por intención deliberada de utilizar o manipular un agente biológico, que constituye el propósito principal del trabajo. Actividades de este tipo serían las desarrolladas con animales deliberadamente infectados o en los laboratorios cuya actividad principal constituye el trabajar con agentes biológicos. Otras actividades encuadradas en este grupo serían, por ejemplo, las relacionadas con las industrias de biotecnología: industrias farmacéuticas (para la obtención de antibióticos, enzimas, vacunas virales); industria alimentaria (cerveza, yogur); etc.
- Exposición no intencionada o incidental al propósito principal del trabajo. En este caso la actividad no implica la manipulación, ni el trabajo con contacto directo o el uso deliberado del agente biológico pero sí existe un riesgo de contaminación por agentes biológicos. Este sería el caso del trabajo en contacto con seres humanos o animales o sus productos (tejidos, sangre o fluidos), así como el contacto con elementos o medios donde dicho agente vive o puede sobrevivir (materiales, agua, suelo, alimentos, residuos ...), que servirán como fuente de exposición.

a) En esta actividad ¿se realizan tareas en las que pueda haber exposición AB? (con independencia de que sea deliberada o no)

NO SI

Tipo de material / agente biológico que se utiliza:

Cría y manejo de animales Tejidos/sangre/fluidos animales Tejidos/sangre/fluidos humanos
 Microorganismos Cultivos celulares Endoparásitos Otros/(Indicar):

b) En esta actividad, ¿se realizan tareas de uso confinado de OMG?

NO SI

Tipo de material biológico que se utiliza:

Microorganismos Animales Plantas

NP Ref CBE:

Investigador Principal:

c) En esta actividad, ¿se realizan tareas en las que hay intención de utilizar SQP (Tóxicas, Cancerígenas, Inflamables, etc.)?

X NO SI

Tipo de SQP que se utiliza:

d) En esta actividad, ¿se realizan tareas en las que hay intención de utilizar SR?

X NO SI

Especifique:

Radioisótopo Equipo radiológico Instalación radiactiva **3. Datos referentes a los AB, SQP y/o SR.**

La clasificación del tipo de los agentes biológicos a los que estén o pueda estar expuesto el personal se hace de acuerdo con la tabla y criterios de clasificación contenidos en el **anexo II del RD 664/97** y sus actualizaciones. Si un agente no consta en la tabla se deberá estimar su riesgo de infección teniendo en cuenta las siguientes definiciones:

- Grupo 1: aquél que resulta poco probable que cause una enfermedad en el ser humano, los animales y/o el medio ambiente.
- Grupo 2: aquél que puede causar una enfermedad en el ser humano, los animales y/o el medio ambiente y puede suponer un peligro para las personas expuestas, pero es poco probable que se propague a la colectividad y existe una profilaxis o un tratamiento eficaz.
- Grupo 3: aquél que puede causar una enfermedad grave en el ser humano, los animales y/o el medio ambiente y presenta un serio peligro para las personas expuestas, con riesgo de que se propague a la colectividad y existe una profilaxis o un tratamiento eficaz.
- Grupo 4: aquél que causa una enfermedad grave en el ser humano, los animales y/o el medio ambiente, supone un serio peligro para las personas expuestas, con muchas probabilidades de que se propague a la colectividad y sin que exista una profilaxis o un tratamiento eficaz.

En caso de duda entre dos grupos deberá considerarse en el de peligrosidad superior. La **Tabla I** de la Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionadas con la exposición a agentes biológicos del INSHT.

a) Microorganismos (hongos, virus, bacterias, priones)

Nombre	Tipo	Grupo de Riesgo (Grupo 1, 2, 3 o 4)	Notas adicionales ¹⁶⁾	Volumen máximo de muestra que se maneja cada vez. Concentración aproximada

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

b) Cultivos celulares

Especificar el tipo de cultivo celular que va a utilizarse de acuerdo a la siguiente clasificación:

1. Líneas celulares bien caracterizadas de origen humano o de simios
2. Líneas celulares bien caracterizadas de origen no humano ni de simios, con bajo riesgo de infección endógena con patógenos humanos
3. Líneas celulares o cepas no totalmente caracterizadas o autenticadas
4. Células con patógenos endógenos y células deliberadamente infectadas
5. Células sanguíneas, linfoides, tejido nervioso, etc. de origen humano o simio
6. Células sanguíneas, linfoides, tejido nervioso, etc., de origen no humano ni de simios
7. Otros

Para más información sobre riesgos derivados del trabajo con cultivos celulares y medidas de contención consultar el **apéndice 2** de la Guía técnica para la evaluación y prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos del INSH.

Tipo de Cultivo	Descripción/características	Grupo de Riesgo (Grupo 1, 2, 3 o 4)	Notas adicionales ⁽⁶⁾

c) Material biológico

Tipo de Material (Cria y manejo de animales, Tejido, sangre y/o fluidos animales o humanos, otros)	Descripción/características	Grupo de Riesgo (Grupo 1, 2, 3 o 4)	Notas adicionales ⁽⁶⁾
Sangre humanos, sin embargo se considera mínima exposición por el bajo volumen de muestra y el bajo nivel de exposición.	El volumen de muestra extraída será de 1 µL y se absorberá de forma instantánea con una tira reactiva para medir glucosa, por lo que no existirá excedente de muestra.	Grupo 1	Dado el pequeño volumen de muestra y forma de realizar el análisis, los riesgos biológicos son mínimos

d) Organismo modificado genéticamente

Nombre:	
Huésped:	
Vector utilizado:	
Inserto y especie de procedencia del inserto:	
Proteína que codifica:	
Grupo de riesgo:	
Volumen máximo de muestra que se maneja cada vez:	

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

e) Sustancias químicas peligrosas (Tóxicas, Cancerígenas, Inflamables, etc.). Rellenar una tabla por producto.

Nombre producto*	
Nº CAS**	
Fase H**	
EPIs	
Medidas de protección colectiva y minimización de riesgos a terceros	
Nº de Laboratorio	
Nombre Responsable	
Centro	

*Adjuntar fichas de seguridad del producto

** Consultar en la ficha de seguridad del producto

f) Sustancias radiactivas

Radioisótopo (s)	Compuestos marcados	Actividad por experimento (μCi o kBq)

3.1 Frecuencia y periodicidad de uso.

--

3.2 Trayectoria completa de los AB y OMG. Describir el recorrido desde su obtención hasta su eliminación.

Modo de obtención / centro de procedencia: La muestra de sangre se obtendrá mediante una punción en el dedo utilizando lancetas estériles retráctiles de seguridad, de un solo uso (Verifine® 23G/1.8mm). Previos estudios sugieren que la sangre capilar, más que la venosa, es más fiable para los test de glucosa en sangre. Se pedirá a los participantes que caliente previamente el dedo para incrementar el flujo de sangre y no comprimirlo para extraer la sangre ya que se puede diluir el plasma. La glucosa en sangre se medirá utilizando el dispositivo MultiCareIn®, que se calibrará diariamente siguiendo las instrucciones del fabricante, pudiendo medir glucosa en una muestra de 1 μL .

Transporte: NO lo hay

Recepción: NO lo hay

Almacenamiento: NO lo hay

Eliminación: Los residuos obtenidos en el ensayo se eliminarán de acuerdo con lo establecido en el manual de Gestión de residuos Peligrosos de la Universidad de Murcia (contenedores amarillos de 5 litros de polipropileno, para eliminar las lancetas, guantes y las tiras impregnadas) Se etiquetará de forma correcta, no se llenará más del 80% y se entregará cerrado.

Nº Ref CBEc

Investigador Principal

3.3 En el uso de SQP.

Explicar el tipo de manipulación a realizar con este producto o productos: NO procede

3.4. En el caso de uso de SR.

Explicar el tipo de manipulación a realizar con las sustancias radiactivas: NO procede

PARTE IV: ASPECTOS ETICOS ESPECIFICOS DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CON AGENTES BIOLÓGICOS**Evaluación del riesgo** (En caso de manejo de varios agentes de distinto nivel de riesgo considérese el de nivel superior)

<input checked="" type="checkbox"/>	Nivel I: Riesgo individual y poblacional escaso o nulo. Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
<input type="checkbox"/>	Nivel II: Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo. Los agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
<input type="checkbox"/>	Nivel III: Riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
<input type="checkbox"/>	Nivel IV: Riesgo individual y poblacional elevado. Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

a) Características del riesgo:

i) ¿Los agentes biológicos que se utilizan implican algún tipo de efecto potencialmente nocivo?

