UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

Facultad de Farmacia
Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología

VALORACIÓN NUTRICIONAL, COMPUESTOS BIOACTIVOS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CÍTRICOS: CLEMENTINAS Y NARANJAS PIGMENTADAS

NUTRITIONAL VALUE, BIOACTIVES COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CITRUS: CLEMENTINES AND RED ORANGES

Memoria presentada por

LAURA CEBADERA MIRANDA

para optar al Grado de Doctor con Mención Europea

Bajo la dirección de las Doctoras

Montaña Cámara Hurtado y Patricia Morales Gómez

Madrid, 2017

ISBN: 978-84-697-2606-8 **© Laura Cebadera Miranda, 2017**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
- -
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
Bromatologia

Mª DOLORES TENORIO SANZ, PROFESORA TITULAR DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA QUE:

El presente trabajo de investigación titulado **"Valoración nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de cítricos: clementinas y naranjas pigmentadas"** se ha realizado en este Departamento bajo la dirección de las Doctoras Montaña Cámara Hurtado y Patricia Morales Gómez, y constituye la Memoria que presenta Laura Cebadera Miranda para optar al Grado de Doctor, con mención europea.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a veintiuno de abril de dos mil diecisiete.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
- -
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II
Bromatologia

DRA. MONTAÑA CÁMARA HURTADO PROFESORA TITULAR Y DRA. PATRICIA MORALES GÓMEZ, PROFESORA AYUDANTE DOCTOR, DEL ÁREA DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA, EN EL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACULTAD DE FARMACIA, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN QUE:

Dña. Laura Cebadera Miranda, ha realizado bajo su dirección y en el Dpto. de Nutrición y Bromatología II, el trabajo de tesis doctoral que lleva por título **"Valoración nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de cítricos: clementinas y naranjas sanguinas"** y que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa para optar al grado de Doctor, con mención europea.

Y para que conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a veintiuno de abril de dos mil diecisiete.

A Alejandro

A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

Si bien esta Tesis Doctoral me ha costado gran esfuerzo y dedicación, me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a mis Directoras de Tesis, las doctoras Montaña Cámara y Patricia Morales, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continua de la misma, y sobre todo por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de todos estos años, y muy especialmente en el último tramo del camino, agradecerles profundamente el empuje recibido en los momentos más difíciles y angustiosos, sencillamente, sin ellas no hubiera sido posible realizar este trabajo.

De manera muy especial quiero dedicarle esta Tesis a mi inseparable compañero de vida, Alejandro Cerro, que con gran ilusión me ha acompañado en este gran viaje y que, a pesar de haberle privado de momentos de disfrute, viajes, tiempo con la familia y amigos…, siempre ha estado a mi lado en todo momento, con su sonrisa y sus palabras de apoyo incondicional para darme la fortaleza necesaria para seguir adelante, especialmente en aquellos momentos más difíciles donde flaquean las fuerzas. A él, quiero agradecerle su amor, su dedicación, su generosidad, su paciencia y su gran confianza depositada en mí para hacerme sentir capaz de conseguir cualquier objetivo. Gracias Amorcito.

Agradecer ahora y siempre a mis Padres, Ruperto y Mª Pilar, los cuales son muy especiales para mí, no sólo por haberme inculcado el amor por los estudios, sino por su gran apoyo, su cariño, su plena confianza en mí de alcanzar lo que me propusiera. A mi Padre, por haber sido además el mejor de los profesores y referente académico que he podido tener, y a mi Madre, por sus dulces palabras de apoyo en todo momento, especialmente en aquellos más complicados, para darme la fuerza necesaria para seguir adelante y no tirar la toalla. En realidad, me faltan las palabras para agradeceros todo lo que habéis hecho por mí…

Quiero dar las gracias a mi hermana Elena, por su apoyo incondicional, por estar ahí siempre que lo he necesitado, no solamente en los años de realización de la Tesis, sino a lo largo de toda mi vida, ella ha sido siempre mi modelo a seguir por su gran capacidad de trabajo, su tesón y esfuerzo y, además, por ser una gran madre y darme esos dos sobrinos preciosos a los que adoro, Alejandro y Claudia. Gracias Elena por hacerme saber que puedo contar contigo siempre.

De la misma manera, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis segundos padres, Agustín y Charo, quienes con su cariño han estado siempre pendientes de mí y de mi Tesis, además de brindarme su apoyo y ánimos para seguir adelante, demostrando siempre la confianza depositada en mí.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas del Departamento de Bromatología, de la Facultad de Farmacia, que me han ayudado y dado tantos ánimos

por los pasillos, especialmente quiero agradecerles a las Dras. Virginia Fernández y Mª Cortes Sánchez – Mata por haberme ayudado siempre que lo he necesitado. También quiero agradecer a las Dras. Esperanza Torija y Mª Cruz Matallana por el gran cariño que me han transmitido y que han hecho que me sintiera como en casa.

No puedo olvidarme de dedicarle unas líneas de agradecimiento a la Directora del Departamento, Dra. Mª Dolores Tenorio, por sus palabras de ánimo y apoyo constantes, además de la confianza depositada en mí.

Quiero agradecer a todos los compañeros del Departamento que han coincidido conmigo en el laboratorio durante la realización de la Tesis, tanto los "fijos" como los que pasan de estancia, porque de todos ellos he aprendido, Rebeca, Víctor, José Ignacio, Noureddinne, Daniela, Erika, Erlana, Fátima, Laura, María,….

Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a la Profesora Isabel C.F.R. Ferreira por haberme brindado la oportunidad de realizar una estancia predoctoral tan provechosa en el Instituto Politécnico de Bragança, y muy especialmente a la Dra. Lillian Barros por haber sido mi tutora de estancia, y haber pasado tantas horas a mi lado enseñándome la metodología y el buen hacer en el laboratorio. De la misma manera, agradezco a todos los compañeros de laboratorio que me prestaron su ayuda, los cuales me acogieron con generosidad y alegría, tanta, como para hacerme sentir como en casa. Quiero agradecer muy especialmente a Marcio e Inês por haberme ayudado tanto, en mi llegada a Bragança y durante los meses que estuve de estancia.

Quiero agradecer al Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia, por haberme prestado su ayuda, y muy especialmente a la Dra. Marta Igual.

Por supuesto quiero agradecer de corazón a todos mis amigos porque son indispensables en mi vida. A mis amigos de Talavera, Manolo, Yoli, Raúl, David, Raquel,… por haber compartido conmigo tantos momentos inolvidables durante toda una vida... A mis amigas de la "facul", Mon, Bárbara, Erikota y Mer por confiar en mí y prestarme su apoyo en todo momento con sus palabras de ánimo, y sobretodo por haber compartido tantos momentos de risas.

Sinceramente, Gracias a todos de corazón.

ÍNDICE

I. RESUMEN/ABSTRACT 1

1. INTRODUCCIÓN 13
   1.1. Origen y clasificación de cítricos 15
   1.2. Proceso de maduración en cítricos 23
   1.3. Producción, exportación y consumo de cítricos 27
   1.4. Importancia de los cítricos en la alimentación 39
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO 75
   2.1. Objetivos 77
   2.2. Plan de Trabajo 79
3. ESTUDIO DE CLEMENTINAS 81
   3.1. Objetivos específicos 83
   3.2. Materiales 85
   3.3. Metodología analítica 89
      3.3.1. Parámetros Físico-Químicos 89
      3.3.2. Caracterización nutricional 90
      3.3.3. Vitamina C y ácidos orgánicos 97
      3.3.4. Compuestos fenólicos 99
      3.3.5. Vitamina E. Tocoferoles 100
      3.3.6. Actividad antioxidante in vitro 102
      3.3.7. Análisis Estadístico 108
   3.4. Estudio de la influencia del estado de maduración 111
   3.5. Estudio comparativo en estado de maduración organoléptico 163
   3.6. Conclusiones Parciales / Partial Conclusions 195
4. ESTUDIO DE NARANJAS PIGMENTADAS 201
   4.1. Objetivos específicos 203
   4.2. Materiales 205
   4.3. Metodología analítica 209
      4.3.1. Pigmentos carotenoides: β-caroteno y licopeno 209
      4.3.2. Compuestos fenólicos: Flavonoides 210

4.3.3. Compuestos fenólicos: Antocianinas 212
4.3.4. Color 213
4.5. Caracterización de naranjas pigmentadas 215
4.6. Conclusiones parciales / Patial Conclusions 247
5. CONCLUSIONES / CONCLUSSIONS 251
6. BIBLIOGRAFÍA 257
7. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL 289

RESUMEN

Título

"Valoración nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de cítricos: Clementinas y Naranjas Pigmentadas"

Introducción

Desde la antigüedad, los cítricos han constituido un cultivo de gran importancia, tanto a nivel comercial por su gran producción, como por los beneficios para la salud humana derivados de su consumo, debido al aporte en nutrientes y compuestos bioactivos.

El origen de los cítricos se centra en las regiones subtropicales y tropicales de Asia desde donde, paulatinamente, se ha ido introduciendo en todas las regiones del mundo que presenten un clima cálido. En la actualidad, España es uno de los principales países productores de cítricos, ocupando la sexta posición en producción a nivel mundial, siendo el principal país productor de Europa.

Desde el punto de vista filogenético, los cítricos pertenecen a la clase *Angiospermae*, subclase dicotiledónea, orden *Rutae*, familia *Rutaceae* y género *Citrus*. Éste género cuenta con más de 145 especies botánicas, entre las que destacan: la naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), mandarina (*Citrus Reticulata* Blanco), limón (*Citrus limón* L. Burn. f.) y pomelo (*Citrus paradisi* Macfadyen), que son las principales especies cultivadas en la actualidad a nivel mundial. Las clementinas son el resultado de la hibridación entre naranja dulce y mandarina. Las naranjas pigmentadas, también denominadas naranjas sanguinas, se consideran el resultado de una mutación genética espontánea ocurrida hace muchos siglos en plantas nativas de China desde donde se extendieron por el Mediterráneo e incorporaron su característico color rojizo.

Objetivo y Plan de Trabajo

Cada día se hace más evidente la preocupación del consumidor por la alimentación, incorporando a su dieta más cantidad de alimentos frescos que además de su aporte nutricional, sean ricos en compuestos bioactivos actuando como agentes promotores para la

salud, por sus efectos fisiológicos beneficiosos. En este sentido el principal objetivo de la presente tesis doctoral ha sido:

Evaluar la calidad nutricional y funcional de distintas frutas cítricas como son las clementinas y las naranjas pigmentadas, mediante el estudio de su contenido en nutrientes y compuestos bioactivos, así como la evaluación de su actividad biológica antioxidante.

Para dar cumplimiento a este objetivo principal se han desarrollado dos estudios centrados en las frutas cítricas objeto de esta memoria. El primer estudio se ha centrado en el análisis de tres variedades de **clementinas** (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) extra-precoces: **Basol, Clemenrubí y Clemensoon**, todas ellas procedentes de la Comunidad Valenciana y recolectadas en dos estados de maduración diferentes, estado de maduración intermedio (E1) y estado de maduración organoléptico (E2) correspondientes a las campañas de otoño de tres años consecutivos 2011, 2012 y 2013. Un segundo estudio se centró en el análisis de dos variedades (y cuatro tipos) de naranja pigmentada: **Sanguinelli** (*Citrus sinensis* L. cv Sanguinelli) **y Tarocco** (*Citrus sinensis* L. cv Tarocco) **(Tarocco Rosso, Tarocco T. 70 y Tarocco T. 100)**, las cuales fueron recolectadas en tres momentos a lo largo de la campaña de invierno-primavera de 2015.

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos se realizó una selección adecuada de los métodos analíticos para la determinación del valor nutricional, evaluación del contenido en compuestos bioactivos (compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y vitamina C) así como la evaluación de la capacidad antioxidante, utilizando en todos los casos los métodos oficiales disponibles, o aquellos validados según la bibliografía científica disponible.

Resultados y Discusión

Los resultados correspondientes a la **composición centesimal** de las variedades de clementina (Basol, Clemenrubí, y Clemensoon), mostraron que el contenido acuoso es el componente mayoritario estando próximo al 85 %. En cuanto a los macronutrientes, los azúcares solubles cuantificados fueron fructosa, glucosa y sacarosa, con valores de azúcares totales comprendidos entre 8,49 y 13,99 g/100 g de porción comestible, siendo la sacarosa el azúcar mayoritario, representando hasta un 46 % del total de los azúcares solubles, y siendo en todos los casos la relación glucosa/fructosa próxima a 1. En este sentido, destacó

la variedad Clemensoon por presentar un contenido de sacarosa significativamente más elevado que el resto de clementinas estudiadas.

La siguiente fracción mayoritaria correspondiente a la composición de las muestras objeto de estudio fue la fibra, con un rango de variación de 1,04 – 3,65 g/100g de porción comestible, con unas proporciones de fibra soluble e insoluble próximas a 1. Según los resultados obtenidos y de acuerdo con los valores dietéticos de referencia (VDR) establecidos por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) podemos decir que el consumo de tres piezas diarias de clementinas (alrededor de 250 g) cubriría más del 20 % de dichos VDR establecidos en 25 gramos.

El contenido de proteínas, fue similar en todas las clementinas estudiadas oscilando entre 1,19 y 2,07 g/100g de porción comestible. Por su parte, el contenido de cenizas osciló entre 0,25 y 0,42 g/100g, destacando el potasio como macroelemento mayoritario (63,59 – 114,20 mg/100g de porción comestible) representando hasta un 38 % de total del contenido mineral, y el hierro como microelemento (0,18 – 0,49 mg/100g de porción comestible), destacando la variedad Basol por presentar un contenido significativamente más alto para este mineral.

Por último, la fracción minoritaria caracterizada en estas frutas fue la grasa (0,04 – 0,10 mg/100g de porción comestible), siendo los ácidos grasos mayoritarios el ácido palmítico (AP, C16:0) seguido del α – linolénico (ALA, C18:3n3) y ácido linoleico (AL, C18:2n6).

En cuanto al contenido en **compuestos bioactivos** presentes en las clementinas, cabe destacar el elevado contenido de vitamina C en forma de ácido ascórbico (62,74 – 132,04 mg/100g de porción comestible). Según el Reglamento 1169/2011 sobre la información facilitada al consumidor, en el caso de las variedades Basol y Clemenrubí con una sola pieza de estas frutas (85 gramos) se cubriría el 100 % del Valor de Referencia de Nutriente (VRNs) establecido en 80 mg/100 g de porción comestible, pudiéndose promocionar estas frutas como **fuente natural de vitamina C**, al superar el 15 % establecido.

También se identificaron y cuantificaron otros ácidos orgánicos en todas las clementinas: ácido oxálico, quínico, málico, isocítrico, cítrico y fumárico, siendo el ácido cítrico el ácido orgánico mayoritario, llegando a representar hasta un 79 % del total de ácidos orgánicos cuantificados tal y como ocurrió en las variedades Basol y Clemensoon.

Por otra parte, se identificaron diecisiete compuestos fenólicos diferentes, entre flavonoides y no flavonoides (ácidos fenólicos). Dentro de la familia de los flavonoides, la mayoría de ellos *C* y *O*-glucósidos, el grupo principal fue las flavanonas (narirutina/naringina y (neo) hesperidina), seguido de las flavonas, polimetoxiflavonas y flavonoles como la quercetina. Así mismo, dentro de los ácidos fenólicos, destacaron los ácidos hidroxicinámicos (sinapoil - glucósido, ácido feruloil - glucárico y cafeloil - glucósido) seguidos de los ácidos hidroxibenzoicos.

Respecto a la vitamina E se identificaron las cuatro isoformas de tocoferol (α, β, γ, y δ – tocoferol) en todas las clementinas estudiadas, siendo el α-tocoferol la isoforma mayoritaria (0,103 – 0,302 mg/100g de porción comestible), representando más del 90 % del total.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos anteriormente, se podría decir que las clementinas son unas frutas muy interesantes por su bajo **valor energético** (entre 46,86 – 67,36 kcal/100g de porción comestible) y elevado contenido en compuestos bioactivos.

En cuanto a la **actividad antioxidante** medida en las clementinas objeto de estudio, destacó la variedad Basol por presentar mayor actividad antioxidante medida mediante el ensayo del poder reductor frente al estrés oxidativo, mostrando los valores de EC_{50} más bajos (1,32 – 2,46 mg/mL) así como mediante el ensayo de inhibición de la decoloración del β-caroteno (inhibición de la peroxidación lipídica; 0,21 – 0,82 mg/mL), mientras que Clemensoon presentó mayor actividad antioxidante medida a través del ensayo del DPPH frente al proceso de oxidación (3,36 – 10,98 mg/mL).

Los resultados obtenidos mediante el estudio de correlaciones, mostraron que la actividad antioxidante de las clementinas, medida mediante el ensayo del DPPH y de la inhibición de la decoloración del β – caroteno, fue debida a la presencia de los siguientes compuestos bioactivos: la vitamina C y compuestos fenólicos, tanto flavonoides como ácidos fenólicos. Ambos métodos están fuertemente correlacionados entre sí, por lo que se concluye que dichos métodos son una buena elección a la hora de medir la capacidad antioxidante en estas frutas.

Los resultados correspondientes al estudio de la **influencia de la maduración** en la composición de las clementinas que se ha llevado a cabo, a través de la comparación de dos estados de madurez diferentes (E1 y E2), muestran variaciones significativas en los

siguientes parámetros: disminución de la vitamina C (ácido ascórbico) y del contenido de ácido cítrico acompañado de un aumento de los azúcares solubles, debido sobre todo a la acumulación de sacarosa, por otra parte, se encontraron variaciones significativas en los contenidos de compuestos fenólicos en general.

En relación a la caracterización de **naranjas pigmentadas** (*Citrus sinensis* L. cv. Sanguinelli; *Citrus sinensis* L. cv. Tarocco), todas ellas **(Tarocco Rosso, Tarocco T. 70 y Tarocco T. 100)** mostraron un contenido elevado de humedad, destacando el Tarocco T. 100 por presentar contenidos próximos al 90%. En cuanto al contenido de sólidos solubles, todas las muestras estudiadas, a excepción de T.100, mostraron valores similares de ºBrix (12,57 – 15,30) destacando Tarocco T. 70 por presentar el índice de maduración más elevado (17,01 – 20,44) debido principalmente a su baja acidez (11,18 – 13,01 mL NaOH 0,1 N) y elevado pH (3,05 – 3,76).

Las naranjas pigmentadas Sanguinelli y Tarocco Rosso destacaron por presentar los contenidos más altos de vitamina C (ácido ascórbico; 66,70 mg/100g y 66,42 mg/100g, respectivamente). De acuerdo con el Reglamento (UE) 1169/2011 de información al consumidor en relación al etiquetado de los alimentos, el cual indica un valor de referencia de nutriente (VRN) de 80 mg/día, podemos afirmar que el consumo de una sola pieza de estas naranjas pigmentadas (150 gramos) cubriría el 100% de dichas recomendaciones, pudiendo en todos los casos promocionarse estas naranjas como **fuente natural de vitamina C**, al cubrir más del 15% de dichas recomendaciones.

En relación al contenido de ácidos orgánicos, se identificaron los ácidos oxálico, tartárico, málico, cítrico y fumárico. Todas las naranjas pigmentadas destacaron por su elevado contenido en ácido cítrico, siendo éste el ácido orgánico mayoritario, con valores entre 864,99 a 1.622,70 mg/100g, en T. 70 y Sanguinelli, respectivamente, considerándose el compuesto responsable de la acidez de estas frutas.