	<u>Grupo Diana</u>	<u>Tipo efecto nocivo</u>
<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> Ser humano	<input type="checkbox"/> Infeccioso
<input checked="" type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> Animales	<input type="checkbox"/> Alérgico
	<input type="checkbox"/> Medio Ambiente	<input type="checkbox"/> Tóxico
		<input type="checkbox"/> Otro:

ii) ¿Los OMG que se utilizan implican algún tipo de efecto potencialmente nocivo?

<input type="checkbox"/>	Ninguno o insignificante.
<input type="checkbox"/>	Enfermedades que afecten a las personas, incluidos los efectos alérgicos o tóxicos.
<input type="checkbox"/>	Enfermedades que afecten a los animales o a los vegetales.
<input type="checkbox"/>	Efectos deletéreos debidos a la imposibilidad de tratar una enfermedad o de realizar una profilaxis eficaz.
<input type="checkbox"/>	Efectos deletéreos debidos al establecimiento o a la diseminación en el medio ambiente.
<input type="checkbox"/>	Efectos deletéreos debidos a la transferencia natural de material genético insertado a otros organismos.

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

Los efectos potencialmente nocivos se relacionan con :

<input type="checkbox"/>	El organismo receptor.
<input type="checkbox"/>	El material genético insertado procedente del organismo donante.
<input type="checkbox"/>	El vector.
<input type="checkbox"/>	El organismo donante (si se utiliza durante la operación).
<input type="checkbox"/>	El organismo modificado genéticamente resultante.

iii) Describir brevemente la enfermedad o efectos nocivos que puedan derivarse del uso de agentes y/o material biológico. Principales síntomas, vías de transmisión, tratamiento, etc.

b) ¿Existe vacuna eficaz o tratamiento profiláctico disponible?

PARTE V: MEDIDAS DE SEGURIDAD DE LA INSTALACIÓN

a) Laboratorio en el que se tiene previsto realizar la actividad con AB/OMGs

Instalación	Código Patrimonial	Nivel de contención (Nivel 1: Nivel de contención 1, Laboratorio básico. Nivel 2: Nivel de contención 2, laboratorio básico con cabina de seguridad biológica u otros dispositivos apropiados de protección personal o contención física. Nivel 3: Nivel de contención 3, laboratorio restringido con cabina de seguridad biológica u otros dispositivos apropiados de protección personal o contención física. Nivel 4: Laboratorio estanco, de contención máxima)	Ubicación
Estacias, Unidad de Nutrición	B1 6.014, B1 6.015, B1 6.016, B1 6.017, B1 6.018	Nivel 1	6ª Planta Edificio VITALIS

b) ¿La instalación dispone de autorización para el trabajo con este AB/OMGs?

SI NO PRESENTADA Y PENDIENTE DE RESOLUCION

Entidad y fecha de autorización:

Nº Ref.CBE:

Investigador Principal:

Pendiente de presentación. Somos conscientes de que es una tarea a realizar en las próximas semanas.

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

c) Laboratorio en el que se tiene previsto realizar la actividad con SR

Instalación Radiactiva/Equipo radiológico	Código Patrimonial	Ubicación	Campus

d) ¿La instalación dispone de autorización para el trabajo con la sustancia radiactiva /equipo radiológico (SR)

SI NO PRESENTADA Y PENDIENTE DE RESOLUCION

e) Reducción de riesgos

- i. Además de para las personas que se tiene previsto trabajen con AB, SQP, SR, OMGs, ¿hay riesgo de exposición para otras personas?

SI NO
 Especificar (mantenimiento, limpieza, etc.):
 En caso afirmativo deberá informar a dichas personas

- ii. ¿Se tienen previstas medidas para limitar y reducir el número de personas expuestas?

SI NO
 Especificar (justificar en caso negativo): NO procede (utilizaremos contenedores de residuos apropiados)

- iii. Describir las medidas de seguridad ESPECÍFICAS previstas para la manipulación del AB,OMGs, SQP y/o SR

Se utilizarán guantes apropiados en el procedimiento de obtención de muestra y durante el ensayo. Desinfectante alcohol 96%. Contenedores amarillos para objetos punzantes 5L.

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

iv. Describir los métodos de descontaminación/esterilización del material contaminado. Especificar productos utilizados

El material (lancetas de seguridad y tiras reactivas) serán introducidas inmediatamente tras su utilización en contenedores de residuos normalizados, según dispone la Universidad de Murcia.

v. Con respecto a la gestión de residuos biológicos, OMGs, químicos y radiactivos, conoce, aplica y tiene a su disposición el "Manual de Gestión de Residuos Peligrosos de la Universidad de Murcia" (<http://www.um.es/web/sai/contenido/servicios/radioproteccion-residuos/normas>)

SI NO

vi. Existe un protocolo escrito de actuación en caso de accidente biológico

SI NO

En caso afirmativo, adjuntar protocolo a la memoria.

En caso negativo, justifíquelo: No procede por el tipo de ensayo que se va a realizar

No procede en este caso.

vii. En lo que se refiere al uso de agentes químicos, indicar el protocolo escrito de actuación en caso de accidente

Exposición por punción y/o corte:

Exposición a aerosoles:

Exposición por contacto:

Vertido:

Otros:

f) ¿Se prevé que las tareas con el AB, OMGs, SQP o SR, o parte de ellas se realicen en dependencias de otra institución? (*)

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

 NO SI

Indicar el lugar elegido, justificando la necesidad de realizar las tareas en ese lugar

 ¿Cumple con los requisitos de contención requerido para estos Agente biológico? SI NO

 El trabajo con este Agente biológico, ¿ha sido notificado a la Autoridad competente? SI NO

 ¿Dispone de la autorización necesaria para este tipo de trabajo? SI NO PENDIENTE

[*] Se recuerda que el informe del CBE, sólo es válido para labores desarrolladas en instalaciones de la UMU, por personal de la UMU o por cualquier otro que, en aplicación de la normativa vigente, desarrolle sus labores en la misma.

PARTE VI: VIGILANCIA Y PROTECCIÓN DE LA SALUD

a) ¿Al personal expuesto a agentes biológicos, en caso de existir, se le ofrece la posibilidad de vacunación?

 SI NO

Organismo sanitario responsable de la vacunación:

En caso negativo, justificar:

No procede.

b) ¿Se contemplan medidas especiales de protección para las personas especialmente sensibles que lo requieran (mujeres embarazadas, enfermos crónicos, etc.)?

 SI NO

Especificar:

En caso negativo, justificar:

No se consideran sujetos elegibles en el ensayo, ni participan como investigadores, personas especialmente sensibles.

Nº Ref CBE:

Investigador Principal:

c) ¿Todas las personas que van a tener contacto intencionado o no con el AB, OMGs, SQP y/o SR tienen seguro de accidentes y de responsabilidad civil?

SI NO

Especificar seguro, o justificar su ausencia:

Al ser personal de la Universidad de Murcia tenemos seguro de accidentes.

El abajo firmante, en calidad de investigador/a principal de este procedimiento, declara que la información contenida en este formulario es completa y se corresponde con la realidad. Asimismo, declara que aplicará las medidas y prácticas de bioseguridad necesarias de acuerdo con la normativa legal relativa a la protección humana y del medio ambiente (Ley 31/1995, RD 664/97, Ley 9/2003 y RD 178/2004), y cualquier cambio significativo de las condiciones de trabajo en que se desarrollará este procedimiento de investigación, será comunicado previamente al Comité de Bioseguridad.

Fecha: Murcia 28 de febrero de 2019

Firma del Investigador/a Responsable que hace la declaración Asunción Mª Hidalgo

(*) Sustancias químicas peligrosas (SQP), tal como las define el Reglamento sobre clasificación, etiquetado y envasado (CLP) de sustancias y mezclas (CE) 1272/2008.

(**) Sustancias radiactivas e instalaciones radiactivas, según la normativa recogida en el R.D 1836/1999 y en el R.D. 783/2001. Equipos radiológicos, según el RD 1085/2009, de 3 de julio, por el que se aprueba el Reglamento sobre instalación y utilización de aparatos de Rayos X con fines de diagnóstico médico.

(1): Tipo de memoria

Nueva: Aquella actividad que no ha sido evaluada anteriormente por este comité

Corrección: para aquellas memorias cuya situación sea la de informe favorable condicionado

Modificación relevante: para cualquier cambio en alguno de los contenidos de una memoria previamente aprobada (por ejemplo, miembros del equipo de investigación, nuevo laboratorio, etc.)

Prorroga: Para aquellas actividades que van a durar un tiempo superior a los tres años de validez del informe favorable o al previamente aprobado.

(2): Fondos con los que se lleva a cabo el procedimiento (Subvención entidad pública, Fondos Propios, Contrato con Empresas, etc).

(3): Vinculación: PDI, PAS, Becario, PI, Estudiante, Vinculado

(4): Nivel académico: Doctor, Ldo/Graduado, Diplomado, FP, Otro.

(5): Organismo acreditador: UMU, INSHT, CSN, Otro.

(6): Notas adicionales

Si se requiere, indicar

A: posibles efectos alérgicos

D: si se requiere conservar, conforme a la ley la lista de trabajadores expuestos

T: si produce toxinas

V: si existe una vacuna eficaz disponible

Anexo VII. Formulario de Bioseguridad para proyectos.

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

SOLICITUD DE INFORME

Datos del Investigador/a Principal o Responsable:

Nombre y Apellidos: Asunción Mª Hidalgo Montesinos		DNI 27.452.830-F
Dpto.: Ingeniería Química	Centro/Facultad: Química	
Puesto/Cargo: Profesora Titular		
Dirección: Campus Universitario de Espinardo, CP 30100, Murcia		
Teléfono: 868887355	Fax: 868884148	e-mail: ahidalgo@um.es

Personal adscrito al proyecto:

Nombre y Apellidos, DNI y Titulación:
 Dña. Mª Cruz Arcas Miñarro, 23242770M, Lcda en Biología y Dra en Biología por la UMU, responsable del Proyecto en AMC
 D. Sergio Streitenberger Jacobi, 49247803L, Doctor en Bioquímica
 D. José Antonio Macario Legaz, 48517227-S, Graduado en Ingeniería Química, Máster en Ingeniería Química.

Cumplimentar al menos tres de las personas que colaboran en el proyecto, investigación o estudio

Título Proyecto y duración:	DESARROLLO DE NUEVOS INGREDIENTES BIOACTIVOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS PROCEDENTES DEL PROCESADO DE CÍTRICOS, duración = 30 meses		
Financiación (1):	CDTI	Año: 2017	NºR: IDI-2017-1262
<i>(1) CICYT, FIS, Plan Propio, proyecto FUE, contrato directo con empresa o similar, otros.</i>			
En caso de empresa, indicar nombre y datos: AMC Innova Juice and Drinks SL Zukán SL			

INFORMACIÓN SOBRE EL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La investigación a realizar incluye toma de muestras biológicas de origen humano? (Marque una opción)	<input checked="" type="checkbox"/> Sí	<input type="checkbox"/> NO
--	--	-----------------------------

- Remitir proyecto completo en formato pdf.

Incluir:

La extracción, separación y/o transformación de los azúcares naturales procedentes de cítricos permite incrementar el valor añadido y dotar de funcionalidad a ciertos alimentos. Además, la separación de la fracción azucarada procedente de estos frutos implica la concentración de compuestos bioactivos de gran interés tecnológico, los cuales añadidos a determinados productos aportarían un valor añadido.

El estudio va encaminado a la obtención de bebidas saludables con azúcares propios de los subproductos de los cítricos, incorporándose así compuestos funcionales beneficiosos para

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

la salud, como es la fibra, los flavonoides, etc, y que sustituyan a los productos con contenidos de azúcares provenientes de la caña de azúcar y la remolacha. Además, el proyecto supone una mejora en el impacto medioambiental al suponer una valorización y mejor aprovechamiento de los residuos de la industria agroalimentaria, empleando los subproductos que contienen.

- Hipótesis y objetivos.

En este ensayo se pretende comparar el impacto de un nuevo proceso tecnológico aplicado a un zumo de frutas, en la respuesta postprandial de la glucosa en sangre en adultos sanos. Comprobar que los productos obtenidos presentan buenas propiedades funcionales. Realizar ensayos en sujetos para determinar de forma experimental el índice glucémico.

- Descripción de la muestra (especificando reclutamiento, tamaño, características del grupo control si lo hubiera, etc...):

El número de participantes en el estudio se ha calculado en relación a datos previos de estudios realizados sobre nivel de glucosa en sangre (Paiva et al., 2019). La muestra mínima será de 15 participantes, calculada con un nivel de confianza del 95%. Considerando una tasa de abandono del 15%, aumentamos la muestra a 18. La principal variable respuesta será la modificación de la concentración de la glucosa en sangre inducida por los diferentes tipos de zumos en algún punto de la curva trazada.

Como criterios de inclusión se establece que los sujetos sean adultos sanos (18-50 años), que no tomen medicación, sin embarazo, no diabetes mellitus, enfermedad digestiva, ingesta de suplementos vitamínicos/minerales, sin alergia diagnosticada, con un IMC entre 20 y 30 kg/m², con peso corporal estable.

El reclutamiento se realizará dentro de la comunidad universitaria.

Se trata de un ensayo doble ciego, aleatorizado y cruzado, por lo que todos los participantes recibirán tres tratamientos (los dos zumos problema y una bebida control con la misma cantidad de azúcares que los anteriores).

- Fecha de la recogida de la muestra: (Fecha en la que se tiene previsto recoger los datos de la muestra)

El ensayo se realizará durante el segundo cuatrimestre del curso 2018/2019, realizándose las mediciones y el análisis de los datos de forma inmediata.

- Metodología y experiencia del grupo de investigación. Resumir el método. Indicar un máximo de 5 referencias bibliográficas relacionadas con los antecedentes del trabajo y el método, preferiblemente del propio equipo investigador:

Como hemos comentado se trata de un ensayo aleatorizado, cruzado y doble ciego en el que los participantes recibirán tres bebidas: zumo con tratamiento tecnológico A, zumo con tratamiento tecnológico B (ambos con la misma composición), y bebida control con una concentración de azúcares semejante.

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

A cada zumo se le asignará un código por el coordinador del estudio, de tal manera que los investigadores y los participantes no conocerán sus características.

Dos días antes del ensayo, se les pedirá a los voluntarios que no tomen alcohol, que mantengan un nivel moderado de consumo de carbohidratos y una actividad física ligera. Los participantes serán informados de la necesidad de no consumir ningún tipo de alimento al menos 10 horas antes del ensayo y no realizar ejercicio intenso durante esa noche o por las mañanas del ensayo. Entre cada tratamiento se realizará un descanso de una semana.

El ensayo se realizará en la 6ª planta del edificio VITALIS de la Universidad de Murcia. Cada participante acudirá una vez por semana al centro (aproximadamente 3h por visita, cada 7 días). A principio de la mañana (8 am aproximadamente) del día del experimento, se tomará una muestra de sangre (tiempo 0) y se les administrará seguidamente una de las bebidas (250 ml) que deberán consumir en unos 10-15 minutos. Posteriormente se seguirán realizando extracciones de sangre a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Tras el comienzo de la ingesta de la bebida.

La muestra de sangre se obtendrá mediante una punción en el dedo utilizando lancetas estériles de un solo uso (Verifine® 23G/1.8mm). Previos estudios sugieren que la sangre capilar, más que la venosa, es más fiable para los test de glucosa en sangre. Se pedirá a los participantes que caliente previamente el dedo para incrementar el flujo de sangre y no comprimirlo para extraer la sangre ya que se puede diluir el plasma. La glucosa en sangre se medirá utilizando el dispositivo MultiCareIn®, que se calibrará diariamente siguiendo las instrucciones del fabricante, pudiendo medir glucosa en una muestra de 1µL.

Se compararán las diferencias en el incremento del área bajo la curva de la glucosa en sangre.

Experiencia del grupo de investigación.

El grupo tiene experiencia previa en la realización de este tipo de ensayos en colaboraciones con los miembros del equipo de investigación E098-02 (www.satin-satiety.eu/).

Otras referencias que utilicen metodologías semejantes:

Lightowler, H., Thondre, S., Holz, A., & Theis, S. (2018). Replacement of glycaemic carbohydrates by inulin-type fructans from chicory (oligofructose, inulin) reduces the postprandial blood glucose and insulin response to foods: report of two double-blind, randomized, controlled trials. *European journal of nutrition*, 57(3), 1259-1268.

Xu, J., Jönsson, T., Plaza, M., Håkansson, Å., Antonsson, M., Ahrén, I. L., ... & Granfeldt, Y. (2018). Probiotic fruit beverages with different polyphenol profiles attenuated early insulin response. *Nutrition journal*, 17(1), 34.