Respecto al análisis de carotenoides, se identificó β – caroteno en todas las naranjas pigmentadas, y su contenido osciló entre 0,25 y 0,59 mg/100g de porción comestible, destacando T. 70 por presentar el contenido más elevado en este compuesto. De la misma forma, Tarocco T. 70 fue la variedad que presentó mayor contenido de flavonoides totales (200 – 275 mg/100g de porción comestible), siendo la hesperidina el flavonoide mayoritario

en las naranjas estudiadas (78 a 143 mg/100g de porción comestible), destacando la variedad Sanguinelli por presentar el mayor contenido de este flavonoide (92,9 a 143 mg/100g), seguida de la narirutina (37,0 – 93,0 mg/100g de porción comestible).

Por otra parte, se identificaron un total de diez antocianinas en todas las naranjas pigmentadas, siete derivados de cianidina y tres derivados de delfinidinas, siendo las más abundantes cianidina 3 - (6''-malonil) glucósido), y cianidina 3 - glucósido. Destacan Sanguinelli, T. Rosso y T. 70 por mostrar los valores más altos de antocianinas totales, mostrando todas ellas valores comprendidos en un rango de 6,56 – 25,49 mg/100g de porción comestible.

Los resultados de estudio de color realizado sobre las naranjas pigmentadas mostraron que Sanguinelli y T. 70 fueron las variedades que presentaron una coloración más rojiza en su pulpa (mayor a* y menor b*), con los colores más vivos (mayor C*). Mientras que los taroccos T. Rosso y T. 100 fueron las que presentaron una coloración más amarillo anaranjada (mayor b* y menor a*), con una mayor luminosidad (L*). Dicho estudio evidenció que no existe una relación entre la coloración externa e interna de estas naranjas, pudiendo encontrar naranjas con una coloración más rojiza en su piel, y sin embargo una pulpa más amarillo-anaranjado, como ocurre en el caso de T. Rosso.

Además, este estudió puso de manifiesto que los principales responsables del color de estas frutas fueron los pigmentos β – caroteno y antocianinas, los cuales estuvieron fuertemente correlacionados con los parámetros CIELAB.

Como **conclusión**, podemos decir que los cítricos estudiados, clementinas y naranjas pigmentadas, son buena fuente de compuestos bioactivos de características antioxidantes, fibra tanto soluble como insoluble, vitamina C (principalmente en forma de ácido ascórbico), ácido cítrico, vitamina E en la isoforma α − tocoferol, compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos), β – caroteno y antocianinas, junto con un bajo valor calórico (principalmente debido a su escaso contenido en lípidos). Por todo ello, consideramos que su consumo debe ser promovido dentro de unos hábitos dietéticos adecuados.

ABSTRACT

Title

"Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant activity of citrus: Clementines and Red Oranges"

Introduction

Since antiquity, citrus have been an important crop, both commercially for its great production, such as for human health due to the contribution in nutrients and bioactive compounds.

Citrus fruit originally come from subtropical and tropical regions of Asia, from where they were introduced into all warm climate regions all around the the world. Nowadays, Spain is one of the main producer countries of citrus fruit, in sixth place worldwide, and the main producer country in Europe.

From the phylogenetic point of view, citrus fruit belong to the class *Angiospermae*, subclass dicotyledoneae, order *Rutae* [*Sapindales or Rutales*], family *Rutaceae* and genus *Citrus*. This genus has more than 145 botanical species, including sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), mandarin (*Citrus Reticulata* Blanco), lemon (*Citrus limon* L. Burn. f.) and grapefruit (*Citrus paradisi* Macfadyen), which are the main species currently grown in the world. Clementines are a sweet orange and a mandarin orange hybrid. Red oranges, also called *blood oranges*, are considered as the result of a spontaneous genetic mutation that occurred in native Chinese plants many centuries ago, from where they spread through the Mediterranean and incorporated their characteristic reddish colour.

Objective and Working Plan

Consumer concerns regarding food quality is increasing thus the intake of fresh food rich in nutriets and bioactive compounds as health promoter agents, is been promoted. In this regard, the main objective of this doctoral thesis was:

To evaluate the nutritional and functional quality of different citrus fruit such as clementines and red oranges, by studying their nutrient and bioactive compounds content, as well as evaluating its biological antioxidant activity.

To meet this main objective, two studies have been performedfocusing on the citrus fruits object of this report. The first study was focused on the analysis of three different extra-early season **clementines** varieties (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.): **Basol, Clemenrubí and Clemensoon**, all of them from the Valencian region and harvested in two different ripening degrees, intermediate ripening (E1) and organoleptic ripening (E2), grown in three consecutive years 2011, 2012 and 2013. A second study was focused on the analysis of two red orange varieties (and four types): **Sanguinelli** (*Citrus sinensis* L. cv Sanguinelli) **and Tarocco** (*Citrus sinensis* L. cv Tarocco) **(Tarocco Rosso, Tarocco T. 70 and Tarocco T. 100)**, harvested at three times during the 2015 winter-spring season.

To fulfil the proposed objectives, an appropriate selection of the analytical methods for determining nutritional value, evaluating the bioactive compound content (phenolic compounds, organic acids and vitamin C), as well as the antioxidant capacity were carried out, was made using in all cases the officially available methods, or those validated by the available scientific literature.

Results and Discussion

The **proximate composition** results of the clementine varieties studied (Basol, Clemenrubí, and Clemensoon), showed a water content close to 85 %, as major component. Regarding macronutrients, the quantified soluble sugars were fructose, glucose and sucrose, with total sugar values between 8.49 and 13.99 g/100 g of edible portion, being sucrose the predominant sugar, representing 46 % of total soluble sugars, and in all cases the glucose/fructose ratio was close to 1. In this respect, the variety Clemensoon stood out by having a significantly higher sucrose content.

The next largest fraction was dietary fibre, with a range of variation from 1.04 - 3.65 g/100g of edible portion, and with the ratio of soluble to insoluble fibre close to 1. Based on our results and in accordance with Dietary Reference Value (DRVs) established by the European Food Safety Agency (EFSA) we could claim that the consumption of three clementines pieces per day (around 250 g) could cover over 20 % of these DRVs set at 25 grams.

The protein content was similar in all the studied clementines, varying between 1.19 and 2.07 g/100g of edible portion. The ash content varied between 0.25 and 0.42 g/100g, with potassium being the predominant macroelement (63.59 - 114.20 mg/100g of edible portion), representing up to 38 % of the total mineral content. Iron was the main microelement (0.18 - 0.49 mg/100g of edible portion), being Basol the variety with the significantly higher content of this mineral.

Finally, the minority fraction in these fruits was fat (0.04 - 0.10 mg/100 of edible portion), being palmitic acid (PA, C16:0) followed by α –linolenic acid (ALA, C18:3n3) and linoleic acid (LA, C18:2n6) the predominant fatty acids.

Regarding the **bioactive compounds** content present in these clementines, there was a high vitamin C content in the form of ascorbic acid (62.74 - 132.04 mg/100g of edible portion). In accordance with Regulation 1169/2011, in the case of the Basol and Clemenrubí varieties, a single piece of these fruit (85 grams) could cover the 100 % of the Nutrient Reference Value (NRVs), set at 90 mg/100g of edible portion, being able to promote these fruits as a **natural source of vitamin C**, exceeding the established 15 %.

Other organic acids characterized in all the clementine varieties was: oxalic acid, quinic acid, malic acid, isocitric acid, citric acid and fumaric acid, being citric acid the main organic acid, representing up to 79 % of the total quantified organic acids in the varieties Basol and Clemensoon.

Seventeen different phenolic compounds were identified, including flavonoids and non-flavonoids compounds (phenolic acids). In the flavonoid family, much of them was *C* and *O*-glucosides, the main group was flavanones (narirutin/naringin and (neo) hesperidin), followed by the flavones, polymethoxyflavones and flavonols such as quercetin. Phenolic acids identify were mainly the hydroxycinnamic acids (sinapoyl-glucoside, feruloyl-glucaric acid and caffeoyl-glucoside) followed by the hydroxybenzoic acids.

Regarding vitamin E, four isoforms of tocopherol (α, β, γ, and δ-tocopherol) were identified in all the clementines studied, with α–tocopherol as the main one (0.103 - 0.302 mg/100g of edible portion), representing over 90 % of the total content.

Considering all the obtained results, clementines could be consider as a very interesting fruit due to their low **energy value contribution** (between 46.86 - 67.36 kcal/100 edible portion) and high bioactive compound content.

With respect to the **antioxidant activity,** Basol clementine showed higher antioxidant activity, measured by the reducing power assay (oxidative stress), with the lowest EC_{50} values (1.32 - 2.46 mg/mL), as well as by the β-carotene assay bleaching inhibition (lipid peroxidation inhibition; 0.21 - 0.82 mg/mL). While Clemensoon showed higher antioxidant activity, measured by the DPPH assay (3,36 - 10,98 mg/mL).

The correlation study showed that the antioxidant activity of clementines varieties, measured by the DPPH assay and β-carotene bleaching inhibition was due to the presence of the following bioactive compounds: vitamin C and phenolic compounds, both flavonoids and phenolic acids. Both methods were strongly inter-correlated, thus these assays are a good choice for measuring the antioxidant capacity in these fruits.

The study of the **influence of ripening** process on clementines composition was performed by comparing two different maturity degrees (E1 and E2). Significant changes were found in the following parameters: reduction on vitamin C (ascorbic acid) and citric acid content accompanied by an increase of soluble sugars, mainly due to the sucrose accumulation. In general, significant changes were found in the phenolic compound content.

In relation to the **red oranges** characterisation (*Citrus sinensis* L. cv. Sanguinelli; *Citrus sinensis* L. cv. Tarocco), all of them **(Tarocco Rosso, Tarocco T. 70 and Tarocco T. 100)** showed a moisture increase, particularly in the case of Tarocco T. 100 which had water content close to 90 %. In terms of the soluble sugar content, all the samples studied, except for T.100, showed similar values (12.57 – 15.30); Tarocco T. 70 highlight having the highest maturation index (17.01 – 20.44), mainly due to its low acidity (11.18 – 13.01 mL NaOH 0.1 N) and high pH (3.05 – 3.76).

The red oranges Sanguinelli and Tarocco Rosso have the highest vitamin C content (ascorbic acid; 66.70 mg/100g and 66.42 mg/100g, respectively). In accordance with Regulation (EU) 1169/2011, , which gives a Vitamin C nutrient reference value (NRV) of 80 mg/day, we can claim that consumption of single piece of these pigmented oranges (150 grams) could cover

the 100 % of these recommendations and in all cases these oranges could be claimed as a **natural source of vitamin C**, covering more than 15 % of these recommendations.

In relation to the organic acid content, oxalic acid, tartaric acid, malic acid, citric acid and fumaric acid were characterized. All the red oranges had a high citric acid content, being the predominant organic acid, with values between 864.99 and 1,622.70 mg/100g, in T. 70 and Sanguinelli, respectively; being this compound the responsible for these fruits acidity.

Regarding carotenoid analysis, β - carotene was identified in all the red oranges and its content varied between 0.25 and 0.59 mg/100g of edible portion, being T. 70 the variety with the highest content. In the same way, Tarocco T. 70 was the variety with the highest total flavonoid content (200 - 275 mg/100g of edible portion), being hesperidin the predominant flavonoid (78 to 143 mg/100g of edible portion), and being Sanguinelli variety the one with the highest content (92.9 to 143 mg/100g). The followed predominant flavonoid was narirutin (37.0 - 93.0 mg/100g of edible portion).

Ten different anthocyanins were identified in all the red oranges, seven of them was cyanidin derivatives and three delphinidin derivatives, the most abundant was cyanidin 3-(6"-malonylglucoside) and cyanidin 3-glucoside. Sanguinelli, T. Rosso and T. 70 had the highest values of total anthocyanins, all of them with values that range between 6.56 - 25.49 mg/100g of edible portion.

The colour study results on the red oranges showed that Sanguinelli and T. 70 were the varieties with the highest reddish colouration in their pulp (higher a* and lower b*), with the brightest colours (higher C*). While the Taroccos T. Rosso and T. 100 were those with more yellow-orange colouration (higher b* and lower a*), with high luminosity (L*). This study demonstrated that there is no correlation between external and internal colouration in these oranges; as oranges, could show a high reddish colour in their skin whereas their pulp present a yellow-orange colour, as in the case of T. Rosso.

This study also demonstrated that the main reason for the colour of these fruit was the β-carotene and anthocyanin pigments, which were strongly correlated with the CIELAB parameters.

We can conclude that the studied citrus fruits, clementines and red oranges, are a good source of bioactive compounds with antioxidant properties, both soluble and insoluble fibre, vitamin C (mainly in the form of ascorbic acid), citric acid, vitamin E mainly in the α−tocopherol isoform, phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids), β-carotene and anthocyanins, together with a low energy value (mainly due to the low lipid content). Therefore, their consumption should be promoted as part of the healthy dietary habits.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen y clasificación de los cítricos

La palabra cítrico deriva del latín *citrus*, los cítricos son frutos cuyo origen se remonta al menos al año 2200 a.C., fecha en la que se presentaron mandarinas y toronjas (fruta similar al pomelo) como tributos a la corte imperial de Ta Yu, en China. Se han formulado diferentes hipótesis respecto al origen geográfico de los cítricos, y casi todas ellas apuntan a regiones tropicales y subtropicales del Sureste Asiático y posterior dispersión por los otros continentes (Webber, 1967; Calabrese, 1994).

La cita más antigua que se conoce de los cítricos, procede de China y pertenece al *Libro de la Historia* (500 años a.C.), en este libro se explica cómo el emperador Ta Yu (siglo XXIII a.C.) incluyó entre sus impuestos la entrega de dos variedades de cítricos, diferenciándolos por su tamaño, grande y pequeño. Mientras que, en España, la cita más antigua que se conoce en relación a los cítricos se debe a Isidoro de Sevilla (562 − 636 d.C.), quien en sus etimologías menciona el "cidro" haciendo referencia a los poemas de Virgilio (Agustí, 2003). El origen del cultivo de los cítricos en España es incierto, aunque se cree que originalmente pudo iniciarse como plantas para usos medicinales y ornamentales, y con menor preponderancia para consumo humano. El cidro se estima que puede estar presente desde el siglo VII d.C., mientras que el naranjo amargo y el limonero fueron introducidos en nuestro país por los árabes en el siglo XI d.C. El cultivo y la expansión del naranjo dulce es posterior y data desde el siglo XV d.C., seguido con posterioridad por el mandarino y el pomelo (Agustí, 2003).

Los cítricos y géneros afines pertenecen al **orden Geraniales, suborden Geraninas y familia Rutáceas**. La familia de las Rutaceas comprende seis subfamilias, siendo la **subfamilia de las Aurantioideas** la que contiene a los cítricos y géneros afines.

Las especies de cítricos han estado siempre, y continuarán estando, sometidas a una evolución natural y dirigida por la mano del hombre, por lo que su clasificación es una labor que nunca finalizará ni estará exenta de controversia, durante mucho tiempo no se supo cuántas especies y variedades de cítricos existían. Cuando se comparan variedades cultivadas en diferentes regiones geográficas lejanas entre sí, es difícil separar los efectos de las condiciones locales de las diferencias varietales, lo que contribuye aún más a la confusión existente.

El concepto biológico de especie resulta muchas veces poco preciso, siendo la definición más aceptada la de conjunto de individuos capaces de cruzarse entre sí pero que están aislados reproductivamente de otros (Dobzhansky, 1937; Mayr, 1946-1991, Haro, 1999). Sin embargo, esta definición tiene limitaciones y no sirve para los miembros del género *Citrus* debido a que entre ellos se cruzan fácilmente, produciendo descendencia fértil, y es frecuente la apomixis (reproducción sexual por medio de semillas).

Si a esto se añade la elevada frecuencia de mutaciones y la extensa historia de cultivo de los cítricos, factores que contribuyen a hacer más difícil el establecimiento de las relaciones taxonómicas, la consecuencia es una falta de consenso que ha dado lugar a varias *clasificaciones taxonómicas*.

El género *Citrus* fue instaurado por Lineo en 1737 en la primera edición del Genera Plantarum. En 1753, en su obra *Species Plantarum,* Lineo asignó las dos primeras especies al género Citrus*: C. medica*, que englobaba a los cidros y los limoneros (*C. medica var. limon*) y *C. aurantium*, que abarcaba naranjos amargos y dulces (*C. aurantium var. sinensis*) y zamboas (*C. aurantium var. grandis*), denominado en la literatura inglesa como "pummelo" o "shadock". La dificultad de la organización taxonómica del género *Citrus* ha dado lugar a que las especies hayan ido cambiando a lo largo del tiempo. Osbeck, en 1757, nombra a la zamboa como *C. grandis* y en 1765 separa al naranjo dulce (*C. sinensis*) como especie independiente del naranjo amargo. El limonero fue elevado a categoría de especie independiente por Burmann (1768), pero no será hasta la publicación de *Histoire Naturelledes Orangers de Risso y Poiteau* (1822) cuando se denominan cada una de las especies cultivadas. Este nombre consistía en una expresión latina de entre 3 y 10 (o a veces más) palabras y puso de manifiesto la dificultad de organizar taxonómicamente el género *Citrus* (Zaragoza, 2007).

En 1861, Oliver asumió que el género *Citrus* lo formaban cinco especies y en 1875, Hooker, en su Flora of British India, reconoció solamente cuatro. Mientras que, en 1896, Engler, especializado durante muchos años en Rutaceas, reconoció seis especies dentro del género *Citrus* en el mundo. Treinta y cinco años más tarde, el propio Engler en la segunda edición de *Die Naturlichen Pflanzenfamilien*, hace una revisión de su anterior clasificación, e incluye once especies en el género *Citrus* y seis o siete en los dos géneros *Poncirus* y *Microcitrus*, que con posterioridad (1986), tres de estas especies las situaría en *Citrus* (Zaragoza, 2007).

Swingle (1946) dividió el género *Citrus* en dos subgéneros, *Papeda* y *Eucitrus*, que presentan notables diferencias anatómicas, pero principalmente se distinguen en la comestibilidad de sus frutos. Los del subgénero *Papeda* contienen agregados de aceites esenciales, que proporciona al jugo un sabor acre y amargo muy desagradable que los hace incomestibles, mientras que los del subgénero *Eucitrus* contienen en las vesículas de la pulpa un jugo más o menos agradable, exento de aceites esenciales y de sabor ligeramente amargo, dulce o ácido.

El subgénero *Papeda* comprende seis especies: *C. ichangensis* Swing. (papeda de Ichang), *C. latipes* (Swing.) Tan. (papeda de Kashi), *C. hystrix* D. C. (papeda de Mauricio), *C. micrantha* Wester (papeda de flor pequeña), *C. celebica* Koord. (papeda de Célebes) y *C. macroptera* Montr. (papeda de Melanesia) (Federici *et al*., 1998).

En el subgénero *Eucitrus*, que engloba diez especies, se encuentran las ocho más importantes desde el punto de vista comercial: *C. medica* L. (cidros), *C. aurantium* L. (naranjos amargos), *C. limon* (L.) Burn. f. (limoneros), *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. (limeros), *C. grandis* (L.) Osb. (zamboa), *C. sinensis* (L.) Osb. (naranjos dulces), C. *reticulata* Blanco (mandarinos) y *C. paradisi* Macf. (pomelos); las dos especies restantes *C. indica* Tan. y *C. tachibana* (Mak.) Tan., son especies silvestres de la India y de Japón respectivamente, con poco interés comercial (Federici *et al*., 1998).

Mientras que, Tanaka (1977) divide el género *Citrus* en dos subgéneros, *Archicitrus* y *Metacitrus*, ocho secciones, quince subsecciones y ciento sesenta y dos especies. No obstante, comparando las especies consideradas por Tanaka con las ocho más importantes comercialmente citadas por Swingle, las principales diferencias se encuentran en las limas y los mandarinos. Tanaka subdivide las limas y reconoce tres especies: además de *C. aurantifolia* (Christm.) Swing. a la que nombra como lima Mejicana, Galago, Key o West Indian, considera también *C. latifolia* Tan. (lima Bearss, Tahití o Persa) y *C. limettioides* Tan. (lima Dulce de Palestina). Respecto a los mandarinos las discrepancias son mayores ya que establece varias especies. Swingle agrupa a todos los mandarinos como *C. reticulata* Blanco, mientras que Tanaka añade además *C. deliciosa* Ten. (mandarinos comunes), *C. unshiu* Marc. (satsumas), *C. clementina* Hort. ex Tan. (clementinas), *C. tangerina* Hort. ex Tan. (mandarino Dancy), *C. nobilis* Lour. (mandarino King) y otras de menor importancia (Swingle y Reece, 1967).

En la actualidad se aceptan las clasificaciones de Swingle y Tanaka. La taxonomía de Tanaka es probablemente muy útil para los especialistas en fruticultura, pero se considera demasiado compleja para el ámbito de aplicación industrial, especialmente en el de las industrias de transformación (Kimball, 1999) por ello, la clasificación más aceptada por la industria citrícola es la de Swingle.

La **Figura 1.1** contiene una descripción taxonómica de las principales especies de cítricos de importancia comercial, la cual según todo lo comentado anteriormente es relativa.

REINO: Vegetal
ORDEN: Geraniales
SUBORDEN: *Geraniineane*
CLASE: *Dicotyledoneae*
SUBCLASE: Archichalmydeae
DIVISIÓN: Embryophyta
SUBDIVISIÓN: Angiospermae
FAMILIA: Rutaceae
SUBFAMILIA: Aurantiodeae
TRIBU: Citreae
SUBTRIBU: Citrinae
GÉNERO: Citrus L.
SUBGÉNERO: Citrus
ESPECIES:

- *Citrus sinensis* (L.) Obsbeck – Naranja Dulce
- *Citrus aurantium* L. – Naranja Amarga
- *Citrus paradisi* Macfadyen – Pomelo
- *Citrus grandis* (L.) Osbeck – Toronja o Pumelo*
- *Citrus maxima* (Burn.) Merrill – Toronja o pumelo*
- *Citrus decumana* L. – Toronja o pumelo*
- *Citrus limon* L. Burn. f. – Limón
- *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. – Lima
- *Citrus reticulata* Blanco – Mandarina común
- *Citrus unshiu* Marc. – Mandarina satsuma
- *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. -Mandarina clementina
- *Citrus deliciosu* (Lourerio) – Mandarina mediterránea
- *Citrus nobilis* (Lourerio) – Mandarina king
- *Citrus madurensis* (Lourerio) – Mandarina calamondina
- *Citrus medica* L. – Cidra

PRINCIPALES GRUPOS VARIETALES
***Citrus sinensis* (L.) Obsbeck – Naranja Dulce**

- Naranja común
- Naranja sucreña
- Naranja sanguina o pigmentada
- Naranja navel
- Naranja tardía

***Citrus paradisi* Macfadyen – Pomelo**

- Pomelo blanco o común
- Pomelo rosa o pigmentado

***Citrus grandis* (L.) Osbeck, *máxima* (Burn.) Merrill, *decumana* L. – Toronja o Pummelo**

- Blanco o común
- Pigmentado o rosa
- Dulce o “sin acidez”

Figura 1.1. Taxonomía de cítricos comestibles. Adaptado de Kimball, 1999; Swingle y Reece, 1967.

Desde el punto de vista filogenético (**Figura 1.2**), se postula la hipótesis más aceptada actualmente que dice que todos los cítricos cultivados derivan de tres especies ancestrales originales: el cidro (*Citrus medica* L.), probablemente originario de India y el primer cítrico conocido en Europa, el mandarino (*C. reticulata* Blanco) originario de China, y la zamboa o *pummelo* (*C. maxima* (Burn.) Merrill), originario de los archipiélagos de Malasia y del Este de India (Scora, 1975; Barrett y Rhodes, 1976; Nicolosi, 2007; Xu *et al*., 2013) y que las seis especies comerciales restantes son híbridos producidos a partir de las tres principales. Esta hipótesis fue propuesta por Scora (1975) y Barret y Rhodes (1976) en función de criterios bioquímicos y morfológicos, y ha sido corroborada posteriormente mediante técnicas de biología molecular (Torres *et al*., 1978; Fang *et al*., 1993; Herrero *et al*., 1996; Luro *et al*., 1992; Federici *et al*., 1998; Nicolosi *et al*., 2000)

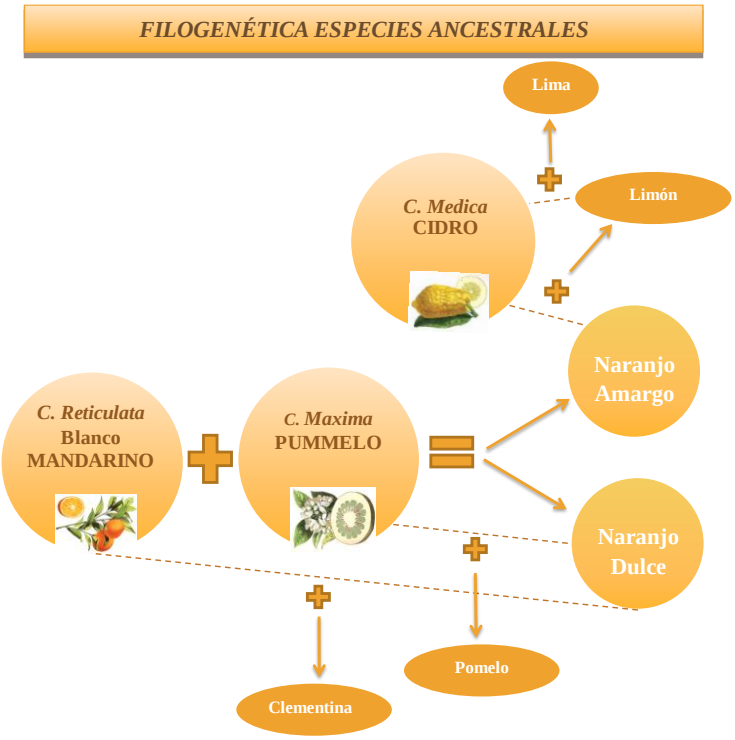


Figura 1.2. Filogenética del origen de los cítricos. Adaptación de Anecoop. S. Coop.

El resto de las especies y variedades de cítricos cultivadas en la actualidad o en épocas precedentes se han originado probablemente por cruzamientos, hibridaciones sucesivas entre las diferentes especies originales o sus descendientes y mediante la selección posterior de mutaciones naturales o inducidas (Nicolosi, 2007). Sin embargo, pese a toda esta información, las relaciones filogenéticas entre las especies ancestrales del género *Citrus* y

de los géneros afines de los cítricos no están del todo bien esclarecidas; pese a tener una diferenciación morfológica evidente entre algunas de estas especies, son sexualmente compatibles, lo que les ha permitido cruzarse y generar nueva variabilidad a lo largo de la historia. A pesar de todo ello, el nivel de diferenciación genética entre y dentro de los taxones básicos del género *Citrus* y los géneros afines no está bien definido.

En el caso particular de la **Clementina**, uno de los cítricos objeto de estudio de la presente tesis doctoral, existen teorías bastantes divergentes sobre su origen, el consenso es que es un *tangor*, un híbrido entre naranja dulce y mandarina. Trabut (1902) se refirió al descubrimiento de una interesante nueva especie entre las plantas cultivadas por el padre Clèment Rodier en el orfanato del Padre del Santo Espíritu en Misserghin, cerca de Orán, en Argelia. La Sociedad Horticultural de Argel la llamó Clementina, nombre sugerido por Trabut, el cual también presentó la *mandarina* y el *granito* un tipo de naranja agria como los padres de la Clementina (**Figura 1.3**).

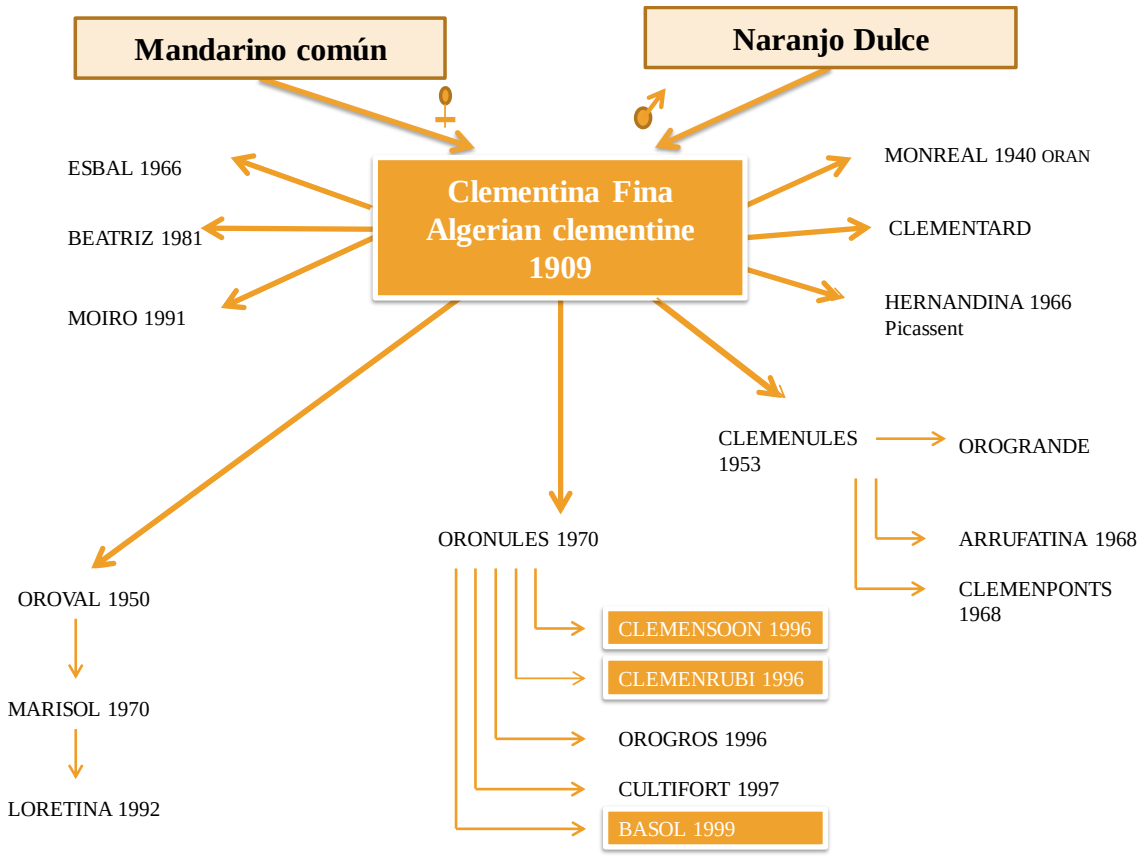


Figura 1.3. Esquema de filogenia de las clementinas para obtención de las muestras objeto de estudio Basol, Clemenrubí y Clemensoon.

Webber (1943) y Chapot (1963) no estaban de acuerdo con esta teoría. Mientras Webber sostenía que la clementina era una variante dentro del grupo mandarina, o que podría tratarse de un cruce interespecífico, es decir, un híbrido de mandarina y naranja dulce; Chapot, por otro lado, encontró algunas similitudes notables con la mandarina Cantón. Sin embargo, parece extraño que dicha mandarina de origen silvestre no fuera reconocida por Tanaka, quien afirmó que únicamente había visto la clementina bajo cultivo y acuñó el término *Citrus clementina Hortulanorum* para ello (1954) (Khan, 2007). La hipótesis de Webber que dice que la clementina proviene del cruce entre mandarina y naranja dulce es apoyada en resultados obtenidos posteriormente utilizando marcadores moleculares (Deng *et al*., 1996; Nicolosi *et al*., 2000).

En cuanto al origen de las **naranjas pigmentadas** o más comúnmente denominadas naranjas sanguinas, se consideran el resultado de una mutación genética espontánea ocurrida hace muchos siglos en plantas nativas de China. A partir de China, su cultivo y consumo se extendió por toda la cuenca del Mediterráneo y en particular en Sicilia, donde se han cultivado desde el siglo XV d.C. Pese a que se atribuye a los árabes la plantación original de limones y naranjas amargas en Sicilia, fueron los cruzados genoveses y portugueses quienes introdujeron la variedad dulce, convirtiéndose en un elemento básico de la cocina siciliana, recibiendo incluso el distintivo de calidad de Indicación Geográfica Protegida (IGP) bajo el nombre de *Arancia Rossa di Sicilia*. Gran parte de sus características tan especiales como el color rojizo, se ven favorecidas por el clima y las condiciones locales de la llanura de Catania, cerca del volcán Etna, zona donde es muy abundante el crecimiento de estas frutas (Calogero y Di Marco, 2008; Barreca *et al*., 2016).

Como se ha comentado anteriormente (**Figura 1.1**), los cítricos pertenecen a la clase *Angiospermae*, subclase dicotiledónea, orden *Rutae*, familia *Rutaceae* y género *Citrus* y cuenta con más de 145 especies botánicas, entre las que destacan: la **naranja dulce** (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.), **mandarina** (*Citrus Reticulata* Blanco), limón (*Citrus limón* L. Burn. f.) y pomelo (*Citrus paradisi* Macfadyen), que son las principales especies cultivadas en la actualidad a nivel mundial (Devices y Albrigo, 1999; Agustí, 2003).

Cada especie está constituida por diferentes variedades y es posible distinguirlas mediante la observación de sus características morfológicas y parámetros representativos de cada una de ellas (**Figura 1.4**).

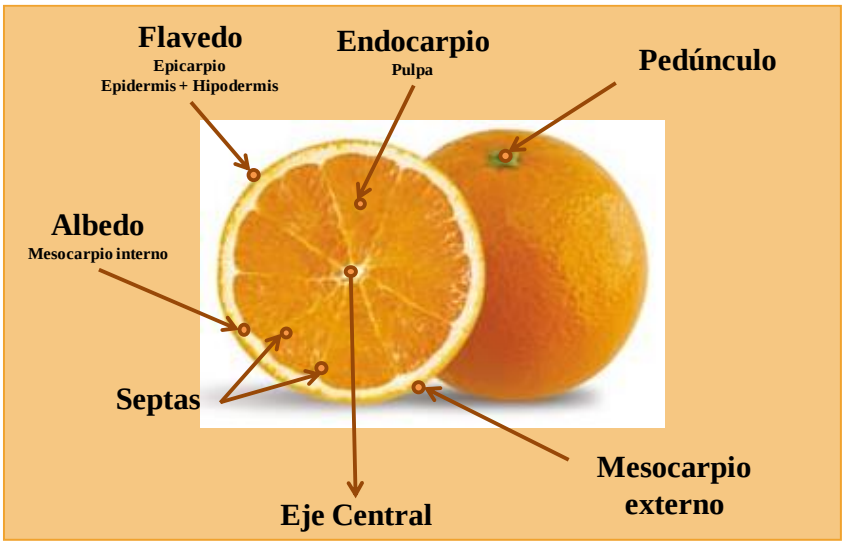


Figura 1.4. Ejemplo de morfología de una naranja. Elaboración propia.

Los frutos cítricos son un tipo de bayas modificadas o especializadas denominadas hesperidio, generalmente tienen entre 8 y 16 segmentos que contienen las vesículas de zumo conectados al eje central, excepto el pomelo que puede llegar a tener hasta 18 segmentos; el número de semillas es variable entre las diferentes especies (Agustí, 2003; Ladaniya, 2008). El conjunto de capas que forman el fruto recibe el nombre de pericarpio (o corteza), el cual está constituido por el flavedo y albedo, y representa las capas más externas del fruto (Agustí, 2003). El flavedo (o exocarpio) es la parte más externa pigmentada en la cual se encuentran las glándulas de aceite en las que se almacenan los aceites esenciales característicos de cada especie y variedad, mientras que el albedo (o mesocarpio) es la parte interna del pericarpio y suele ser de color blanco y esponjoso. La parte comestible o pulpa (endocarpio) es la parte más interna del fruto y está formada por segmentos rellenos de pequeñas vesículas que contienen el zumo además de pequeños cuerpos de aceites esenciales (Tadeo *et al*., 2003).

Las **mandarinas** son uno de los cultivos más importantes a escala mundial, son los productos frutícolas más consumidos como zumo y/o fruta fresca a nivel global y los frutales de mayor valor económico. Aunque las mandarinas se identifican ampliamente con la especie *Citrus reticulata* Blanco, las poblaciones silvestres de *Citrus reticulata* no se han descrito definitivamente en su totalidad. Cabe mencionar que el término mandarina es un término comercial o de designación popular, refiriéndose a cítricos dulces, de pequeño tamaño y fáciles de pelar (Wu *et al*., 2014).

Dentro de la **especie de mandarinas** (*Citrus reticulata*) encontramos 3 grandes grupos: **Clementinas** (*Citrus Clementina* Hort. Ex Tan.), **Satsumas** (*Citrus Unshiu*) e **híbridos.** El grupo Clementinas se caracterizan por presentar una piel muy fina y con colores que van desde el naranja a naranja intenso, formas esféricas o aplanadas y carecen de semillas, destacan las variedades Clementina de Nules, Fina, Marisol, Hernandina y Oronules, de esta última por mutación espontánea se originan las tres variedades estudiadas en el presente trabajo (**Basol, Clemenrubí y Clemensoon**). En el grupo de las Satsumas, caracterizadas por tener frutos amarillo-naranja a naranja asalmonado, presentar formas aplanadas y no contener semillas, destacan las variedades Hashimoto, Okitsu, Clausellina y Owari. Por último, cabe mencionar el **grupo de los híbridos** que pueden presentar semillas y en ocasiones un ombligo en la corteza. Los frutos presentan colores naranjas y rojizos, generalmente más intensos que los no híbridos (Soler, 1999; Agustí, 2003).

Por otro lado, el **naranjo dulce (*Citrus sinensis*)** está representado por tres grandes grupos; el **grupo Navel**, caracterizado por presentar un ombligo en la región estilar, y en el que destacan las variedades Navelina, Washington Navel y Navelate; el **grupo Blancas**, caracterizadas por presentar una pigmentación amarillo-naranja a naranja y no presentar ombligo, y en el que destacan las variedades Salustiana y Valencia Late; y el **grupo Sanguina** o de naranjas pigmentadas que se caracteriza por acumular antocianos y carotenoides como el β-caroteno en el fruto, proporcionando un color rojo más o menos intenso, por el cual destacan las variedades Sanguinelli, Tarocco y Moro.