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

Rodrigues, N., Peng, M., Oey, I., & Venn, B. J. (2018). Glycaemic, uricaemic and blood pressure response to beverages with partial fructose replacement of sucrose. *European journal of clinical nutrition*, 1.

de Paiva, A., Gonçalves, D., Ferreira, P., Baldwin, E., & Cesar, T. (2019). Postprandial effect of fresh and processed orange juice on the glucose metabolism, antioxidant activity and prospective food intake. *Journal of Functional Foods*, 52, 302-309.

- **Beneficios esperados:** Se espera determinar si al comparar la ingesta de una bebida convencional del mercado frente a la alternativa propuesta con un mayor contenido en azúcares procedentes de la fruta, el índice glucémico presenta variaciones.

Las estrategias dietéticas para modular los parámetros metabólicos tras la ingesta de alimentos y bebidas, como los niveles de glucosa en sangre, pueden ayudar a reducir la ingesta de nutrientes energéticos, incrementar la saciedad y mejorar el mantenimiento de peso corporal. Actualmente se ha extendido la creencia de que todos los zumos de fruta favorecen la ganancia de peso y la obesidad, únicamente teniendo en cuenta la concentración de azúcares libres y las calorías totales que pueda aportar. Hay que tener en cuenta que el método de procesado para la obtención de zumos puede influir en la concentración y solubilidad de sus nutrientes. Este estudio podrá clarificar cuál de los tratamientos aplicados al zumo de frutas es el indicado para producir una disminución de la glucosa en sangre, y por lo tanto ser más indicado para evitar el desarrollo de diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares (aunque también existen otros factores determinantes de gran importancia como el estilo de vida).

- **¿Existe algún tipo de contraprestación y/o seguro para los participantes?:** Si, existe contraprestación, se les dará un lote de productos elaborados por AMC innova.

- **Posibles efectos indeseables o secundarios:** No se han descrito

- **Consentimiento informado** (*Imprescindible adjuntar el modelo a emplear, para poder realizar la evaluación*)

- **Hoja de información facilitada a los participantes** (*Imprescindible adjuntar el modelo a emplear para realizar la evaluación*)

- **Derecho explícito de la persona a retirarse del estudio. Garantías de confidencialidad**

*Caso de no existir referencias que avalen la metodología, deberá incluirse una descripción detallada del procedimiento experimental a seguir.

Firma



Fecha 26/02/2019

Asunción M. Hidalgo Montesinos
Nombre y apellidos (Investigador responsable)

Enviar a comision.etica.investigacion@um.es

Anexo VIII. Informe favorable de la Comisión de Bioseguridad en Experimentación (CBE).

	Vicerrectorado de Investigación y Transferencia		
---	--	---	---

**INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de
Ética de Investigación de la Universidad de Murcia,

CERTIFICA:

Que D. José Antonio Macario Legaz ha presentado la memoria de trabajo de la
Tesis Doctoral titulada: *"Aprovechamiento biotecnológico mediante
minimización de residuos en el procesado de frutas y vegetales"*, dirigido por D.ª
Asunción M.ª Hidalgo Montesinos, a la Comisión de Ética de Investigación de la
Universidad de Murcia.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de
conformidad con lo acordado el día seis de marzo de dos mil diecinueve¹, por
unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de
la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan firmo esta certificación
con el visto bueno del Presidente de la Comisión.

Vº Bº
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Francisco Esquembre Martínez

ID: 2341/2019

¹A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del
Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación





Código seguro de verificación: RUXFMseC-1jBL4qTi-TPwCeljY-kZrgEduR

esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2010, de 2 de octubre. su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Anexo IX. Formulario para Tesis enmarcadas en proyectos previamente aprobados por el Comité de Bioseguridad.

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

SOLICITUD DE INFORME PARA TESIS DOCTORALES

Datos del Doctorando:

Nombre y Apellidos: José Antonio Macario Legaz		DNI 48517227-S
Dpto.: Ingeniería Química		Centro/Facultad: Química
Puesto/Cargo: Doctorando en Química Básica y Aplicada		
Dirección: C/ Marqués de Lozoya nº4 Barrio del Progreso (Murcia)		
Teléfono: 677331254	Fax:	e-mail: joseantonio.macario@um.es

Datos del Director/es de la tesis:

Nombre y Apellidos: Asunción Mª Hidalgo Montesinos		DNI 27452830-F
Dpto.: Ingeniería Química		Centro/Facultad: Química
Puesto/Cargo: Profesora Titular		
Dirección: Campus Universitario de Espinardo, CP 30100, Murcia		
Teléfono: 868887355	Fax: 868884148	e-mail: ahidalgo@um.es

Nombre y Apellidos:		DNI
Dpto.:		Centro/Facultad:
Puesto/Cargo:		
Dirección:		
Teléfono:	Fax:	e-mail:

Nombre y Apellidos:		DNI
Dpto.:		Centro/Facultad:
Puesto/Cargo:		
Dirección:		
Teléfono:	Fax:	e-mail:

Titulo de la tesis:	Aprovechamiento biotecnológico mediante minimización de residuos en el procesado de frutas y vegetales.
---------------------	---

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

INFORMACIÓN SOBRE EL PROTOCOLO EXPERIMENTAL

La investigación a realizar incluye toma de muestras biológicas de origen humano? (Marque una opción)	<u>SI</u>	NO
--	-----------	----

Resumen de la tesis

En la Región de Murcia existen numerosas industrias dedicadas a la actividad industrial del procesado de frutas y vegetales. Como consecuencia de esta actividad, en el procesado de frutas y vegetales se generan diferentes tipos de fracciones de las cuales, algunas de ellas hasta la fecha no son valorizables/reutilizables. Esto supone un problema, por lo que existe un interés y una preocupación por lograr un mejor aprovechamiento de los mismos, así como de los productos y subproductos que contienen, con el fin de obtener un mayor rendimiento económico y minimizar los gastos que suponen la gestión de estos residuos.

A través de la utilización de las tecnologías emergentes, o procesos biotecnológicos, como elementos innovadores del proyecto, se ha intentado buscar una explotación nutricional para estos subproductos, dado que poseen compuestos de alto valor añadido, como aceites, agentes antioxidantes donde encontramos más de treinta polifenoles (Abad-García et al. 2014) rentabilizando así su valor económico.

El objetivo global de este proyecto es la búsqueda de soluciones biotecnológicas encaminadas a realizar un máximo aprovechamiento de las diferentes fracciones que se generan en el procesado de la fruta y de los compuestos vegetales. Estas fracciones presentan un potencial biotecnológico importante ya que una vez caracterizadas, e identificadas, pueden ser el punto de partida para la formulación y preparación de nuevos productos.

La metodología a seguir conlleva la identificación de cada una de las diferentes fracciones que son susceptibles de ser valorizadas como son:

- la pulpa fina procedente del despulpado del zumo. Esta pulpa que es un residuo del zumo de en torno a un 9% en peso (Navarro et al. 2008), es causante de problemas económicos y medioambientales por su fácil fermentación (Tripodo et al. 2004).

- los extractos concentrados clarificados del zumo de fruta que poseen un alto o un bajo contenido en azúcares y extractos ricos en agentes antioxidantes, donde los procesos convencionales de clarificación, tienen por objeto eliminar los sólidos insolubles y destruir las sustancias pécticas degradando la pectina y el almidón con enzimas específicas, floculando la nubosidad con agentes clarificantes (bentonita, gelatina y / o silicasol) (Grampp, 1977), siendo las pectinas las principales causantes de la turbidez presente (Dey and Banerjee 2014). Con la filtración mediante membranas se asegura un permeado de excelente calidad con un aumento de la claridad y por consiguiente una notable eliminación del color (Jegatheesan et al. 2012).

Una vez identificadas y caracterizadas tanto de forma físico-química, como de forma microbiológica, se evaluará su estabilidad y se realizará un estudio de la vida útil.

Además, se estudiarán el comportamiento de sistemas emulsionantes a partir de aceites vegetales, aptos para el uso alimentario (aceites esenciales de cítricos y otros de distintos orígenes). Estos sistemas están clasificados como emulsiones oil-in-water (OW) y son

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

preparados mediante dispersión de aromas o aceites vegetales en una fase acuosa (Taherian et al. 2008).

Estas emulsiones están compuestas de dos fases, una oleosa con aceites esenciales, aceites vegetales y agentes espesantes. La otra fase denominada continua, donde se encuentra agua, goma arábiga o almidón modificado, ácido cítrico, preservantes y colorantes (Kaufman and Nissim 1984, Garti et al. 1991, Chanamai and McClements 2000, Chanamai and McClements 2001).