1.2. Proceso de maduración en cítricos

El crecimiento del fruto es un proceso que se extiende desde la floración hasta la maduración, siguiendo una curva sigmoidal, aunque la velocidad del mismo es variable, caracterizada por tres fases bien diferenciadas (Bain 1958) entre las que se encuentra la fase de maduración. La duración de las mismas está relacionada con el genotipo de cada variedad y con factores internos y externos que actúan durante las diferentes fases del proceso (Agustí *et al*., 1999; Cercós *et al*., 2006).

Una **primera fase** está determinada por los procesos de división celular, mediante el cual se producen casi todas las células que contendrá el fruto maduro, con mecanismos de diferenciación celular independientes que establecerán las características específicas de cada

tipo de célula y tejido, dando lugar a las diferentes partes del fruto (Guardiola, 1988). Esta fase se le considera de crecimiento exponencial, puesto que es el periodo en que los cambios anatómicos y fisiológicos ocurren con mayor rapidez y se caracteriza por un rápido crecimiento del volumen del fruto provocado por dicha división celular, y que continúa hasta la fase de maduración, con el consiguiente aumento del número de células individuales de todos sus tejidos en desarrollo, como a la expansión de la pulpa excepto del eje central y al incremento del contenido de zumo en las vesículas (Cámara, 1990; Pérez, 2004).

El aumento en el tamaño del fruto es debido, principalmente, al crecimiento de la corteza. Por un lado, el volumen del exocarpo aumenta por la división de sus células, por otro, hay un aumento de volumen en el mesocarpo por engrosamiento de sus paredes celulares y un aumento del tejido vascular que no tiene conexión con la pulpa en desarrollo. Además de este crecimiento de la corteza, al principio de este período hay un aumento en el volumen del endocarpo, debido principalmente a la división celular en los septos y en las paredes tangenciales de los lóculos. Al final de este período, los lóculos aumentan de tamaño por engrosamiento de las células centrales de los septos y por la elongación radial de las células tangenciales. Así mismo, de las células situadas en la cara más interna de las paredes tangenciales de los lóculos se forman los primordios de las vesículas de zumo. Estas crecen hacia el interior de los lóculos por la acción de un meristemo apical, y al final de este período los ocupan por completo (Agustí *et al*., 2003).

La **segunda fase** o de crecimiento lineal, se determina por el alargamiento o crecimiento celular, se prolonga durante varios meses, desde el final de la caída fisiológica del fruto hasta poco antes de su cambio de color. Su duración es, por tanto, variable según la variedad: corta en variedades precoces como las clementinas (2 meses) y larga en las más tardías (5 - 6 meses). Se caracteriza por una expansión marcada de los tejidos, acompañada por un agrandamiento celular y la formación de grandes espacios intercelulares en el mesocarpo que le confieren una consistencia esponjosa, con la ausencia de división celular en casi todos los tejidos excepto los del exocarpo. En esta fase el aumento de tamaño se debe principalmente al desarrollo de los lóculos, en cuyo interior las vesículas de zumo llegan a alcanzar su máxima longitud y el contenido en zumo de sus células aumenta. El pedúnculo vesicular es el conducto a través del cual incorporan el zumo.

La **tercera fase** se corresponde con el *periodo de maduración* y se caracteriza por una disminución de la velocidad del crecimiento del fruto mientras éste se mantiene en el árbol y comprende todos los cambios asociados a la maduración, numerosos cambios en la composición química relacionados con el aroma y sabor de los frutos, a expensas de los constituyentes acumulados durante el proceso de desarrollo (Albrigo, 1992; Davies y Albrigo, 1994). Se incrementan los compuestos nitrogenados y disminuye el ácido cítrico, a partir de un máximo obtenido en las etapas tempranas del desarrollo (Bain, 1958).

Durante esta etapa se inician dos procesos, ambos oxidativos e independientes, relacionados con dos sistemas enzimáticos, que suelen ser próximos en el tiempo, la degradación de la clorofila del flavedo y el incremento de los diferentes pigmentos como carotenoides que con independencia de los cambios químicos que se producen en el interior del fruto conducen a su madurez comercial (Jiménez- Cuesta *et al*., 1983). Se ha sugerido que la producción de etileno como respuesta a factores externos desencadena estos procesos (Kimball, 1984). Ambos procesos coinciden normalmente con la maduración interna, si bien están sujetos a controles distintos. El contenido en sólidos solubles, sobre todo azúcares y compuestos nitrogenados, aumenta, mientras que los ácidos libres disminuyen progresivamente como consecuencia, fundamentalmente, de un proceso de dilución (Cercós *et al*., 2006).

El aumento del tamaño del fruto se debe al aumento de los segmentos de la pulpa, al aumento en anchura del eje central y al crecimiento de la corteza, que en algunas variedades llega a ser muy importante como en las Satsuma, (*Citrus unshiu*) y en otras apenas es perceptible como en las Clementinas (*Citrus clementina*). La pigmentación de la corteza es consecuencia de la degradación enzimática de las clorofilas del flavedo y de la síntesis de carotenoides.

Según Agustí y Almela (1991), la acumulación de metabolitos por el fruto es la causa de su desarrollo. Este puede verse limitado por la incapacidad del fruto para acumularlos o por su falta de disponibilidad en la planta. Como ambos factores se hallan estrechamente interrelacionados, la modificación de uno de ellos incide en el otro, por lo que una misma respuesta, el aumento de tamaño, puede lograrse actuando sobre la acumulación de metabolitos o sobre su suministro, aunque con distinta eficacia.

En el periodo de maduración se producen cambios físicos y químicos internos en el fruto asociados a este proceso, y se caracteriza porque se nivela el crecimiento y ocurre un ligero

aumento, gradual de los sólidos solubles totales, junto con una rápida disminución de la acidez total (Davies y Albrigo, 1994).

Factores ambientales y de cultivo, sobre todo el riego y la fertilización, inciden marcadamente en el desarrollo del fruto y su tamaño final, lo que exige la optimización de las técnicas de cultivo. Sin embargo, aún en condiciones óptimas es posible conseguir un aumento del tamaño del fruto mediante la manipulación de la planta y la modificación de las relaciones nutricionales endógenas y su distribución (Agustí y Almela, 1984), esto puede lograrse:

a) Mediante el aclareo, de modo que se aumenta la disponibilidad de metabolitos por el fruto, a través de una reducción del número de frutos por planta y, por tanto, de la competencia entre órganos en desarrollo.

b) A través de técnicas de estímulo del desarrollo del fruto conocidas como engorde, mediante la modificación en sentido favorable del equilibrio hormonal del fruto, incrementando de esta forma la capacidad del fruto para crecer.

El proceso de la maduración depende de los tipos de frutos, de modo que a este respecto es posible clasificarlos en dos grandes grupos según su comportamiento fisiológico. Unos acumulan almidón durante su crecimiento y en la maduración lo hidrolizan hasta monosacáridos, glucosa y fructosa, principalmente; como ello exige una gran cantidad de energía, en estos frutos la maduración se caracteriza por un aumento de la respiración. Este incremento de la respiración, que es irreversible, recibe el nombre de **climaterio** y viene precedido por un aumento en la concentración activa de etileno en los espacios intercelulares del mesocarpio. Otros frutos, sin embargo, acumulan directamente monosacáridos durante su crecimiento y, por tanto, durante la maduración no experimentan incrementos significativos de su tasa respiratoria. Los del primer grupo se denominan *frutos climatéricos*, y los del segundo son *frutos no climatéricos*. En los primeros el aumento en la producción de etileno que tiene lugar durante la maduración, o precediéndola, es responsable de los cambios bioquímicos que conducen irreversiblemente a ella. En los segundos los cambios que se producen son similares, pero menos intensos y más lentos, en general, y no están relacionados con la síntesis de etileno. Los cítricos pertenecen a este grupo (Cámara, 1990; Agustí *et al*., 2003).

Por tanto, la maduración se considera como el estadío de desarrollo que conduce a la madurez fisiológica o de consumo, se define como el conjunto de cambios externos, de sabor y de textura que un fruto experimenta cuando completa su crecimiento. Brady (1987) y Tucker y Grierson (1987), han estudiado con profundidad este proceso. En el cual tienen lugar los procesos ya mencionados, como la coloración del pericarpio, el descenso en el contenido en almidón, incremento de la concentración de azúcares, reducción de la concentración de ácidos, pérdida de firmeza, y otros cambios físicos y químicos (Agustí *et al*., 1999). Superada esta fase, el fruto pierde turgencia, aumenta su sensibilidad a las condiciones del medio, pierde el control metabólico e inicia su senescencia o envejecimiento biológico.

En las clementinas, la fase de maduración se inicia en el último tercio del proceso de crecimiento y termina con las primeras etapas de senescencia o envejecimiento celular, e involucra una serie de cambios en las características externas e internas el fruto. En este sentido, se define como **madurez fisiológica** al momento en el que los frutos han cesado prácticamente su crecimiento, se detienen la acumulación de reservas y se incrementan los procesos metabólicos que conducen a su madurez organoléptica o de consumo. En las clementinas al no presentar un mecanismo de maduración bien definido, y al tratarse de frutas no climatéricas parece más razonable emplear el término de **madurez organoléptica o comercial**. Esta se define como el estadío en el cual se alcanza un mínimo de calidad aceptable por el consumidor (Lee *et al*., 1983).

1.3. Producción, exportación y consumo de cítricos

En la actualidad, España es uno de los principales países productores de cítricos, ocupando la sexta posición con aproximadamente 6,5 millones de toneladas (mill. Tn.) en el año 2014, con los últimos datos actualizados de FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) a nivel mundial, siendo el principal país productor de la Región Mediterránea, seguido de Egipto y Turquía (4,4 y 3,8 mill. Tn., respectivamente). El principal país productor de cítricos es China (29,6 mill. Tn.), seguido de Brasil (19 mill.Tn.), E.E.U.U (9,4 mill. Tn.), Méjico (7,5 mill. Tn.) e India (7,4 mill.Tn.). En la siguiente figura se pueden ver los principales productores de cítricos (**Figura 1.5**).

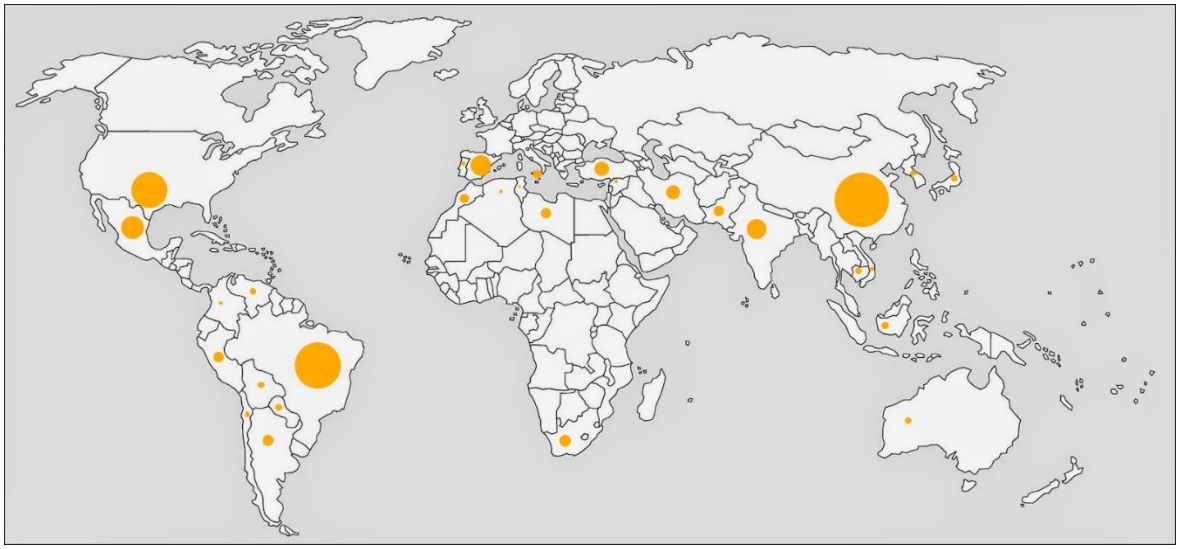


Figura 1.5. Zonas de producción mundial de cítricos. Elaboración propia.

De entre los cítricos que se cultivan en España destaca la **naranja** en primer lugar, que coloca a España en la sexta posición mundial con una producción aproximada de 3,4 millones de toneladas. Según los últimos datos actualizados de la FAO, Brasil, es el máximo productor de naranjas con 16,8 millones de toneladas (**Figura 1.6**).

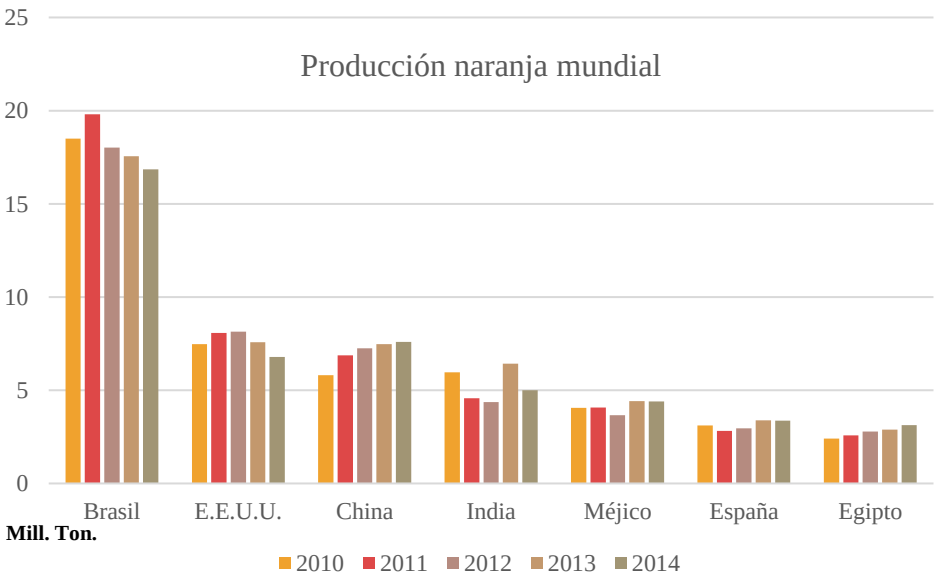


Figura 1.6. Principales productes de naranja en millones de toneladas de los últimos años. Fuente: FAOSTAT, 2017.

En segundo lugar, destaca la **mandarina**, siendo España el segundo principal productor con algo más de 2 millones de toneladas, por detrás de China con 17,8 millones de toneladas (**Figura 1.7**). El resto de la producción, con alrededor de un millón de toneladas corresponde al resto de cítricos cultivados entre los que se encuentra el limón y el pomelo.

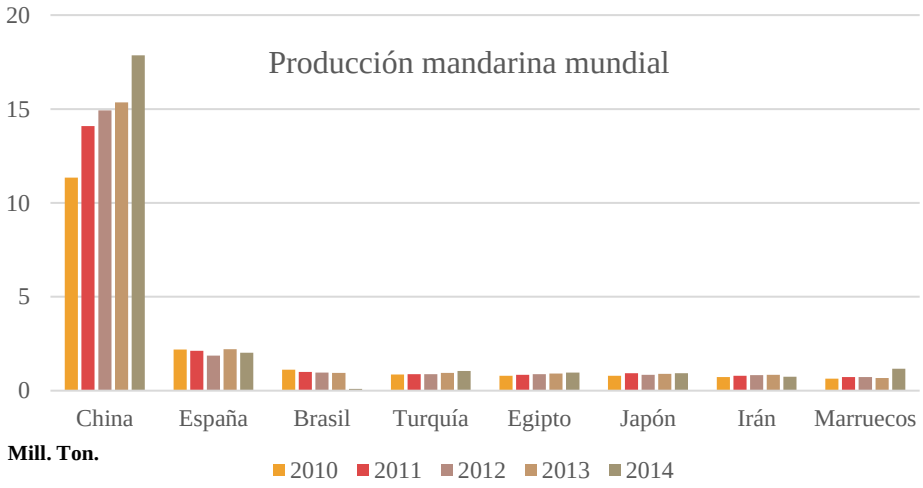


Figura 1.7. Principales productores de mandarina en millones de toneladas de los últimos años. Fuente: FAOSTAT, 2017.

La superficie citrícola cultivada en España ha sufrido variaciones a lo largo de la última década (**Figura 1.8**). Así, en los primeros años de la serie la superficie ha crecido salvo en el año 2009, y a partir de 2011 ha ido disminuyendo ligeramente de forma sostenida.

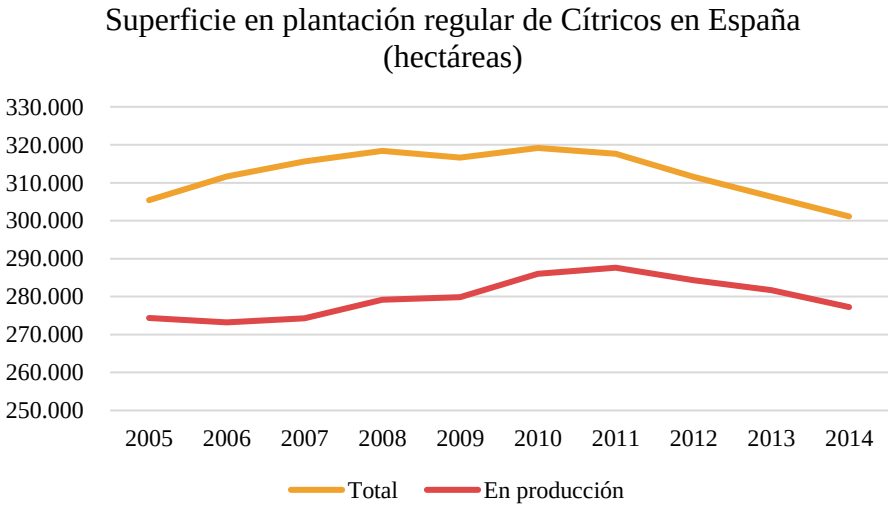


Figura 1.8. Evolución en la superficie en plantación de cítricos en España, en hectáreas. Fuente: MAPAMA, 2017a; Elaboración propia.

El resultado es que se ha pasado de 305.407 hectáreas en 2005 a 301.124 hectáreas en 2014, representando un descenso del 1,4 %. A pesar de este ligero descenso, esta superficie cultivada hace que los cítricos constituyan con diferencia el principal grupo de frutales en España. De hecho, en 2014 más del 61 % de la superficie cultivada de frutales correspondía a cítricos.

El análisis de la evolución de la superficie cultivada por especies revela un incremento en todas, excepto en limonero. En concreto, en el año 2014 la superficie total destinada al cultivo de naranjo fue la mitad de la superficie total destinada al cultivo de todos los cítricos, seguido del mandarino, limonero, y del resto de cítricos en una menor proporción (**Figura 1.9**). Esta dinámica muestra que la citricultura española mantiene su tradicional orientación al cultivo del naranjo que aumenta su predominio al pasar de representar el 45 % de todos los cítricos en 2005 al 49 % en 2014. El mandarino por su parte se ha mantenido con un porcentaje del 38 %; mientras que el limonero pierde peso al reducir su aportación del 15 al 12 %.