Durante este proceso se determinará la posibilidad de comercializar de forma directa estos nuevos productos, o su aplicación en diferentes desarrollos (zumos, smoothies, compound de frutas, bebidas refrescantes, etc.).

Por todo ello, la Tesis Doctoral queda perfectamente justificada, al contemplar el desarrollo de nuevos procesos biotecnológicos que puedan dar solución a las diferentes fracciones residuales que contienen (pulpa, azúcares, agentes antioxidantes y aceites vegetales, entre otros), valorizando dichos compuestos al darle una salida en nuevas formulaciones y preparados, ya que si no fuera así tendrían que ser eliminados como un residuo.

La valorización de las diferentes fracciones, no sólo repercute en mejorar la rentabilidad de las industrias procesadoras de frutas y vegetales, sino que además, este tipo de acciones basadas en el aprovechamiento íntegro de las frutas y vegetales ayuda a reducir la contaminación ambiental, mediante la minimización de los diferentes residuos.

Esta acción pretende proporcionar una visión más amplia sobre las posibilidades biotecnológicas para el aprovechamiento de estos residuos y su posible transformación en productos de alto valor añadido.

Incluir:**- Hipótesis y objetivos.**

En este ensayo se pretende comparar el impacto de un nuevo proceso tecnológico aplicado a un zumo de frutas, en la respuesta postprandial de la glucosa en sangre en adultos sanos. Comprobar que los productos obtenidos presentan buenas propiedades funcionales. Realizar ensayos en sujetos para determinar de forma experimental el índice glucémico.

- Material y Métodos:

- **Descripción de la muestra** (especificando reclutamiento, tamaño, características del grupo control si lo hubiera, etc...)

El número de participantes en el estudio se ha calculado en relación a datos previos de estudios realizados sobre nivel de glucosa en sangre (Paiva et al., 2019). La muestra mínima será de 15 participantes, calculada con un nivel de confianza del 95%. Considerando una tasa de abandono del 15%, aumentamos la muestra a 18. La principal variable respuesta será la modificación de la concentración de la glucosa en sangre inducida por los diferentes tipos de zumos en algún punto de la curva trazada.

Como criterios de inclusión se establece que los sujetos sean adultos sanos (18-50 años), que no tomen medicación, sin embarazo, no diabetes mellitus, enfermedad digestiva, ingesta de suplementos vitamínicos/minerales, sin alergia diagnosticada, con un IMC entre 20 y 30 kg/m², con peso corporal estable.

El reclutamiento se realizará dentro de la comunidad universitaria.

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

Se trata de un ensayo doble ciego, aleatorizado y cruzado, por lo que todos los participantes recibirán tres tratamientos (los dos zumos problema y una bebida control con la misma cantidad de azúcares que los anteriores).

- **Fecha de la recogida de la muestra** (indicar la fecha en la que se tiene previsto recoger la muestra)

El ensayo se realizará durante el segundo cuatrimestre del curso 2018/2019, realizándose las mediciones y el análisis de los datos de forma inmediata.

- **Metodología y experiencia del grupo de investigación.** Resumir el método. Indicar un máximo de 5 referencias bibliográficas relacionadas con los antecedentes del trabajo y el método, preferiblemente del propio equipo investigador

Como hemos comentado se trata de un ensayo aleatorizado, cruzado y doble ciego en el que los participantes recibirán tres bebidas: zumo con tratamiento tecnológico A, zumo con tratamiento tecnológico B (ambos con la misma composición), y bebida control con una concentración de azúcares semejante.

A cada zumo se le asignará un código por el coordinador del estudio, de tal manera que los investigadores y los participantes no conocerán sus características.

Dos días antes del ensayo, se les pedirá a los voluntarios que no tomen alcohol, que mantengan un nivel moderado de consumo de carbohidratos y una actividad física ligera. Los participantes serán informados de la necesidad de no consumir ningún tipo de alimento al menos 10 horas antes del ensayo y no realizar ejercicio intenso durante esa noche o por las mañanas del ensayo. Entre cada tratamiento se realizará un descanso de una semana.

El ensayo se realizará en la 6ª planta del edificio VITALIS de la Universidad de Murcia. Cada participante acudirá una vez por semana al centro (aproximadamente 3h por visita, cada 7 días). A principio de la mañana (8 am aproximadamente) del día del experimento, se tomará una muestra de sangre (tiempo 0) y se les administrará seguidamente una de las bebidas (250 ml) que deberán consumir en unos 10-15 minutos. Posteriormente se seguirán realizando extracciones de sangre a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Tras el comienzo de la ingesta de la bebida.

La muestra de sangre se obtendrá mediante una punción en el dedo utilizando lancetas estériles de un solo uso (Verifine® 23G/1.8mm). Previos estudios sugieren que la sangre capilar, más que la venosa, es más fiable para los test de glucosa en sangre. Se pedirá a los participantes que caliente previenen el dedo para incrementar el flujo de sangre y no comprimirlo para extraer la sangre ya que se puede diluir el plasma. La glucosa en sangre se medirá utilizando el dispositivo MultiCareIn®, que se calibrará diariamente siguiendo las instrucciones del fabricante, pudiendo medir glucosa en una muestra de 1µL.

Se compararán las diferencias en el incremento del área bajo la curva de la glucosa en sangre.

Experiencia del grupo de investigación.

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

El grupo tiene experiencia previa en la realización de este tipo de ensayos en colaboraciones con los miembros del equipo de investigación E098-02 (www.satin-satiety.eu/).

Otras referencias que utilicen metodologías semejantes:

Lightowler, H., Thondre, S., Holz, A., & Theis, S. (2018). Replacement of glycaemic carbohydrates by inulin-type fructans from chicory (oligofructose, inulin) reduces the postprandial blood glucose and insulin response to foods: report of two double-blind, randomized, controlled trials. *European journal of nutrition*, 57(3), 1259-1268.

Xu, J., Jönsson, T., Plaza, M., Håkansson, Å., Antonsson, M., Ahrén, I. L., ... & Granfeldt, Y. (2018). Probiotic fruit beverages with different polyphenol profiles attenuated early insulin response. *Nutrition journal*, 17(1), 34.

Rodrigues, N., Peng, M., Oey, I., & Venn, B. J. (2018). Glycaemic, uricaemic and blood pressure response to beverages with partial fructose replacement of sucrose. *European journal of clinical nutrition*, 1.

de Paiva, A., Gonçalves, D., Ferreira, P., Baldwin, E., & Cesar, T. (2019). Postprandial effect of fresh and processed orange juice on the glucose metabolism, antioxidant activity and prospective food intake. *Journal of Functional Foods*, 52, 302-309.

- Beneficios esperados

Se espera determinar si al comparar la ingesta de una bebida convencional del mercado frente a la alternativa propuesta con un mayor contenido en azúcares procedentes de la fruta, el índice glucémico presenta variaciones.

Las estrategias dietéticas para modular los parámetros metabólicos tras la ingesta de alimentos y bebidas, como los niveles de glucosa en sangre, pueden ayudar a reducir la ingesta de nutrientes energéticos, incrementar la saciedad y mejorar el mantenimiento de peso corporal. Actualmente se ha extendido la creencia de que todos los zumos de fruta favorecen la ganancia de peso y la obesidad, únicamente teniendo en cuenta la concentración de azúcares libres y las calorías totales que pueda aportar. Hay que tener en cuenta que el método de procesado para la obtención de zumos puede influir en la concentración y solubilidad de sus nutrientes. Este estudio podrá clarificar cuál de los tratamientos aplicados al zumo de frutas es el indicado para producir una disminución de la glucosa en sangre, y por lo tanto ser más indicado para evitar el desarrollo de diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares (aunque también existen otros factores determinantes de gran importancia como el estilo de vida).

- ¿Existe algún tipo de contraprestación y/o seguro para los participantes?

Si, existe contraprestación, se les dará un lote de productos elaborados por AMC innova.

- Posibles efectos indeseables o secundarios

No se han descrito

- Consentimiento informado (Imprescindible adjuntar el modelo a emplear, para poder realizar la evaluación)

COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN

- Hoja de información facilitada a los participantes (Imprescindible adjuntar el modelo a emplear para realizar la evaluación)

(Añadir las páginas necesarias)

Fecha: 26/02/2019

Firma



José Antonio Macario Legaz

Nombre y apellidos alumno/a



Firma



Asunción Mª Hidalgo Montesinos

Nombre y apellidos Director/a

Enviar comision.etica.investigacion@um.es

Anexo X. Hoja de información al participante.

HOJA DE INFORMACIÓN A LA PERSONA PARTICIPANTE
sobre el proyecto **Desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos**

Estimado Sr. o Sra.:

Le invitamos a participar en un estudio de investigación sobre el desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos.

Título del proyecto: **Desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos**

Promotor o financiador del proyecto: **CDTI**

Lugar donde se procesará la muestra o toma de datos: **Edificio Vítalís**

Objetivos y finalidad

El estudio sobre el desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos pretende comparar el impacto de un nuevo proceso tecnológico aplicado a un zumo de frutas, en la respuesta postprandial de la glucosa en sangre en adultos sanos. Además, se pretende comprobar que los productos obtenidos presentan buenas propiedades funcionales.

El proyecto cuenta con el informe favorable de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

Datos de los investigadores

Ante cualquier duda o renuncia que pueda surgir en relación con su participación en la presente investigación, pueden dirigirse a la persona responsable de la misma, cuyos datos son los siguientes:

Nombre: Asunción M^a Hidalgo Montesinos

Cargo: Profesora Titular de Ingeniería Química

Dirección de contacto: Campus Universitario de Espinardo, 30100 (Murcia)

Correo electrónico: ahidalgo@um.es

Teléfono de contacto: 868887355

Datos referentes al participante. Informar sobre lo siguiente:

Naturaleza voluntaria de su participación. El participante es libre de participar, de modo que se puede negar a participar sin que ello le suponga ninguna merma en los potenciales beneficios a que tendría derecho en caso contrario.
Duración del estudio.

Cada participante acudirá una vez por semana al centro aproximadamente 3h por visita, cada 7 días y durante tres semanas.

Si se efectuará alguna compensación por la participación del sujeto en el estudio (por ejemplo, gastos de viaje), si procede.

Si, existe contraprestación, se les dará un lote de productos elaborados por AMC innova.

Beneficios generales de la investigación.

Se espera determinar si al comparar la ingesta de una bebida convencional del mercado frente a la alternativa propuesta con un mayor contenido en azúcares procedentes de la fruta, el índice glucémico presenta variaciones.

Las estrategias dietéticas para modular los parámetros metabólicos tras la ingesta de alimentos y bebidas, como los niveles de glucosa en sangre, pueden ayudar a reducir la ingesta de nutrientes energéticos, incrementar la saciedad y mejorar el mantenimiento de peso corporal. Actualmente se ha extendido la creencia de que todos los zumos de fruta favorecen la ganancia de peso y la obesidad, únicamente teniendo en cuenta la concentración de azúcares libres y las calorías totales que pueda aportar. Hay que tener en cuenta que el método de procesado para la obtención de zumos puede influir en la concentración y solubilidad de sus nutrientes. Este estudio podrá clarificar cuál de los tratamientos aplicados al zumo de frutas es el indicado para producir una disminución de la glucosa en sangre, y por lo tanto ser más indicado para evitar el desarrollo de diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares (aunque también existen otros factores determinantes de gran importancia como el estilo de vida).

Responsabilidad del equipo investigador de proporcionar asistencia sanitaria a los participantes, si procede.

Al final del estudio, el participante podrá conocer los resultados generales del estudio y los resultados individuales que le puedan afectar, si consiente a ello.

No, procede.

Si, al final del estudio, los productos o las intervenciones que se hayan demostrado seguros y eficaces en la investigación se proporcionarán a los sujetos que hayan completado su participación, y en qué condiciones, si procede.

No Procede.

Posibilidad de que la investigación dé lugar a productos de interés comercial y, en ese caso, la renuncia del participante a cualquier derecho de naturaleza económica, patrimonial o potestativa sobre los resultados o potenciales beneficios que puedan derivarse de manera directa o indirecta de las investigaciones que se lleven a cabo con la muestra que cede para investigación.

Riesgos e Inconvenientes para el participante

Descripción sucinta del procedimiento de obtención de muestra.

Se trata de un ensayo aleatorizado, cruzado y doble ciego en el que los participantes recibirán tres bebidas: zumo con tratamiento tecnológico A, zumo con tratamiento tecnológico B (ambos con la misma composición), y bebida control con una concentración de azúcares semejante.

A cada zumo se le asignará un código por el coordinador del estudio, de tal manera que los investigadores y los participantes no conocerán sus características.

Dos días antes del ensayo, se les pedirá a los voluntarios que no tomen alcohol, que mantengan un nivel moderado de consumo de carbohidratos y una actividad física ligera. Los participantes serán informados de la necesidad de no consumir ningún tipo de alimento al menos 10 horas antes del ensayo y no realizar ejercicio intenso durante esa noche o por las mañanas del ensayo. Entre cada tratamiento se realizará un descanso de una semana.

El ensayo se realizará en la 6ª planta del edificio VITALIS de la Universidad de Murcia. Cada participante acudirá una vez por semana al centro (aproximadamente 3h por visita, cada 7 días). A principio de la mañana (8 am aproximadamente) del día del experimento, se tomará una muestra de sangre (tiempo 0) y se les administrará seguidamente una de las bebidas (250 ml) que deberán consumir en unos 10-15 minutos. Posteriormente se seguirán realizando extracciones de sangre a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. Tras el comienzo de la ingesta de la bebida.

La muestra de sangre se obtendrá mediante una punción en el dedo utilizando lancetas estériles de un solo uso (Verifine® 23G/1.8mm). Previos estudios sugieren que la sangre capilar, más que la venosa, es más fiable para los test de glucosa en sangre. Se pedirá a los participantes que caliente previenen el dedo para incrementar el flujo de sangre y no comprimirlo para extraer la sangre ya que se puede diluir el plasma. La glucosa en sangre se medirá utilizando el dispositivo Contour® XT que se calibrará diariamente siguiendo las instrucciones del fabricante, pudiendo medir glucosa en una muestra de 1 µL.

Se compararán las diferencias en el incremento del área bajo la curva de la glucosa en sangre.

Descripción de riesgos inherentes al proceso de obtención de muestra, si es que los hubiese.

No se han encontrado riesgos inherentes.

Posibles inconvenientes vinculados con la donación y obtención de la muestra (si los hubiera),

incluida la posibilidad de ser contactado con posterioridad a fin de recabar nuevos datos u obtener nuevas muestras, para lo que podrá solicitársele información sobre el modo de hacerlo. En todo caso el paciente siempre cuenta con la potestad de negarse a participar en posteriores requerimientos.

Extensión y duración de los procedimientos.

Cada participante acudirá una vez por semana al centro aproximadamente 3h por visita, cada 7 días y durante 3 semanas. A principio de la mañana (8 am aproximadamente) del día del experimento

Derecho de los participantes

Derecho a la revocación del consentimiento y sus efectos, incluida la posibilidad de la destrucción o de la anonimización de la muestra y de que tales efectos no se extenderán a los datos resultantes de las investigaciones que ya se hayan llevado a cabo. Se debe especificar el modo en que el participante puede ejercer el derecho de retracto y a quién debe dirigirse para ejercerlo.

Posibilidad de contactar con los investigadores en cualquier momento y, especialmente, en caso de aparición de efecto adverso imprevisto.

Derecho a revocar el consentimiento en cualquier momento, sin que eso afecte de ningún modo a su tratamiento médico.

Derecho a decidir el destino de sus muestras y datos personales en caso de retirarse del estudio (Ver el punto 5.5).

Derecho a que se vuelva a pedir su consentimiento si se desea utilizar la muestra en estudios posteriores.

Seguro u otras medidas que existan para asegurar una compensación adecuada en el caso que el sujeto sufra algún daño por su participación en la investigación.

Garantía de confidencialidad de la información obtenida, indicando la existencia del fichero, la finalidad de la recogida de los datos y destinatarios de la información, del carácter obligatorio o facultativo de las respuestas, de la posibilidad y lugar donde ejercer los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, de la identidad y dirección del responsable del fichero, el modo en que se manejarán las bases de datos y la identidad de las personas que tendrán acceso a los datos de carácter personal del sujeto fuente.