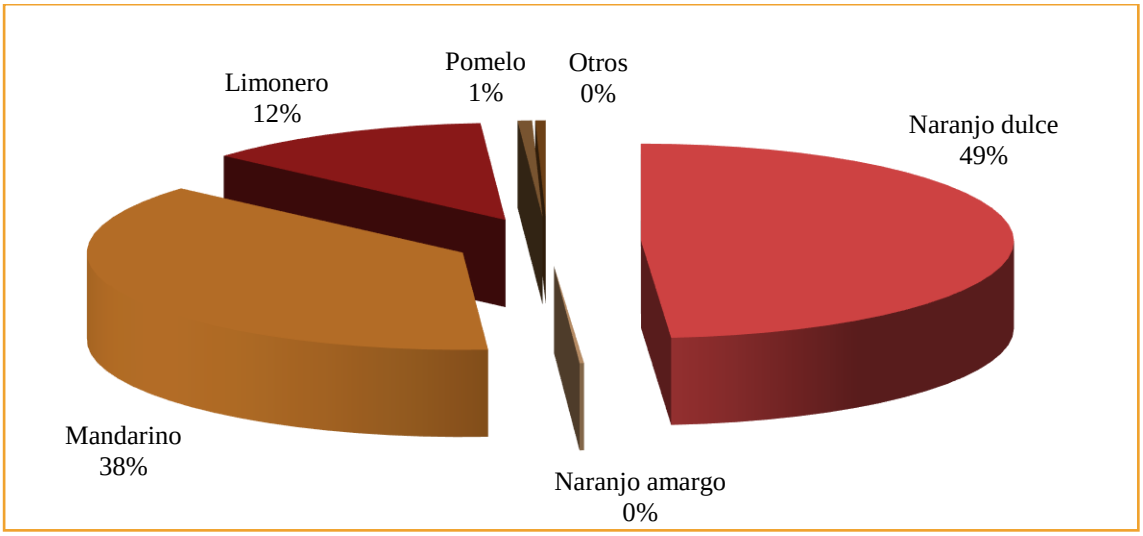


Figura 1.9. Distribución de la plantación regular de los diferentes cítricos en el año 2014 (MAPAMA, 2017a)

Tras analizar la distribución de dicha superficie de cítricos cultivada por comunidades autónomas, se observa que Valencia y Andalucía continúan siendo las más importantes, acumulando entre las dos más del 83,5 % de la superficie citrícola española.

El cálculo de los índices provinciales de densidad de frutales cítricos (superficie de cítricos por cada 100 hectáreas de territorio), permite apreciar que la superficie citrícola en España está distribuida mayoritariamente a lo largo del litoral mediterráneo y las provincias occidentales de Andalucía (**Figura 1.10**). La provincia con mayor superficie citrícola cultivada es Valencia con 98.030 hectáreas, que representan el 32,6 % del total nacional, seguida de Murcia con 36.127 hectáreas (12 % del total nacional), Castellón con 31.241 hectáreas (10,4 % del total nacional), Alicante con 30.074 (10 % del total nacional) y Sevilla con 29.204 hectáreas (9,7 % del total nacional) a más distancia estarían Huelva con 20.342 hectáreas (6 % del total nacional), Córdoba y Málaga con 11.760 y 10.801 hectáreas, respectivamente (3,9-3,6 % del total nacional).

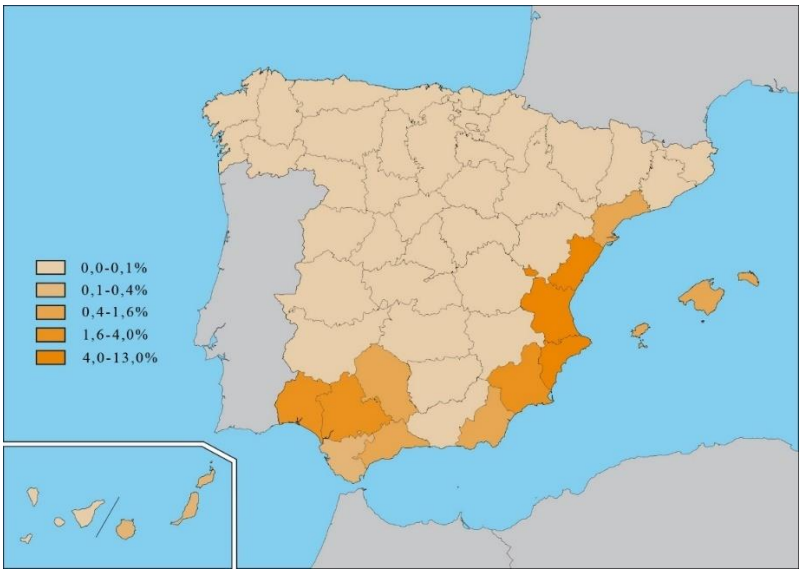


Figura 1.10. Distribución de superficie citrícola con respecto a la superficie geográfica provincial. Elaboración propia con datos actualizados de MAPAMA, 2017b.

La consideración conjunta de la superficie de cítricos por especie y comunidad autónoma (**Tabla 1.1**), permite poner de manifiesto que en 2014 Valencia ocupaba el primer lugar nacional tanto en naranjo como en mandarino, si bien en el primer caso las distancias con Andalucía son muy reducidas. Y que Murcia lideraba la superficie en limonero y pomelo. El desglose a nivel provincial muestra que en naranjo las dos provincias con más superficie son Valencia y Sevilla, representando conjuntamente el 53,2 % del total nacional. En mandarino, las tres provincias más importantes son Valencia y Castellón que aglutinan el 66,7 % del total. En limonero, las dos primeras posiciones las ocupan Murcia y Alicante, representando conjuntamente el 81,9 % del conjunto estatal. Y en pomelo, las dos provincias que más

superficie acumulan son Murcia y Valencia, suponiendo en conjunto el 67,0 % del total nacional.

Tabla 1.1. Distribución por comunidades de la superficie de cultivo en España en 2014. Fuente: MAPAMA, 2017a

	Naranjo	Mandarino	Limonero	Pomelo	Otros Cítricos	Total Cítricos
Cataluña	2.290	7.254	4	-	-	**9.548**
Valencia	73.030	82.317	9.496	600	874	**166.317**
Murcia	8.523	5.622	21.278	650	54	**36.127**
Andalucía	59.983	17.551	6.053	603	417	**84.607**
Otras CCAA	2.916	358	667	11	4	**27.338**
Total España	146.742	113.102	37.498	1.864	1.349	**300.555**

Datos expresados en hectáreas

La producción de cítricos en España ha crecido un 24 % entre los años 2005 y 2014, si bien a lo largo de este periodo ha experimentado una evolución muy irregular (**Figura 1.11**). Entre los años 2005 y 2010 las variaciones registradas son bastante erráticas con ascensos y descensos muy pronunciados, destacando 2007 y 2009 por un fuerte descenso volviendo a niveles del 2005. A lo largo del período considerado los años con mayor volumen de producción fueron 2006, 2008 y 2014; mientras que los más escasos fueron 2005, 2007 y 2009, a partir de 2012 se observa una tendencia en general al alza superando los máximos niveles alcanzados en 2006.

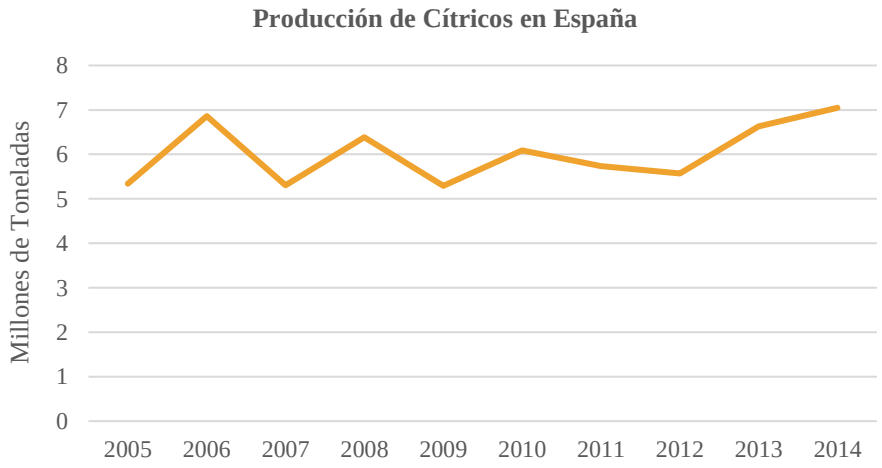


Figura 1.11. Evolución de la producción cítricos en España en millones de toneladas (MillTn). Elaboración propia con datos actualizados de MAPAMA, 2017b

En general la producción de naranjas ha crecido en los últimos años, adquiriendo mayor importancia cítricos como las **naranjas pigmentadas**, objeto de estudio de la presente tesis doctoral, debido principalmente al creciente interés por parte de los consumidores que generan estas frutas, debido a sus características propiedades organolépticas, de color y sabor, así como a su contenido en substancia fisiológicamente activas.

Según los datos actualizados de MAPAMA, la producción de este tipo de naranjas ha crecido en los últimos años (**Figura 1.12**). Entre las zonas de cultivo de este tipo de naranjas destaca Andalucía principalmente (10,5 miles de toneladas), seguido de la Comunidad Valenciana (6,5 miles de toneladas) y por último a gran distancia se encuentra la Región de Murcia (0,63 miles de toneladas).

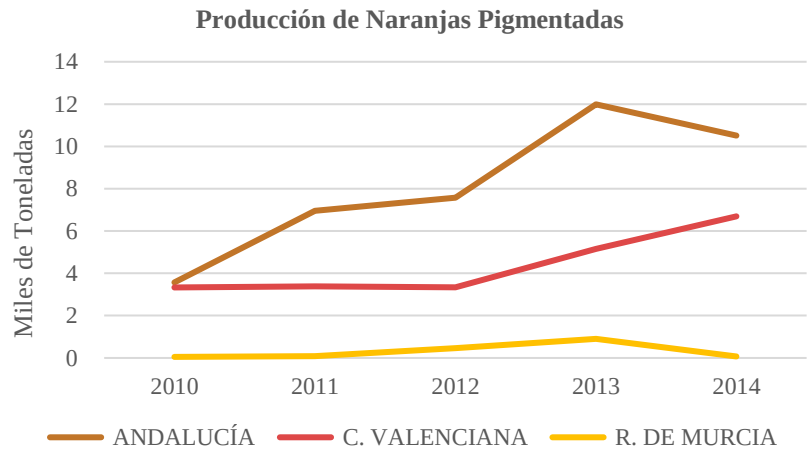


Figura 1.12. Evolución de la producción de naranjas pigmentadas por C.C.A.A en miles de toneladas (MTn). Elaboración propia con datos actualizados de MAPAMA, 2017b

Dentro de la Comunidad de Andalucía destacan principalmente Hueva y Cádiz por albergar las mayores producciones de este tipo de naranjas (69 y 24 % respectivamente). En cuanto a la Comunidad Valenciana, destacan las provincias de Valencia con un 75 % de la producción, seguido de Alicante con un 23 %.

En general, la producción de mandarinas en España ha aumentado un 18 % entre los años 2005 y 2014, si bien a lo largo de este periodo ha experimentado una evolución muy irregular (**Figura 1.13**). En los primeros años del periodo considerado (2005-2008) las variaciones registradas son bastante erráticas con ascensos y descensos muy pronunciados. A partir de

2008 hasta 2012 se produjo un descenso volviendo a niveles de 2005, a partir de aquí hasta el 2014 se observa una tendencia en general al alza.

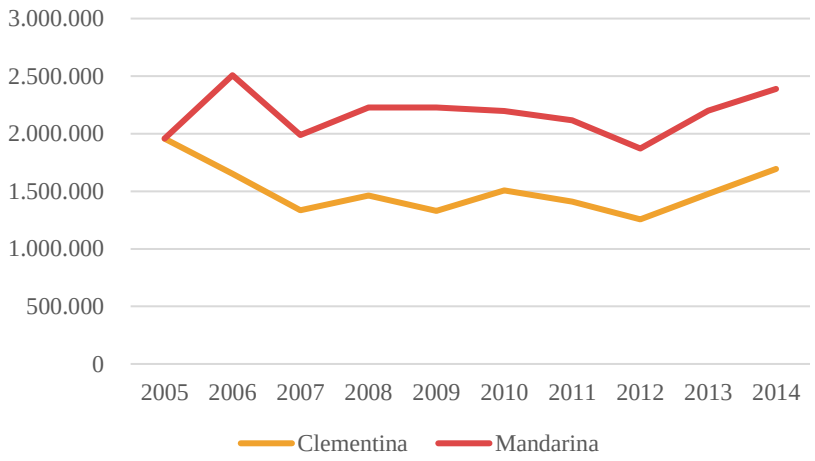


Figura 1.13. Evolución de la producción (Tn) de mandarinas y clementinas en España. Elaboración propia con datos actualizados de MAPAMA, 2017b

En el caso particular de las clementinas, en general siguen una evolución similar al total de las mandarinas producidas, puesto que son éstas las que representan la fracción mayoritaria, así es en el caso del año 2014 que representan el 71 % (**Figura 1.14**). Las clementinas, entre los años 2005 y 2007 experimentan un descenso, mientras que los años siguientes muestran variaciones de ascensos y descensos.

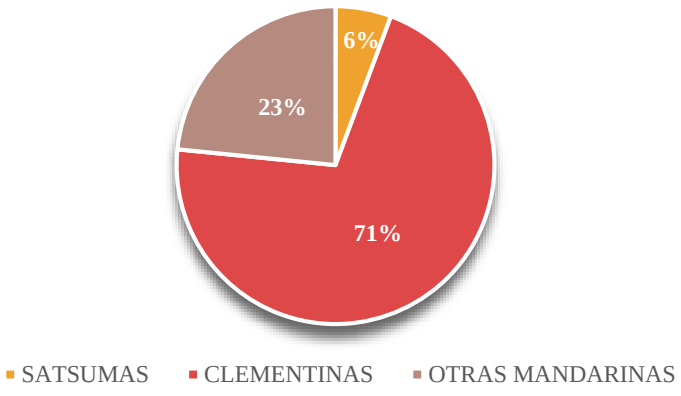


Figura 1.14. Distribución de la producción de mandarinas en el año 2014 en España. MAPAMA; 2017. Elaboración propia con datos actualizados de MAPAMA, 2017b

Tabla 1.2. Distribución por comunidades de la producción de mandarinas en España (toneladas)

	Satsumas	Clementinas	Otras Mandarinas
Cataluña	6.160	138.600	9.257
Valencia	112.266	1.236.547	358.213
Murcia	1.922	82.832	41.200
Andalucía	15.067	234.987	149.599
Otras CCAA	360	250	353
Total España	135.775	1.694.536	559.583

En el año 2014, la distribución de la producción de mandarinas por Comunidades Autónomas (**Tabla 1.2**), pone de manifiesto que Valencia lidera la tabla con bastante distancia sobre las demás, fundamentalmente en la producción de clementinas. Las dos provincias más importantes en la producción de clementinas son Castellón y Valencia, que aglutinan el 69,9 % del total español, seguidas a una cierta distancia de Tarragona y Huelva, las cuales representan conjuntamente el 15,7 % del total de la producción de mandarinas.

Pese al continuado crecimiento de la producción y exportación en muchos países, España sigue manteniendo su liderazgo como primer **exportador** mundial en cítricos.

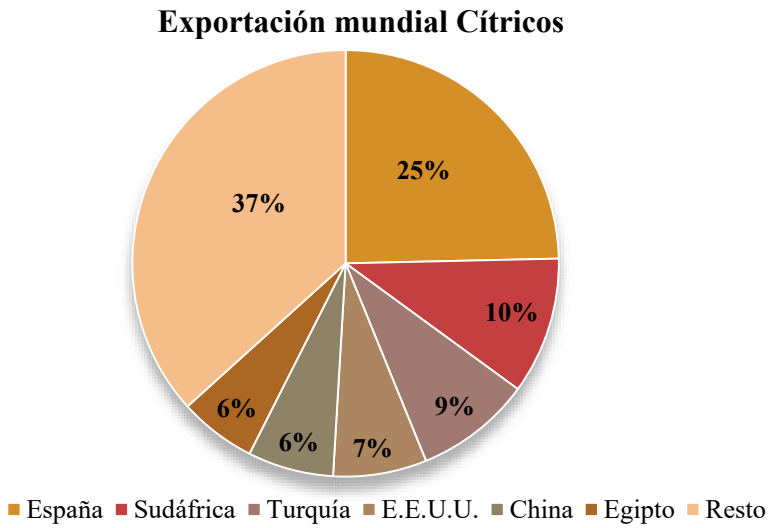


Figura 1.15. Porcentajes de exportación mundial de cítricos. Elaboración propia con datos actualizados de FAOSTAT, 2017b

Las exportaciones españolas de cítricos en fresco durante los últimos cuatro años se sitúan en torno a los 4,2 millones de toneladas según datos de la Federación Española de Asociaciones de Productores Exportadores (FEPEX). Dicha cifra continúa siendo muy superior al volumen comercializado por otros países; según datos extraídos de FAO, España representa el 25 % de las exportaciones mundiales de cítricos (**Figura 1.15**).

Países como Sudáfrica o Turquía, son los segundos y terceros exportadores mundiales, con 1,6 y 1,5 millones de toneladas respectivamente (**Figura 1.16**, FAO, 2017). En el recorrido de los seis primeros exportadores mundiales, siguen a continuación en orden de volumen en toneladas, Estados Unidos y China, con alrededor de 1 millón de toneladas y Egipto, con cerca de 0,9 millones de toneladas exportadas.

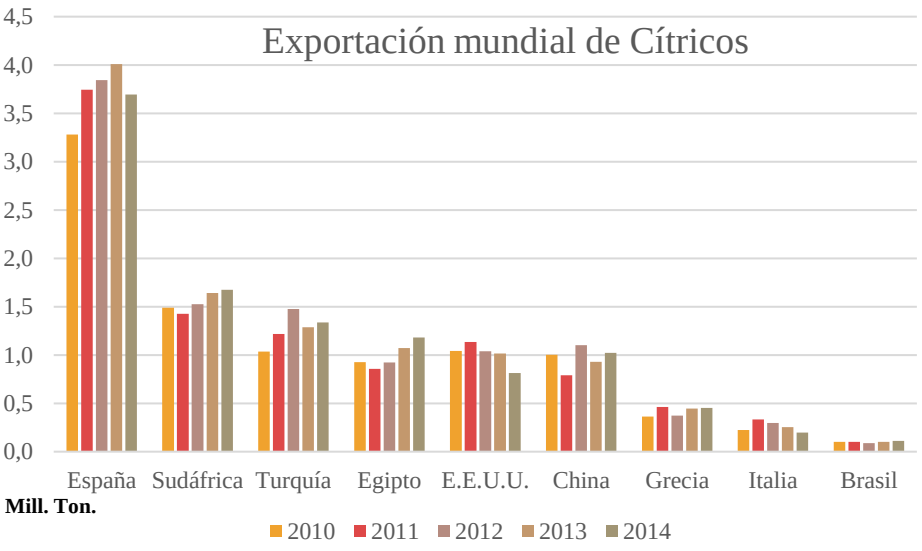


Figura 1.16. Principales países exportadores de cítricos. Elaboración propia con datos actualizados de FAOSTAT, 2017

Particularmente en España, dentro de la exportación de cítricos, destaca la naranja ya que representa el 45% del total con 1,9 millones de toneladas (MT), seguida de la mandarina con 1,5 MT, el limón con 0,6 MT, muy distanciados del resto de cítricos que suponen el 2% restante (**Figura 1.17**).

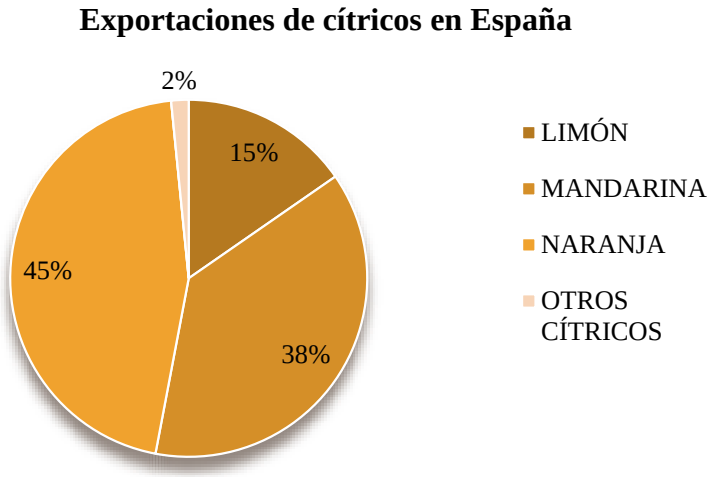


Figura 1.17. Exportaciones de los diferentes cítricos en España. Elaboración propia con datos actualizados de FEPEX, 2016.

Las exportaciones de cítricos por comunidades autónomas las lidera fundamentalmente la Comunidad Autónoma de Valencia, representando el 70% de las exportaciones totales nacionales, siendo líder con 2,8 millones de toneladas (MT) de cítricos exportados, seguida de Murcia con 0,64 MT, Andalucía 0,3 MT y Cataluña con 0,2 MT (**Figura 1.18**).

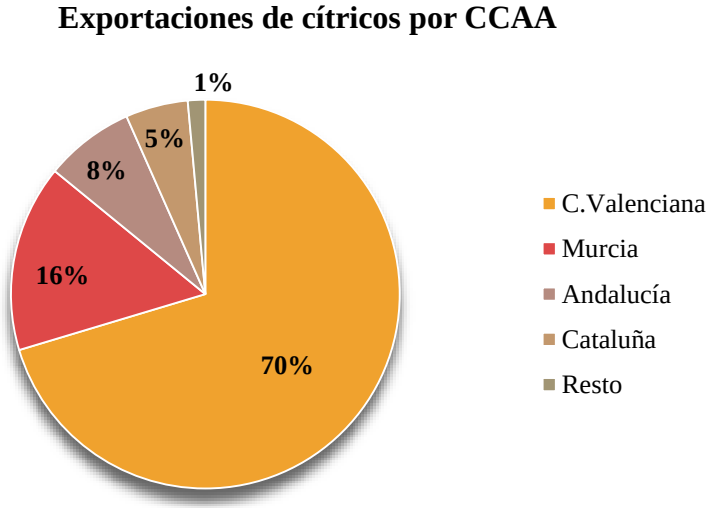


Figura 1.18. Exportaciones de cítricos en las campañas 2012- 2016 distribuido por Comunidades Autónomas. Elaboración propia con datos actualizados de FEPEX, 2017.

Según los datos proporcionados por el MAPAMA (2017b), los principales países importadores de cítricos procedentes de España son en primer lugar Alemania (27% de la exportación), seguido de Francia (20%), Gran Bretaña (19%) y Holanda (12%).

Concretamente en las exportaciones de mandarinas, España sobresale del resto de países al vender el 23 % del total. Solo tres países (España, Egipto y Sudáfrica) representan el 54% del comercio mundial. Se aprecia, por tanto, una fuerte concentración de las ventas, al contrario de lo que ocurre en el caso de las compras donde un 47 % son realizadas por países que adquieren volúmenes poco relevantes. Rusia es el principal comprador de mandarina, con un 17 % del total. Alemania, Francia y Reino Unido suman otro 23 % adicional. Destaca el escaso potencial comprador de EEUU (solo adquiere un 3 %), poniéndose de manifiesto el proteccionismo existente en ese mercado. España sigue siendo el exportador con mayor volumen con un 37 %. El potencial de China, como vendedor, sí se aprecia en el caso de este producto ya que supone el 17 % de los envíos mundiales. Turquía y Marruecos también muestran cifras de ventas elevadas y entre ambos suman un 28 %.

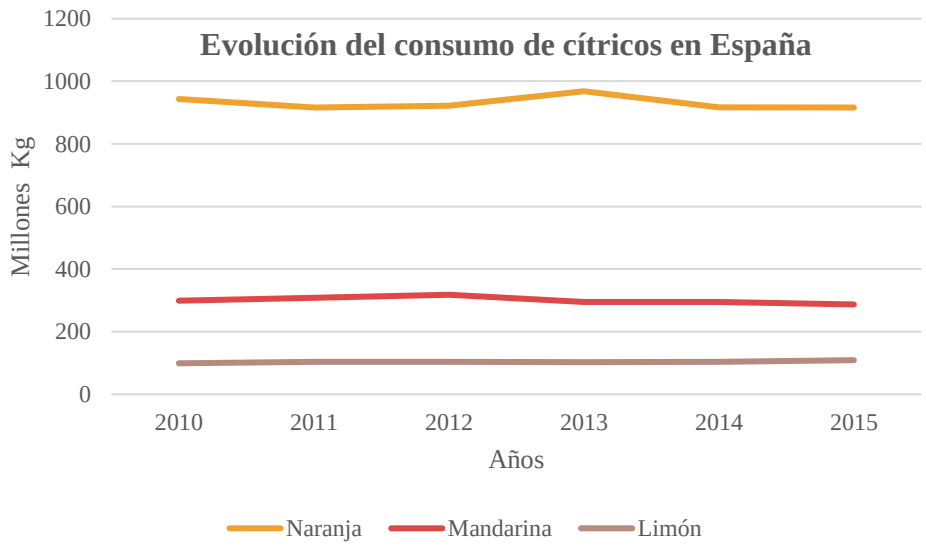


Figura 1.19. Evolución del consumo de cítricos en España en millones de kilogramos. Elaboración propia con datos actualizados de MAPAMA, 2017d.

En general, la evolución del consumo de cítricos en España se ha mantenido constante a lo largo de los últimos años, tal y como se puede observar en la **Figura 1.19**. Destacando el consumo de la naranja con un promedio de 930 millones de kilos en los últimos seis años, seguido de la mandarina y el limón con 300 y 103 millones de kilos, respectivamente. En

este sentido, el consumo de cítricos en España percápita en el último año está alrededor de 29 Kg por habitante y año, principalmente de naranja y mandarina con un consumo muy similar para ambas frutas, alrededor de los 14 kg, a una distancia considerable del consumo de limón (2 Kg, MAPAMA, 2017c).

1.4. Importancia de los cítricos en la alimentación

En la historia de la nutrición humana, la **Dieta Mediterránea** es uno de los regímenes alimentarios más vinculados a la promoción de la salud, este patrón dietético evolucionó naturalmente en las poblaciones que se asentaron a lo largo del Mediterráneo utilizando alimentos particulares que crecen en esta zona (Keys, 1995).

Los historiadores describen con frecuencia cómo las grandes civilizaciones del pasado, como los fenicios, los griegos, los romanos, los cartaginenses y los árabes, ejercían una influencia unificadora sobre la filosofía, el arte y la arquitectura y la tecnología en la región mediterránea. Estas civilizaciones también contribuyen a la cultura alimentaria, y por lo tanto hay muchas similitudes en los tipos de ingredientes y métodos de procedimientos culinarios utilizados en todo el Mediterráneo. (Heltosky, 2009).

El término Dieta Mediterránea, fue utilizado por primera vez por Keys (Keys, 1980), refiriéndose a un modelo general de conducta dietética en los años sesenta y setenta (Cloutier y Adamson, 2004). Hoy en día, el término Dieta Mediterránea, se refiere a una combinación de alimentos que incluyen frutas y verduras frescas, pescado, pasta, pan, y un ingrediente clave, como es el aceite de oliva (SENC, 2016).

Se han propuesto varias definiciones y versiones particulares de la Dieta Mediterránea, éstas incluyen, entre otras, las siguientes características: (1) alto consumo de vegetales y frutas; (2) bajo consumo de carne roja; (3) consumo bajo o moderado de pescado; (4) alto consumo de cereales; Y (5) el último, y tal vez el más importante, el aceite de oliva como principal fuente de grasa, que puede ser una característica común única de la Dieta Mediterránea (Gallus *et al*, 2004).

La Dieta Mediterránea también puede definirse como una recomendación nutricional moderna inspirada en los patrones dietéticos tradicionales de la población que bordea el Mediterráneo.

La cuenca mediterránea incluye tres continentes y más de 15 países, incluyendo el sur de Europa (por ejemplo, Portugal, España, Italia y Grecia), el norte de África (por ejemplo, Marruecos, Túnez, Libia y Egipto) y parte de Asia (Asia Menor y Medio Oriente, por ejemplo, Turquía, Siria, Líbano, Palestina). Los hábitos dietéticos tradicionales en los países mediterráneos representan un modelo alimentario que promueve la salud y promueve una alta calidad de vida (Cloutier *et al*., 2004; Demarin *et al*., 2011).

Las virtudes de la Dieta Mediterránea se han defendido desde el Renacimiento. Pero no fue hasta la década de los ochenta, cuando muchos estudios epidemiológicos demostraron que la población de los países mediterráneos tiene una larga esperanza de vida y un bajo riesgo de sufrir ciertas enfermedades crónicas, entre ellas las enfermedades cardiovasculares, trastornos metabólicos y ciertos tipos de cáncer. Muchos autores han subrayado el papel beneficioso de la Dieta Mediterránea con respecto al metabolismo de los lípidos, la presión arterial, el índice de masa corporal, la inflamación y la coagulación sanguínea (Puga y Urquiaga, año; Gallus *et al*., 2004).

Dichos beneficios de la Dieta Mediterránea se empezaron a investigar a partir de los años 50 cuando se observó que la mortalidad por enfermedad cardiovascular era menor en las áreas rurales del sur de Italia y la isla de Creta, a pesar de poseer menores ingresos y una prestación sanitaria más precaria que en el norte de Europa o en Estados Unidos. Durante la II Guerra Mundial, en la Universidad de Minnesota, Ancel Keys doctor en fisiología y fundador del laboratorio Higiene Fisiológica, realizó un estudio sobre las dietas y los hábitos de consumo en poblaciones de Italia, Yugoslavia, Grecia, Países Bajos, Finlandia, Estados Unidos y Japón, conocido como el Estudio de los Siete Países (Keys *et al*., 1986).

Los resultados mostraron que la dieta de las zonas rurales del Mediterráneo en los años 50 y comienzos de los 60 estaba constituida por una elevada proporción de calorías procedentes hidratos de carbono, mayoritariamente de pan y pasta, una ingesta baja de carne y productos lácteos, un consumo elevado de frutas y verduras, algo de pescado, un consumo regular, aunque modesto de vino y muy poco azúcar. La clave se encontraba en la naturaleza de las grasas, ya que, aunque se consumían en más o menos la misma proporción en el sur y en el norte de Europa, en el norte procedían principalmente de carne y productos lácteos (ricos en ácidos grasos saturados) lo que podría ser la causa de las afecciones cardiovasculares. Por el contrario, la mayoría de las grasas y aceites en la región mediterránea procedían de aceites

vegetales, en particular, del aceite de oliva (rico en ácido oleico), suponiendo entre un 15 y un 33 % del total de las calorías diarias (Trichopoulou *et al*., 1993).

La pirámide alimenticia (**Figura 1.20**) refleja las tradiciones dietéticas mediterráneas, que históricamente se han asociado con un buen estado de salud.



Figura 1.20. Ejemplo del modelo de la pirámide alimentaria. Adaptado de la Fundación Dieta Mediterránea de España. SENC, 2016.

Como se refleja en este esquema, la Dieta Mediterránea se caracteriza principalmente por abundantes alimentos vegetales de consumo diario: frutas, verduras, pan (y otras formas de cereales), patatas, judías, nueces y semillas, con frutas frescas como postre y el aceite como principal fuente de grasa. Mientras que, los productos lácteos (principalmente queso y yogur), pescado y aves de corral se consumen semanalmente; y la carne roja se consume en cantidades bajas. La pirámide representa un patrón dietético que es atractivo para su famosa palatabilidad, así como por sus beneficios para salud (Willett *et al*., 1995)

Existen estudios sobre otros tipos de dietas saludables, pero la evidencia más fuerte de un efecto beneficioso para la salud y la disminución de la mortalidad después de cambiar a una dieta, en gran parte basada en frutas y hortalizas proviene precisamente de estudios derivados de la Dieta Mediterránea (Mitrou *et al*., 2007). Además, esta dieta se cita a menudo como dieta muy beneficiosa por ser baja en grasas saturadas pero alta en grasa monoinsaturada y fibra dietética, principalmente debido al uso de aceite de oliva y sus efectos sobre la salud.

Hoy en día impera el concepto de una alimentación saludable y equilibrada. La habilidad para elegir una dieta equilibrada es algo que ha de aprenderse, aunque vivimos en un momento y en una sociedad privilegiada, por la gran abundancia de alimentos disponibles, paradójicamente nos encontramos también con el problema de la elección de los mismos para componer una dietaadecuada (Urango-Marchena *et al*., 2009).

En España se han propuesto numerosos programas de hábitos saludables haciendo referencia a la dieta y a la alimentación, diseñando la Estrategia NAOS, *Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad*, que tiene como finalidad mejorar los hábitos alimentarios e impulsar la práctica regular de la actividad física de todos los ciudadanos, poniendo especial atención en la prevención durante la etapa infantil.

Se ha demostrado de forma reiterada y consistente que las dietas que mejor se adaptan a los objetivos de dieta saludable son aquellas que se basan principalmente en el consumo de alimentos de origen vegetal (frutas, hortalizas, cereales integrales, frutos secos y legumbres), utilizando con moderación los alimentos de origen animal tal y como se describe en el modelo de Dieta Mediterránea.

Valor nutricional de los cítricos

La calidad nutritiva de los productos vegetales y en particular de los cítricos depende de la cantidad y calidad de los macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) y micronutrientes (vitaminas, elementos minerales, ácidos grasos y aminoácidos esenciales), además de proporcionar compuestos bioactivos que presentan un mecanismo de acción complementario y/o superpuesto, como la modulación de enzimas detoxificantes, estimulación del sistema inmune, reducción de la agregación plaquetaria, modulación de la síntesis de colesterol y del metabolismo hormonal, reducción de la presión sanguínea, efectos antioxidantes, antimicrobianos, etc. (FECYT, 2005; Cámara, 2006; Dissanayake, 2015).

Numerosos estudios epidemiológicos constituyen una fuente importante de datos que evidencian la relación existente entre el consumo de frutas y verduras y el bajo riesgo de inducción de numerosas patologías y procesos cancerígenos (Cámara *et al*., 2003; Herrera, *et al*, 2013). El consumo abundante de frutas y verduras tiene al menos dos aspectos muy importantes en la alimentación: riqueza en compuestos bioactivos antioxidantes y en fibra, con independencia de su bajo contenido calórico (Álvarez-Sala *et al*., 1996).

De modo que, el consumo de cítricos en la dieta, adquiere mayor interés debido a su alto contenido en agua y bajo aporte calórico, a expensas básicamente de los hidratos de carbono, y con escaso contenido en lípidos y proteínas. En la siguiente tabla (**Tabla 1.3**) se muestra la composición nutricional de los principales cítricos consumidos en España, como son la naranja, mandarina, limón y pomelo.

Atendiendo a la calidad interna de estas frutas, los **azúcares solubles y ácidos orgánicos**, son los principales compuestos responsables de dotar a estas frutas sus principales características organolépticas, por su naturaleza y su concentración condicionan en gran medida a las características de sabor, aroma y color entre otros, es decir, su calidad organoléptica (Albertini *et al*., 2006; Letaief, 2015).

Tabla 1.3. Valor nutricional de los principales cítricos consumidos en España, por 100 g de porción comestible (Souci, 2008; Moreiras *et al*., 2013; USDA, 2016;)

Valor Nutricional de cítricos de 100 g de porción comestible				
	Naranja	**Mandarina**	**Limón**	**Pomelo**
Calorías (Kcal/100g)	41	46	36	39
Agua (g)	85,7	86,7	90,2	89
Hidratos de carbono (g)	8	10,1	3,2	7,4
Proteínas (g)	1	0,7	0,7	0,6
Grasa (g)	0,2	0,3	0,6	0,2
Fibra (g)	2,2	1,8	1,6	0,6
Sales minerales (g)	0,5	0,7	0,5	0,4
Sodio (mg)	1	1	3	2
Potasio (mg)	175	210	150	180
Magnesio (mg)	14	11	30	10
Calcio (mg)	40	35	11	18
Hierro (µg)	400	300	450	340
Cobre (µg)	65	90	350	40
Cinc (µg)	100	80	120	170
Vitamina C (mg)	50	30	55	44
Vitamina E (µg)	240	200	150	250
Vitamina A (UI)	250	681	6	35
Carotenoides (µg)	90	340	15	15
Ácidos Orgánicos (g)	1,2	-	4,9	1,6
Ácido Cítrico (mg)	1060	1690	4920	1370
Ácido Málico (mg)	160	-	200	180
Ácido Palmítico (mg)	20	30	60	35
Ácido Oleico (mg)	45	45	20	25
Ácido Linoleico (mg)	50	45	120	40
Ácido Linolénico (mg)	30	15	60	12

Los cítricos, además, contienen bajos contenidos en **grasa**, sin embargo, analizando su perfil lipídico encontramos ácidos grasos pertenecientes a las familias de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). A estos últimos pertenecen el ácido α - linolénico (ALA, C18:3n3) y ácido linoleico (AL, C18:2n6), pertenecientes al grupo de ácidos grasos esenciales denominados omega-3 y omega-6, respectivamente, los cuales no se pueden sintetizar en el organismo y deben ser adquiridos a través de la dieta (Lands, 2014).

Se ha demostrado que una ingesta adecuada de estos ácidos grasos esenciales, puede contribuir a reducir la prevalencia de enfermedades como el asma, pudiendo también prevenir enfermedades cardiovasculares además de poseer propiedades antiinflamatorias (Barceló-Coblijn y Murphy, 2009). Estos ácidos grasos poliinsaturados parecen mejorar significativamente o prevenir la mortalidad a causa de diversas enfermedades degenerativas, particularmente las cerebrales y del sistema cardiovascular (Plourde y Cunnane, 2007; Deckelbaum y Torrejón, 2012), de modo que su ingesta podría reducir el daño por accidente cerebrovascular, como lo es la pérdida de control motor, mejorando el aprendizaje espacial y la memoria (Bourourou *et al*., 2016).