En caso de que la investigación implique análisis genéticos: derecho a conocer para qué sirven las pruebas propuestas. Derecho a conocer (o a no conocer) los resultados genéticos individuales y generales confirmados que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas y las repercusiones clínicas conocidas que ello conlleva. Advertencia sobre la posibilidad de que se obtenga información relativa a su salud, derivada de los análisis genéticos que se realicen sobre su muestra biológica, así como sobre su facultad de tomar

una posición en relación con su comunicación. Advertencia de la implicación de la información que se pudiera obtener para sus familiares y la conveniencia de que él mismo, en su caso, transmita dicha información a aquellos. Compromiso de recibir consejo genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados del análisis. (No procede, este último apartado, ya que no se van a realizar análisis genéticos)

Información sobre los datos / la muestra donada

Almacenamiento de las muestras/datos: disociación, anonimización. Se debe explicar qué se entiende por “anonimización” (proceso por el cual no es posible establecer relación entre un dato o muestra y el sujeto al que se refiere) y “disociación” (dato no asociado a una persona identificada o identificable mediante un código que permite la operación inversa).

Destrucción de la muestra una vez finalizado el proyecto o incorporación a una colección de muestras o a un biobanco, para ulteriores investigaciones, e informar de las implicaciones de su decisión. (Real Decreto 1716/2011). En el caso de que las muestras se guarden en una colección o biobanco, se indicará quién es el responsable, lugar y finalidad del mismo.

En el caso de que las muestras se guarden en una colección o en un biobanco, la persona responsable tendrá a disposición del donante toda la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilice la muestra. Además, el comité de ética externo del biobanco o el Comité de Ética de la Investigación que evaluó el proyecto de investigación decidirán en qué casos será imprescindible que se envíe la información de manera individualizada al donante.

El donante tiene la posibilidad de incluir alguna restricción sobre el uso de sus muestras.

En aquellas investigaciones o estudios en los que se vayan a someter a tratamiento datos de carácter personal los investigadores podrán solicitar, asesoramiento en materia de cumplimiento del marco jurídico de la protección de datos dirigiéndose a la dirección protecciondedatos@um.es.

En consecuencia, le solicitamos que firme y entregue la hoja de consentimiento informado que se adjunta.

Firmado: En nombre del equipo investigador, Asunción M^a Hidalgo Montesinos

Anexo XI. Declaración de consentimiento informado.



ANEXO I

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./Dña, de años de edad, manifiesta que ha sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer mi participación para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado “Desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos”, dirigido por D. Asunción M^a Hidalgo Montesinos (Facultad de Química, con la empresa AMC Innova, la muestra se procesará en el Edificio Vitalis, de la Universidad de Murcia.

El objetivo de este proyecto es llevar a cabo el desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos, por lo que se pretende comparar el impacto de un nuevo proceso tecnológico aplicado a un zumo de frutas, en la respuesta postprandial de la glucosa en sangre en adultos sanos. Además, se pretende comprobar que los productos obtenidos presentan buenas propiedades funcionales.

El proyecto cuenta con el informe favorable de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia, teléfono de contacto: 868887355 y correo electrónico: ahidalgo@um.es, y financiado por CDTI, con el fin de mejorar los resultados clínicos.

He sido informado/a de los posibles perjuicios que la participación en dicho proyecto puede tener sobre mi bienestar y salud al haber leído la hoja de información al participante sobre el estudio citado. (el resto de información se daría en el documento hoja informativa)

He sido también informado/a de que mis datos personales serán sometidos a tratamiento en virtud de su consentimiento con fines de investigación científica por la Universidad de Murcia. El plazo de conservación de los datos será el mínimo indispensable para asegurar la realización del estudio o proyecto. No obstante, mis datos identificativos, para garantizar condiciones óptimas de privacidad, y cuando el procedimiento del estudio lo permita, podrían ser sometidos a anonimización o seudoanonimización. En todo caso, la información identificativa que se pudiese recabar será eliminada cuando no sea necesaria.

He sido informado/a de que para cualquier consulta relativa al tratamiento de sus datos personales en este estudio o para solicitar el acceso, rectificación, supresión, limitación u oposición al tratamiento podré dirigirme a la dirección protecciondedatos@um.es. Asimismo he sido informado/a de mi derecho a presentar un reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos.

He sido también informado que puedo abandonar en cualquier momento mi participación en el estudio sin dar explicaciones y sin que ello me suponga perjuicio alguno.

Se me ha entregado una hoja de información al participante y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado.

Tomando ello en consideración, otorgo mi consentimiento a que esta extracción tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

***Nota: para aquellos casos en los que el sujeto participante sea menor de edad, persona en situación de discapacidad, o persona necesitada de especial protección¹, se hará constar lo siguiente:**

"Hago constar que he explicado las características y el objetivo del estudio, sus riesgos y beneficios potenciales a la persona responsable por la tutela del participante, que dicho participante ha sido informado de acuerdo a sus capacidades y que no hay oposición por su parte. El responsable legal² otorga su consentimiento por medio de su firma fechada en este documento. (El menor, persona en situación de discapacidad o persona necesitada de especial protección firmará su asentimiento cuando por su edad y madurez sea posible).

(Firma del investigador o la persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento informado)

Murcia, a 25 de febrero de 2019.

Fdo. D/Dña

¹ Art. 25 del Código Penal (Ley Orgánica 1/2015)

² En caso de ser menor de edad, deberá acompañarse en todo caso del consentimiento informado expreso de ambos padres. Con carácter general, para el caso de menores, deberá recogerse la firma de ambos padres (o progenitores); en caso de firmar uno solo, indicará expresamente que el otro también ha sido informado y consiente en la participación del menor.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D./Dña, de años de edad, manifiesta que ha sido informado/a sobre los beneficios que podría suponer mi participación para cubrir los objetivos del Proyecto de Investigación titulado “Desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos”, dirigido por D. Asunción M^a Hidalgo Montesinos (Facultad de Química, con la empresa AMC Innova, la muestra se procesará en el Edificio Vitalis, de la Universidad de Murcia).

El objetivo de este proyecto es llevar a cabo el desarrollo de nuevos ingredientes bioactivos a partir de subproductos procedentes del procesado de cítricos, por lo que se pretende comparar el impacto de un nuevo proceso tecnológico aplicado a un zumo de frutas, en la respuesta postprandial de la glucosa en sangre en adultos sanos. Además, se pretende comprobar que los productos obtenidos presentan buenas propiedades funcionales.

El proyecto cuenta con el informe favorable de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia, teléfono de contacto: 868887355 y correo electrónico: ahidalgo@um.es, y financiado por CDTI, con el fin de mejorar los resultados clínicos.

He sido informado/a de los posibles perjuicios que la participación en dicho proyecto puede tener sobre mi bienestar y salud al haber leído la hoja de información al participante sobre el estudio citado. **(el resto de información se daría en el documento hoja informativa)**

He sido también informado/a de que mis datos personales serán sometidos a tratamiento en virtud de su consentimiento con fines de investigación científica por la Universidad de Murcia. El plazo de conservación de los datos será el mínimo indispensable para asegurar la realización del estudio o proyecto. No obstante, mis datos identificativos, para garantizar condiciones óptimas de privacidad, y cuando el procedimiento del estudio lo permita, podrían ser sometidos a anonimización o seudoanonimización. En todo caso, la información identificativa que se pudiese recabar será eliminada cuando no sea necesaria.

He sido informado/a de que para cualquier consulta relativa al tratamiento de sus datos personales en este estudio o para solicitar el acceso, rectificación, supresión, limitación u oposición al tratamiento podré dirigirme a la dirección protecciondedatos@um.es. Asimismo he sido informado/a de mi derecho a presentar una reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos.

He sido también informado que puedo abandonar en cualquier momento mi participación en el estudio sin dar explicaciones y sin que ello me suponga perjuicio alguno.

Se me ha entregado una hoja de información al participante y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado.

Tomando ello en consideración, **otorgo mi consentimiento** a que esta extracción tenga lugar y sea utilizada para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

***Nota: para aquellos casos en los que el sujeto participante sea menor de edad, persona en situación de discapacidad, o persona necesitada de especial protección¹, se hará constar lo siguiente:**

“Hago constar que he explicado las características y el objetivo del estudio, sus riesgos y beneficios potenciales a la persona responsable por la tutela del participante, que dicho participante ha sido informado de acuerdo a sus capacidades y que no hay oposición por su parte. El responsable legal² otorga su consentimiento por medio de su firma fechada en este documento. **(El menor, persona en situación de discapacidad o persona necesitada de especial protección firmará su asentimiento cuando por su edad y madurez sea posible).**

(Firma del investigador o la persona que proporciona la información y la hoja de consentimiento informado)

Murcia, a 25 de febrero de

2019. Fdo. D/Dña

¹ Art. 25 del Código Penal (Ley Orgánica 1/2015)

² En caso de ser menor de edad, deberá acompañarse en todo caso del consentimiento informado expreso de ambos padres. Con carácter general, para el caso de menores, deberá recogerse la firma de ambos padres (o progenitores); en caso de firmar uno solo, indicará expresamente que el otro también ha sido informado y consiente en la participación del menor.