Además, los cítricos se caracterizan por sus relevantes valores en **fibra dietética**. La fibra es la parte de frutas y verduras, legumbres, cereales, etc., que no se digiere, existen diferentes tipos y/o definiciones de fibra, dentro de sus propiedades físico-químicas, particularmente atendiendo a su solubilidad puede ser *fibra soluble* (destacando los cítricos, salvado de avena, guisantes, alubias, manzana, zanahorias, etc.) que forma una especie de mucílago con propiedades reductoras del colesterol plasmático, y de control de los niveles de glucosa en sangre, o *fibra insoluble* (contenida en el salvado de cereales, nueces, coliflor, judías verdes, verduras de hoja verde, patatas, etc.), que aumenta la velocidad de tránsito gastrointestinal y el volumen de las heces, limpiando la pared intestinal.

Muchos alimentos tienen proporciones variables de ambos tipos de fibra (Matos-Chamorro *et al*., 2010). Particularmente, los cítricos son frutas que destacan por su elevado contenido en fibra soluble, un ejemplo son la mandarina y naranja, con contenidos de 1,6 y 2,2 g/100g, respectivamente (Li-Ying *et al*., 2008).

Las recomendaciones en la dieta de fibra vienen determinadas por diferentes organismos oficiales. Por un lado, el Comité Científico Europeo sobre Alimentación Humana (Scientific

Committee on Food-EU, SFC), es uno de los comités que proporcionan consejo científico sobre seguridad alimentaria a la Comisión Europea, formado por científicos independientes, fue creado en noviembre de 1974, y transferido a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en mayo de 2003. Dicho Comité definió en 1992 la **Ingesta de Referencia para la Población** (IRP) para determinados macro y micronutrientes, como vitaminas y minerales, pero no incluía ciertas sustancias de importancia fisiológica, como por ejemplo la fibra dietética.

La Comisión Europea pidió a la EFSA que revisara y actualizara los valores de referencia para las ingestas de nutrientes y energía establecidas en 1993 por el Comité científico de la alimentación humana. Al hacerlo, la EFSA tuvo en cuenta las nuevas evidencias científicas y recientes recomendaciones emitidas a escala nacional e internacional, estableciendo los **valores dietéticos de referencia** (VDR) para la ingesta de nutrientes, tales como hidratos de carbono, fibra, grasas y agua (EFSA, 2010).

En este sentido, se establece una ingesta diaria de 25 gramos de fibra dietética como valor dietético de referencia (VDR) en adultos para una adecuada función intestinal. Además, la evidencia científica en adultos, muestra que hay beneficios para la salud asociados con un consumo por encima de 25 g de fibra dietética por día, puesto que puede reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiacas y diabetes tipo 2 y, además, puede ayudar en el control y el mantenimiento del peso corporal. Esta recomendación se puede traducir en directrices dietéticas basadas en alimentos, por ejemplo, la recomendación de un consumo regular de frutas y verduras (Reglamento 1169/2011)

Por otro lado, la *Food and Nutrition Board*, organismo americano fundado en 1940, estudia cuestiones de importancia nacional y mundial sobre la seguridad y adecuación del suministro de alimentos de los Estados Unidos. Establece principios y directrices para una buena nutrición y proporciona un juicio con autoridad sobre las relaciones entre la ingesta de alimentos, la nutrición, el mantenimiento de la salud y la prevención de enfermedades. Según la *Food and Nutrition Board*, la Ingesta Adecuada (abreviado como IA) se trata de una recomendación, al igual que en el caso de Europa, debido a la falta a día de hoy de suficiente evidencia científica. Se expresa según diferentes segmentos de población basado en el sexo y la edad, además está modificada para situaciones especiales como el embarazo y la

lactancia. Esta ingesta adecuada está diseñada para cubrir los requerimientos nutricionales de prácticamente todas las personas sanas (Trumbo *et al*., 2002).

El *Food and Nutrition Board* elaboró unas tablas en las que aparecen dichos datos de ingesta adecuada (IA) para la fibra. Atendiendo a los diferentes grupos de individuos en base a su edad, se recomienda que para niños en edades comprendidas entre 1 y 8 años, los valores recomendados están entre 18 − 25 gramos/día. En adultos en la franja de edad de 14 a 50 años, el consumo de fibra al día se encuentra en 38 gramos para los hombres y 25 gramos para las mujeres, y para adultos mayores de 50 años, el consumo de fibra para hombres se sitúa en 30 gramos por día, y en mujeres 21 gramos por día (Trumbo *et al*., 2002). Atendiendo a estos datos, la ingesta de cítricos como la naranja y la mandarina suponen un aporte de fibra importante a la dieta de forma natural.

En lo que se refiere a su **contenido mineral**, los cítricos en general son ricos en potasio, además de aportar calcio y magnesio en menores proporciones y un bajo contenido en sodio (ver **Tabla 1.1**). Estos minerales como el potasio, están involucrados en el mantenimiento del equilibrio osmótico entre las células y el fluido intersticial, además del equilibrio ácido-base, determinado por el pH del organismo (Campbell, 1987). El potasio también está involucrado en la contracción muscular y la regulación de la actividad neuromuscular, al participar en la transmisión del impulso nervioso a través de los potenciales de acción del organismo humano. Así mismo, promueve el desarrollo celular y en parte es almacenado a nivel muscular, por lo tanto, si el músculo está en formación (periodos de crecimiento y desarrollo) es esencial un adecuado abastecimiento de potasio (Lockless *et al*., 2008).

Muchos de los organismos, instituciones y comités nacionales e internacionales, como los ya mencionados anteriormente, así como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO / OMS) entre otros, han establecido recomendaciones nutricionales de la ingesta diaria de minerales (Cuervo *et al*., 2009).

El Parlamento Europeo y el Consejo (2011), mediante el Reglamento 1169/2011, también han establecido valores de referencia de nutrientes (NRV) para el etiquetado de los alimentos. En este sentido, algunas de las recomendaciones y valores de referencia más aceptados en países mediterráneos para la ingesta de elementos minerales se muestran en la **Tabla 1.4**.

Table 4. Ingesta recomendada de elementos minerales (mg / día) para adultos

	Recomendaciones Internacionales			Recomendaciones Nacionales	
	FAO/OMS, RNI[1]	**EU, PRI[2]**	**UE, NRV[3]**	**España, IR[4]**	**E.E.U.U., DRI (RDA)[5]**
K					
Hombres		3100	2000	3500	
Mujeres					
P					
Hombres		550		700	700
Mujeres					700
Ca					
Hombres	1000-1300	700	800	800	1000-1200[6]
Mujeres				800	
Mg					
Hombres	230-260		375	350	400-420
Mujeres	190-220			300-330	310-320
Fe					
Hombres	9-27[7]	9	14	10	8
Mujeres	8-59[7,8]	20		10-18[8]	8-18[8]
Mn					
Hombres			2		2.3[6]
Mujeres					1.8[6]
Zn					
Hombres	4.2-14	9,5	10	15	11
Mujeres	3-9.8	7			0.9
Cu					
Hombres		1,1	1		
Mujeres					

[1] RNI= Ingesta recomendada de nutrientes (FAO / OMS, 2002); [2] PRI= Ingesta de referencia de la Población (SCF, 1992); [3] NRV= Valores de Referencia de Nutrientes, Reglamento UE 1169/2011; [4] IR = Ingestas Recomendadas (Moreiras *et al*., 2013); [5] DRI= Ingesta dietética de referencia; RDA = Dietas Recomendadas, FNB (Trumbo *et al*., 2002); [6]Ingesta adecuada (no hay evidencia suficiente para establecer RDA); [7] Dependiendo de la biodisponibilidad. [8]Se recomiendan valores más elevados para las mujeres en edad fértil; Después de los requisitos de la menopausia son similares para los hombres y las mujeres. Adaptado de García-Herrera y Sánhez-mata, 2016.

Principales Compuestos Bioactivos en cítricos

Tal y como se ha comentado anteriormente, hoy se sabe que los beneficios de una dieta prudente no se limitan a su contenido en nutrientes, sino que también tiene que aportar otros factores de protección frente al estrés oxidativo y a la carcinogénesis, los cuales los encontramos especialmente en los alimentos de origen vegetal, los denominados **compuestos bioactivos** (Carbajal *et al*., 2001).

Particularmente los cítricos, constituyen una fuente importante de substancias fisiológicamente activas (Gil-Izquierdo, A., *et al*, 2002) que cumplen, al igual que los nutrientes esenciales, una función beneficiosa para la salud y contribuyen a reducir la incidencia de ciertas enfermedades crónicas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, anemia, malformaciones congénitas y cataratas (Rojas-Argudo, C. *et al*, 2007; Economos, C. FAO, 1999). El consumo de cítricos se ha relacionado en numerosas ocasiones de manera inversamente proporcional con varias enfermedades (Joshipura *et al*., 2001). Existen numerosos estudios en los cuáles se ha analizado esta relación. Por ejemplo, Knekt *et al*. (2002) pusieron de manifiesto que la ingesta de naranja redujo la incidencia de asma en Finlandia. También se ha descubierto que los extractos de cítricos tienen actividades tales como actividades antiinflamatorias, antitumorales, antifúngicas y de inhibición de la formación de coágulos sanguíneos (Middleton y Kandaswami, 1994, Olson, 1988; Yehoshua, Rodov, Fang, & Kim, 1995). También parece ser que su consumo está asociado con un menor riesgo de padecer cáncer colorrectal, de esófago, de estómago y accidente cerebrovascular (Trípoli *et al*., 2007; Letaief, 2015).

Los compuestos bioactivos se caracterizan por su ubicuidad en el reino vegetal y generalmente se encuentran agrupados en los alimentos y sólo en raras ocasiones un determinado compuesto bioactivo se localiza específicamente en un pequeño grupo o familia vegetal (de ahí la importancia del consumo variado en la dieta, Williamson, 1996). La presente tesis doctoral se centra en la importancia de los **cítricos** en la dieta, los cuales constituyen una fuente importante de estos constituyentes, entre los que cabe destacar los ácidos orgánicos, las vitaminas C (ácido ascórbico), A (carotenoides) y E (tocoferoles), así como flavonoides, y otros compuestos bioactivos (Gil-Izquierdo *et al*., 2002).

Es importante mencionar el papel de los ácidos orgánicos dentro de los compuesos biológicamente activos, ya que se encuentran en los cítricos en cantidades elevadas y además algunos de ellos presentan actividad antioxidante. Los principales ácidos orgánicos presentes en los cítricos son el ácido cítrico y málico, siendo el ácido cítrico el mayoritario, el cual potencia la acción de la vitamina C.

El **ácido cítrico** (AC), ha sido descrito como uno de los ácidos orgánicos mayoritarios en frutas y particularmente en cítricos (el limón contiene aproximadamente entre 7 − 9 %; naranjas y mandarinas 0,6 − 1,5 %). Desde el punto de vista bioquímico, el ácido cítrico es sumamente importante, teniendo en cuenta que, a través de una serie de reacciones enzimáticas, el llamado Ciclo de Krebs o ciclo del ácido tricarboxílico (**Figura 1.21**), los seres humanos y los animales producen ácido cítrico para generar energía mediante la oxidación de grasas, proteínas y carbohidratos. Además, los iones citrato pueden encontrarse en muchas situaciones ambientales naturales (plantas, raíces, hojas) y tienen tendencia a acumularse y estar presentes en organismos vivos, aguas naturales y suelos variados (Apelblat, 2014).

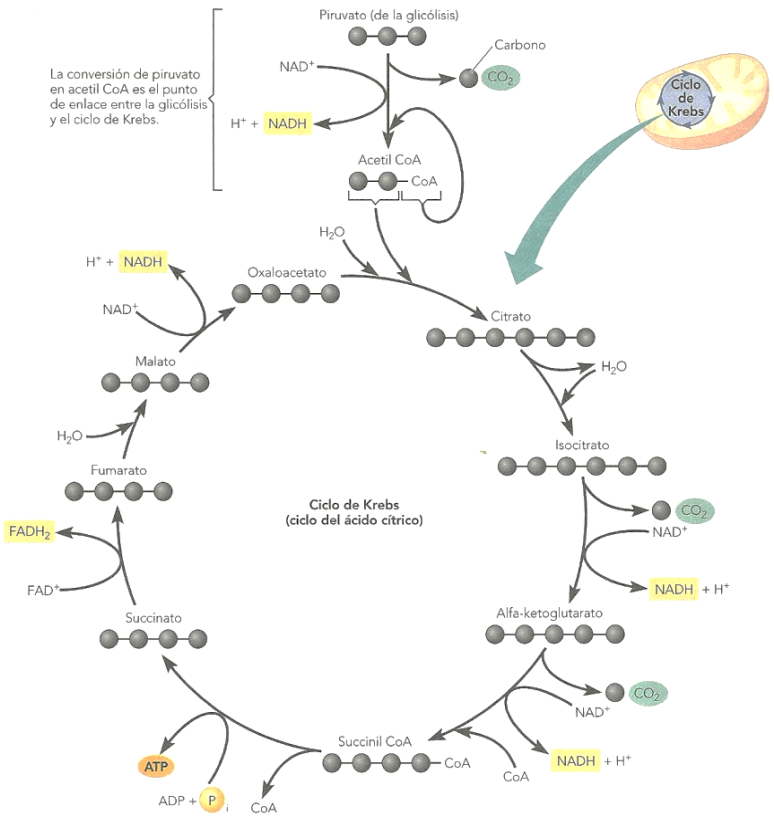


Figura 1.21. Ciclo de Krebs. Adaptado de Mthews y Van Holde, 2000

Respecto a los micronutrientes, las vitaminas son un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos esenciales para el crecimiento y mantenimiento de la vida animal. La mayoría de las cuales no son sintetizadas en el cuerpo, teniendo que consumirlas a través de la dieta, están presentes en cantidades muy pequeñas dentro de los alimentos de origen animal y vegetal, siendo necesarias en bajas concentraciones. Su condición de esencial depende de la tasa de crecimiento del organismo, la composición del alimento y la capacidad de síntesis de la población bacteriana localizada en el tracto gastrointestinal. En general, la carencia de alguna vitamina en la dieta provoca distintos signos morfológicos y fisiológicos por deficiencia (Hernández y Sastre, 1999).

Las vitaminas pueden clasificarse en dos grandes grupos, atendiendo a su solubilidad: vitaminas hidrosolubles y vitaminas liposolubles.

Como su propio nombre indica, las **vitaminas hidrosolubles** son aquellas que son solubles en agua y no son almacenadas en cantidades significativas, ya que se excretan a través de la orina. Así, en ausencia de un suministro regular de vitaminas hidrosolubles, las reservas corporales son rápidamente agotadas, siendo muy improbable el desarrollo de hipervitaminosis debido a este grupo de vitaminas. Dentro de las vitaminas hidrosolubles, destaca la vitamina C como la más abundante en frutos cítricos. Por el contrario, las **vitaminas liposolubles** son absorbidas en el tracto gastrointestinal en presencia de grasas, y pueden ser almacenadas en las reservas lipídicas corporales e hígado, siempre y cuando la ingesta en la dieta exceda las demandas metabólicas. La acumulación de vitaminas liposolubles en el cuerpo aumenta conforme se incrementa su ingesta en la dieta, hasta un punto en que puede presentarse una condición de toxicidad, llamada hipervitaminosis. Las vitaminas liposolubles más importantes presentes en los cítricos son las vitaminas A y E (Pamplona, 2003).

El término **vitamina C**, vitamina hidrosoluble, hace referencia a dos compuestos, ácido L-ascórbico (AA) y su forma oxidada, ácido L-dehidroascórbico (ADHA). La forma reducida (ácido *L*–ascórbico y su monoanión ascorbato), es la más interesante, puesto que es la forma más estable en los tejidos biológicos interviniendo en muchas reacciones del metabolismo y a la que se le atribuye actividad antioxidante (Morales *et al*, 2015).

El ácido ascórbico es una cetolactona de 6 carbonos, estable en estado sólido pero que en disolución se oxida fácilmente a ácido dehidroascórbico (**Figura 1.22**), el cual es muy susceptible químicamente a la oxidación durante los procesos de almacenamiento y cocinado de los alimentos (Ball, 2006; Romero *et al*. 2013; Carocho *et al*., 2012).

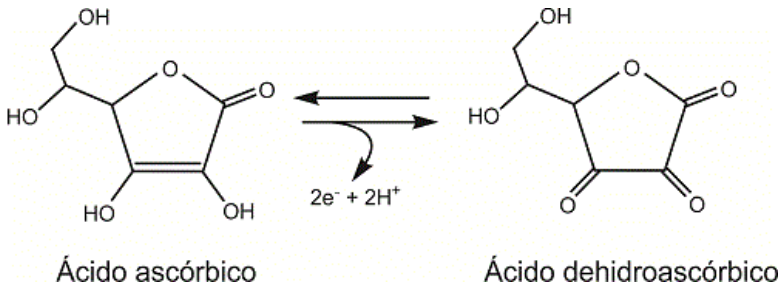


Figura 1.22. Mecanismo químico reversible de la oxidación del ácido ascórbico en dehidroascórbico. Adaptado de Kivirikko, 1989.

La especie humana y el resto de los primates, además de otros pocos animales, no pueden sintetizar esta sustancia, por lo que para ellos es una vitamina, teniendo que consumirse obligatoriamente a través de la dieta (Soto, 2005; Li-Ying *et al*., 2008). Por ello, su consumo en tan importante, puesto que es esencial para el desarrollo y mantenimiento del organismo (Cámara *et al*., 2003).

Su carencia produce muchos trastornos del sistema mecánico, especialmente el desarrollo del escorbuto, una enfermedad que se conoce desde el siglo XVI cuyo principal síntoma son las frecuentes hemorragias, producidas a consecuencia de un reblandecimiento de las estructuras de colágeno (Vázquez-Martínez *et al*., 2005). Se da la circunstancia que la cobaya, un animal muy utilizado en el laboratorio, es uno de esos animales que no pueden sintetizar ácido ascórbico, por lo que ha resultado ser un buen modelo experimental para estudiar la carencia de vitamina C y su relación con el escorbuto (Ball, 2006).

Por otro lado, la vitamina C actúa a nivel celular como coenzima eventual, además de ser un gran agente reductor, interviniendo como fuente de electrones para que se produzca la reducción del oxígeno, o como agente protector antioxidante para mantener el estado reducido de los iones, hierro y cobre, ya que facilita la absorción del Fe no hemo que puede prevenir la aparición de anemia. Así mismo, evita la oxidación del ácido fólico y sus sales,

así como la formación de nitrosaminas carcinógenas, mediante la reducción de nitritos, lo que le podría conferir cierto papel protector frente al desarrollo de ciertos tumores (Vázquez-Martínez *et al*., 2005; Ball, 2006). Además, es efectiva en la prevención y tratamiento de la arteriosclerosis (Gey *et al*., 1993; Wills, 1985).

La vitamina C abunda en los frutos cítricos como la naranja (50 mg/100g de porción comestible), la mandarina (30 mg/100g), el limón (55 mg/100g) y el pomelo (44 mg/100g). Actualmente, la ingesta diaria recomendada (IDR) de vitamina C en España está en torno a 75 − 90 mg/día, en función de las diferentes situaciones fisiológicas del individuo (Cámara *et al*., 2003). Además, teniendo en cuenta la legislación actual, el Reglamento 1169/2011 (UE) del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor en relación al etiquetado de los alimentos, se indica que el valor de referencia de nutriente para la vitamina C debe ser 80 mg/día.