Anexo XII. Póster presentado al II Congreso de Jóvenes Investigadores en Ciencias Agroalimentarias organizado por la Universidad de Almería.



Congreso de
Jóvenes Investigadores
en Ciencias Agroalimentarias



UNIVERSIDAD
DE ALMERIA



DESARROLLO DE NUEVOS INGREDIENTES BIOACTIVOS A PARTIR DE SUBPRODUCTOS PROCEDENTES DEL PROCESADO DE CÍTRICOS

J.A. Macario¹, A.M. Hidalgo², C. Martínez³



¹Fruit Tech Natural, Ctra Madrid-Cartagena, km 390, Espinardo 30100 (Murcia), Spain, joseantonio.macario@um.es;

²Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 (Murcia), Spain.

³Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 (Murcia), Spain.



Introducción

En los últimos 40 años el número de niños y adolescentes de edades comprendidas entre los 5 y los 19 años que presentan obesidad se ha multiplicado por 10 en todo el mundo. En Europa, la prevalencia de la obesidad en los hombres oscila entre el 4,0% y el 28,3% y en las mujeres entre el 6,2% y el 36,5% con una variación geográfica considerable. Las tasas de prevalencia en Europa central, oriental y meridional son más altas que en Europa occidental y septentrional (Berghoefer et al., 2008).

Para observar la importancia del tema objeto de estudio, se ha realizado una búsqueda en la base de datos Web of Science, recogiendo el número de citas bibliográficas durante los últimos 10 años utilizando la combinación de las siguientes palabras clave:

- Glycaemic index
- Postprandial
- Juice
- Citrus

En la Figura 1 se muestra el número de citas bibliográficas con las palabras clave citadas anteriormente durante los años 2008-2018.



Figura 1. Número de citas bibliográficas durante los últimos 10 años.

Como se puede observar, en los últimos años se han incrementado el número de citas bibliográficas, siendo el año 2016 donde más publicaciones hubo. La combinación de palabras clave que más publicaciones ha tenido durante el periodo 2008-2018 es Postprandial and Juice.

Materiales y métodos

Se ha realizado un estudio cruzado doble ciego donde todos los participantes recibieron tres tratamientos (2 zumos A y B, y una bebida control). Los zumos A y B fueron diseñados con una composición diferente en relación a la fuente de hidratos de carbono utilizada, pero en ambos casos la concentración de azúcares fue de 10,4%. Ambos zumos, de igual aspecto, color y sabor, al igual que la bebida control, fueron administrados en una cantidad de 250 ml.

Los participantes en el estudio fueron reclutados durante el mes de marzo (2019) en la Universidad de Murcia. Todos fueron adultos sanos, con edad superior a 18 años e inferior a 60, no diabéticos ni en estado de embarazo, sin enfermedades cardiovasculares, y sin tratamiento con fármacos que pudiesen alterar la glucemia en sangre. Se reclutaron un total de 16 sujetos (5 hombres y 11 mujeres). El estudio fue previamente aprobado por el Comité Ético de Investigación de la Universidad de Murcia (ID: 2340/2019).



Figura 2. Glucómetro Contour® XT

Se ha medido la glucosa en ayunas de cada participante, administrándole la bebida problema y volviendo a tomar la medida a los 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos tras comenzar la ingesta. La toma de muestras se realizó utilizando el método de la hexoquinasa, mediante punción capilar en los dedos de la mano, con lanceta de un solo uso utilizando un Glucómetro Contour® XT. El día del ensayo se pidió a los participantes que guardaran un periodo de ayuno de 10 horas, y que evitaran la realización de ejercicio tanto la noche anterior como la mañana del estudio. La toma de muestras se realizó en la Unidad de Nutrición y Bromatología (Edificio Vitalis) de la Universidad de Murcia.



Figura 3. Tiras reactivas utilizadas.

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado del proyecto de investigación IDI-20171262, financiado por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), Ministerio de Economía, Industria y Competitividad. Siendo beneficiarios: Universidad de Murcia, AMC Innova Juice and Drinks S.L., Zukán S.L. y Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación.

Resultados

El análisis de los resultados se ha realizado utilizando el programa estadístico R. Los iAUCs de ambos zumos se calcularon como el total del área marcada por los incrementos de la glucosa en sangre ignorando el área situada por debajo de la glucosa basal. Se ha realizado el test de Kolmogorov-Smirnov para analizar la normalidad de los datos, realizándose ANOVA o test no paramétricos (Wilcoxon) para contrastar las medias. En concreto, se compararon tanto los Índices Glucémicos (IG) como el iAUC entre los zumos A y B y el control (10,4% de dextrosa).

La Figura 4 muestra una respuesta semejante para ambos zumos, alcanzando el pico máximo de glucosa a los 30 minutos en las tres bebidas analizadas. Este pico máximo es en los zumos significativamente inferior ($p < 0,05$) al obtenido para la bebida control preparada con dextrosa (Control), adquiriendo valores de 122,68 mg/dl para el zumo A, 125,68 mg/dl para el zumo B y 143,47 mg/dl para el control. La línea roja representa el valor de 126 mg/dl de glucosa en sangre, esta concentración es considerada como un límite.

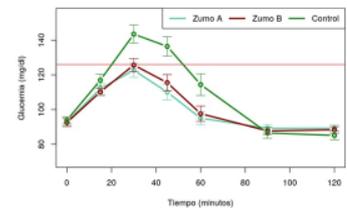


Figura 4. Valores medios de glucosa en sangre representados en función del tiempo para cada una de las bebidas del ensayo.

El Índice glucémico nos indica si los hidratos de carbono llegan lentamente o rápidamente a la sangre (Saltouras et al. 2019). Se considera elevado si es mayor de 70, medio si se sitúa entre 56 y 69 y bajo si es menor de 55. Para establecer estos valores se le asigna a la glucosa un valor de 100.

En la Figura 5 aparecen los datos numéricos obtenidos (Media y error estándar) de las iAUCs de los zumos A y B y del control. No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos de bebida, pero sí fueron significativamente inferiores ($p < 0,05$) de la bebida con la misma concentración de glucosa. Además se ha calculado las áreas restando la glucosa basal de cada participante en todos los puntos de las tres curvas obtenidas. Se ha observado diferencias en este parámetro debidas al sexo, donde encontramos valores superiores marginalmente en las mujeres (1775,0) con respecto a los hombres (1335,5), ($p < 0,05$).

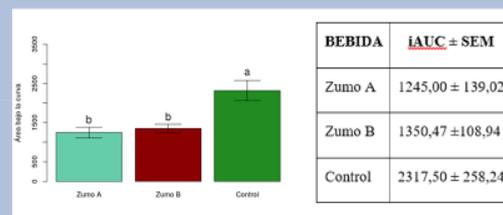


Figura 5. Diagrama de cajas obtenidos con los valores medios de iAUCs. Las barras verticales indican el error estándar, y diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Conclusiones

- ✓ El estudio realizado ha puesto de manifiesto que el Índice glucémico (IG) tomando como base el 100% la bebida control, en la ingesta y comparación de dos preparados A y B, se obtuvieron valores de $62,14 \pm 10,45\%$ para el Zumo A (muestra con alto contenido en fibra) y de $67,36 \pm 9,73\%$ para el zumo B, sin obtenerse diferencias estadísticamente significativas.
- ✓ Los hidratos de carbono de los alimentos con bajo IG se digieren y absorben más despacio y son efectivos para controlar la glucosa postprandial en sangre.
- ✓ El tema objeto de estudio según los datos bibliográficos obtenidos ha generado interés creciente en los últimos años en la comunidad científica.

Referencias

- ✓ Berghoefer, A., Pischon, T., Reinhold, T., Apovian, C. M., Sharma, A. M. & Willich, S. N. 2008. Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *Bmc Public Health*, 8.
- ✓ Saltouras, G., Shaw, P. K., Fraser, A. C., Hawes, C., Smith, H., Handley, L. & Lightowler, H. J. (2019). Glycaemic index, glycaemic load and dietary fibre characteristics of two commercially available fruit smoothies. *International journal of food sciences and nutrition*, 70(1), 116-123.