Los cítricos son ricos en **carotenoides**, tales como el β-caroteno presente especialmente en la mandarina y naranja, que además de su función como nutriente por su actividad **pro-vitamina A**, y que se transforma en ésta a medida que nuestro organismo lo necesite, también es importante su actividad biológica, que de la misma manera que la **vitamina C** cumple una gran función como agente antioxidante (Belitz y Grosch, 1997; Ding *et al*., 2012; Turner y Burri, 2013).

Los carotenoides son un grupo de pigmentos liposolubles de origen vegetal que son sintetizados por las plantas y algunos microorganismos, pero no pueden ser sintetizados por el propio organismo (Rao y Rao, 2007), por lo que se obtienen a partir de la dieta, fundamentalmente por el consumo de frutas y hortalizas. Están ampliamente distribuidos en el Reino Vegetal, donde desempeñan diversas funciones (Fraser y Bramley, 2004) como por ejemplo su papel en la coloración naranja, amarillo, rojo y púrpura de frutos y flores (Burns y col., 2003) que es primordial para atraer a animales (insectos, aves y mamíferos) que actúan como vehículos en la dispersión de semillas y polen (Britton y Hornero-Mendez, 1997; Howitt y Pogson, 2006).

En este sentido, los carotenoides son responsables de los colores tan característicos de frutas, hortalizas e incluso de algunos mariscos (Jaswir *et al*., 2011), incluyen β-caroteno, luteína,

zeaxantina y licopeno, este último es responsable del color rojo de los tomates, sandia, papaya, pomelo rosa y la guayaba rosa (Gülçin, 2012).

Por otro lado, participan en el proceso de fotosíntesis, ya que su espectro de absorción captura fotones que escapan al alcance de las clorofilas. Además, protegen la maquinaria fotosintética de las especies reactivas generadas durante la captura de la energía luminosa, protegiendo a la planta del daño de la luz (Bartley y Scolnik, 1995; Delgado-Vargas y col., 2000; Rao y Rao, 2007; Gülçin, 2012).

Desde el punto de vista químico, la mayoría de los carotenoides son tetraterpenoides, cuya estructura base es el licopeno. Son compuestos formados por una cadena larga de 40 átomos de carbono (C-40) formados por ocho unidades isoprenoides y un sistema conjugado de dobles enlaces el cual es el grupo cromóforo responsable de su gran capacidad colorante (Olmedilla *et al*., 2001a; Meléndez-Martínez *et al*., 2007a).

La ciclación del licopeno en un extremo conduce al γ-caroteno, mientras que la ciclación en ambos extremos produce el β-caroteno (**Figura 1.23**). Otros isómeros del β-caroteno (α y γ-caroteno) sólo difieren en la posición de los dobles enlaces en las unidades cíclicas terminales (Britton, 1995; Weedon y Moss, 1995¸ Lock, 1997;).

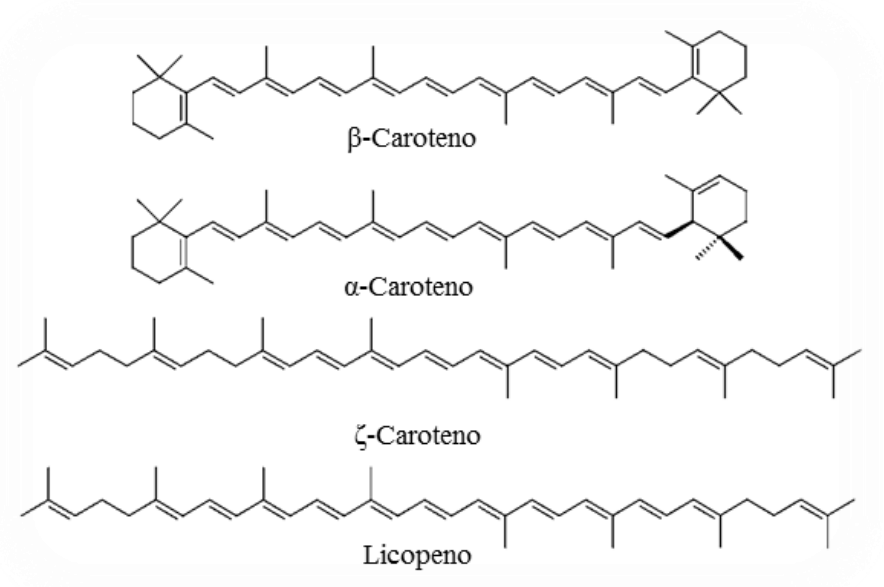


Figura 1.23. Estructura molecular de carotenos encontrados comúnmente en frutos y vegetales

Hasta el momento han sido aislados y caracterizados más de 600 carotenoides que, atendiendo a su composición química, se pueden dividir en dos grupos: carotenos o compuestos hidrocarbonados (α-caroteno, β-caroteno, licopeno) y xantofilas u oxicarotenos, que presentan oxígeno en su estructura (luteína, zeaxantina, β-criptoxantina) tal y como se puede observar en la **Figura 1.24**. A los cuales hay que unir los apocarotenoides, de tamaño menor, formados por la ruptura de los carotenoides típicos. Con respecto a su identificación, los espectros en la región visible de los carotenoides son muy característicos entre 400 y 500 nm (Robinson *et al*., 1991; Mínguez-Mosquera *et al*., 1997; Olmedilla *et al*., 2001a).

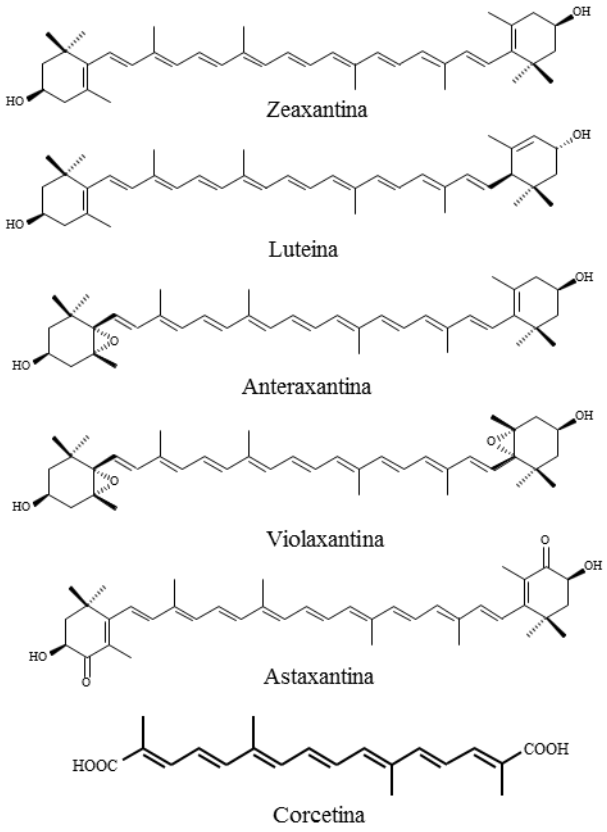


Figura 1.24. Estructura molecular de xantofilas encontradas comúnmente en frutos y vegetales. Adaptación de Rao y Rao, 2007

Este elevado número de dobles enlaces conjugados presentes en la estructura de los carotenoides posibilita la formación de isómeros geométricos (*Z/E*, tambien llamados *cis*/*trans*). Habitualmente, la forma más abundante en la naturaleza es el isómero *E* o *trans*, ya que es el isómero más estable termodinámicamente (vonDoering *et al*., 1995). Sin embargo, isómeros *Z* o *cis* han sido identificados en los tejidos que contienen clorofila

(Humphries y Khachick, 2003), y también en frutas como nectarina y melocotón (Godoy y Rodríguez-Amaya, 1994) y en algunas variedades de tomate (Britton y Hornero-Méndez, 1997). Además de su origen natural en las plantas, tambien se ha demostrado la formación de isómeros *cis* como consecuencia de procesado de alimentos (Schieber y Carle, 2005).

Dicha presencia de un gran número de dobles enlaces hace a los carotenoides muy sensibles a la oxidación, especialmente en reacciones de foto-oxidación, inducidas por la presencia de luz y/o calor. También se oxidan en presencia de enzimas lipoxigenasas, pero no de forma directa, sino por reacción con los hidroperóxidos. Estas reacciones de oxidación dan lugar en todos los casos a la pérdida de color y de actividad antioxidante (Robinson *et al*., 1991).

Sus propiedades antioxidantes precisamente derivan de su estructura química, pudiendo actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno, neutralizadores del oxígeno singlete, neutralizadores del radical superóxido e incluso quelantes de metales (Carocho y Ferreira, 2012). El mecanismo de acción como neutralizadores del oxígeno singlete, consiste en que éste le transfiere energía al β-caroteno produciéndose un β-caroteno a un estado triplete que se relaja perdiendo la energía en forma de calor. Los carotenoides son neutralizadores muy eficaces, así una molécula de β-caroteno es capaz de extinguir 1000 moléculas de oxígeno singlete (Reische *et al*., 2002).

Desde el punto de vista nutricional y fisiológico, el interés de los carotenoides se ha debido a su actividad pro-vitamínica A, ya que constituyen la principal fuente de vitamina A (Isler 1971; Simpson, 1983; Granado y col., 1992). Se ha establecido que el 60 % de la ingesta de vitamina A en nuestra dieta proviene de los carotenoides.

De los más de 600 carotenoides identificados (Britton, 2004), solamente 40 − 50 especies juegan un papel importante en la dieta humana (Kachick y col., 1997) al ser considerados como nutrientes, alrededor del 10 % tienen valor como provitamina A, además del β - caroteno, destacan el α - caroteno y γ - caroteno, así como la α - criptoxantina y β - criptoxantina, que exhiben actividad de pro-vitamina A, tras su metabolización a retinol en el organismo (Bouayed y Bohn, 2012).

Se conoce bien la importancia de la **vitamina A** como factor esencial para el normal desarrollo y crecimiento. El estudio del ojo y sus patologías asociadas, así como las

investigaciones sobre el valor nutricional de las grasas, fueron las dos rutas diferentes que condujeron al descubrimiento de esta vitamina.

En 1909, un investigador alemán, Stepp descubrió que en la yema del huevo existía una sustancia soluble esencial para el mantenimiento de la vida. En 1913, E. V. McCollum y Marguerite David demostraron un factor de crecimiento esencial para las ratas en la mantequilla y en la yema de huevo, introduciendo el término de "sustancia liposoluble A" para este factor y posteriormente en 1924 Drummond denominó a esta sustancia como vitamina A. Además, fue la primera vez que se observó que los extractos amarillos de la planta ricos en carotenos tenían actividad vitamínica A, aunque la explicación no llego hasta años más tarde (1929), al descubrirse que en ratas de laboratorio el β-caroteno se convertía en vitamina A. La estrecha relación entre esta vitamina y los grupos carotenoides se reveló cuando se determinó la forma estructural de ambos. No fue hasta 1930 cuando Karrer y su grupo en Suiza determinaron la estructura química de la vitamina A y el β-caroteno, aunque los carotenos ya habían sido extraídos y cristalizados de zanahorias en el año 1831 por Wakenroder. Posteriormente, la vitamina A fue aislada por Morton en el año1937 y la actividad biológica del ácido retinoico fue descubierta en el año 1946. Wald (1934-1935) aisló por primera vez el retinal (retinaldehído) de la retina y demostró que estaba implicado en el proceso de la visión (Hernández *et al*., 1999; Ball, 2006).

En la naturaleza, la vitamina A puede encontrarse en tres estados de oxidación diferentes como resultado de la unión de 4 unidades de isopreno: alcohol (retinol), aldehído (retinal) y ácido (ácido retinoico) (**Figura 1.25**).

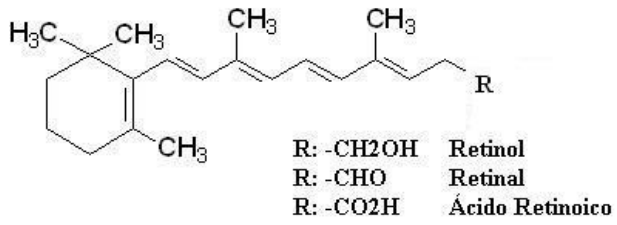


Figura 1.25. Estructura química de la Vitamina A.

En caso de carencia de esta vitamina en la alimentación, pueden desarrollarse enfermedades de las mucosas, alteraciones de las glándulas sebáceas y gástricas que tienen como resultado inhibición del crecimiento y riesgo elevado de infección. En el proceso visual la vitamina A

actúa en forma de retinal, que constituye un cofactor del pigmento rodopsina. También actúan como antioxidantes y secuestrantes de radicales libres durante el proceso de estrés oxidativo (Baltes, 2006).

Varios de los carotenoides más comunes, como el licopeno, zeaxantina y luteína no presentan actividad provitamina A, aunque son muy importantes como pigmentos y pueden tener también actividad como antioxidantes (Robinson *et al*., 1991).

Las frutas y verduras como naranjas, sandías, zanahorias, tomates y pimientos, son importantes fuentes mayoritarias de carotenoides en la dieta (Granado *et al*., 2007; Meléndez-Martínez *et al*., 2007b). Según los datos recopilados en la literatura (**Tabla 1.5**), el licopeno es especialmente abundante en el pomelo, la luteína y β-caroteno en la mandarina y naranja y la zeaxantina en todos los cítricos en general (Ball 2006; Souci *et al*. 2008; ASOZUMOS, 2011).

Tabla 1.5. Contenido en carotenoides de frutas cítricas encontrado en la literatura

CÍTRICO	α-caroteno (µg/100g)	β-caroteno (µg/100g)	Licopeno (µg/100g)	Luteína (µg/100g)	Zeaxantina (µg/100g)	β-criptoxantina (µg/100g)	Referencias
Naranja	19 − 21	130	-	27	-	149	Baghurst, *et al*., 2003; Souci *et al*., 2008
Mandarina	12 − 20	87	-	20 − 50	142	70 − 1774	West *et al*., 1993; Baghurst, *et al*., 2003; Souci *et al*., 2008
Pomelo	9-12	25	nd − 350	9,5	69	-	Biehler *et al*., 2001; West *et al*., 1993; Baghurst, *et al*., 2003; Souci *et al*., 2008
Limón	-	10	-	12	1	14	West *et al*., 1993; Baghurst, *et al*., 2003¸ Souci *et al*., 2008
Lima	1	31	-	-	-	-	West *et al*., 1993; Baghurst, *et al*., 2003; Souci *et al*., 2008

En las últimas décadas, el hallazgo de otras actividades biológicas atribuidas a estos compuestos y la relación con la incidencia de ciertas enfermedades crónicas (cardiovasculares, cáncer, cataratas, maculopatía senil, entre otras) ha aumentado el interés por estos compuestos (Slattery *et al*., 2000; Landrum y Bone, 2001; Olmedilla *et al*., 2001b

Johnson y Krinsky, 2009; Rock, 2009). Los carotenoides, se han descrito como antioxidantes liposolubles (Yeum *et al*., 2009), protectores de la degeneración macular (Ahmed *et al*., 2005), salud ósea (Sugiura *et al*., 2011), potentes reguladores inmunológicos (Fernández-García *et al*., 2012) y agentes anticancerígenos (Gilbert *et al*., 1996; Chatterjee *et al*., 2012).

El licopeno, presente exclusivamente en algunas naranjas sanguinas o pigmentadas como Cara Cara, ha sido el único carotenoide que en un amplio estudio epidemiológico se asoció inversamente con el cáncer de próstata. Se han realizado numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* sobre el crecimiento de células tumorales en los que se ha visto que el licopeno inhibe la proliferación de varias series celulares de cánceres en humanos estimuladas por medio del factor IGF-1, y que por tanto apoyarían esa asociación epidemiológica. Sin embargo, la situación con el β-caroteno es muy distinta. en combinación con otras sustancias (retinol, α-tocoferol, aspirina), aumenta la mortalidad total y determinados tipos de cáncer en personas con un estado nutricional adecuado y con factores de riesgo, como son los fumadores empedernidos y trabajadores muy expuestos a la contaminación. No obstante, los datos actuales sugieren que la suplementación con β-caroteno no ejerce ningún efecto beneficioso sobre la incidencia de los principales tipos de cáncer en los países industrializados, aunque sí puede reducir lesiones precancerosas en otros tipos menos frecuentes (cuello uterino y cavidad oral) (Olmedilla *et al*., 2001b).

Por último, el termino de **vitamina E** se le da a una familia compuesta de 8 substancias similares que existen en la naturaleza con diferente actividad biológica, son derivados metilados del tocol, formado por un anillo 6-cromanol unido en posición C_2 a una cadena lateral saturada isoprenoide, dando lugar a los cuatro tocoferoles (α, β, γ y δ tocoferol) mientras que los tocotrienoles (α, β, γ y δ tocotrienol), se diferencian porque tienen tres instauraciones *trans* en la cadena lateral (Coultate, 1984; Ball, 2005). Las estructuras químicas se muestran en la **Figura 1.26**.

En 1922, Evans y Bishop publicaron la existencia de un nuevo factor nutricional, inicialmente denominado factor X, el cual prevenía la muerte fetal y atrofia. Años más tarde, Evans adoptó el nombre vitamina E para este nuevo factor, pero no fue hasta cuarenta años más tarde cuando se demostró que el edema y la hemólisis del recién nacido estaban relacionados con la deficiencia vitamina E. En los últimos quince años se ha definido su papel esencial para un desarrollo normal y mantenimiento del sistema nervioso central,

nervios periféricos y músculos de niños y adultos. Con respecto a la estabilidad, en ausencia de O_2, los tocoferoles tienen una estabilidad elevada al calor, la luz y sustancias alcalinas, mientras que en presencia de O_2 pierden sus propiedades antioxidantes (Ball, 2006).

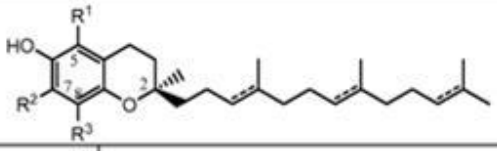
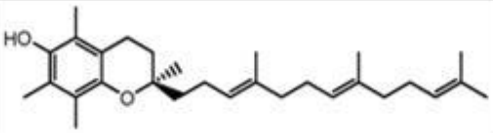
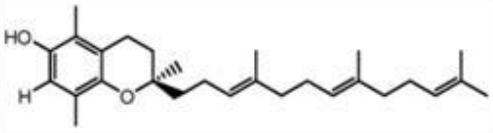
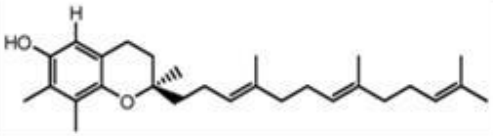
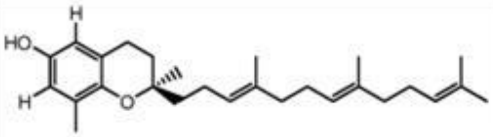
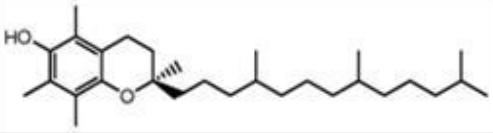
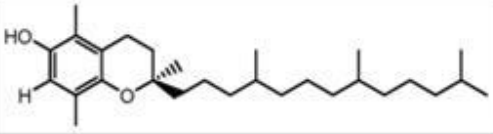
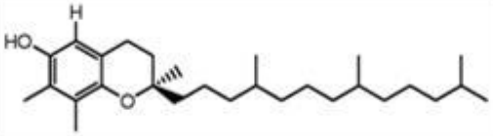
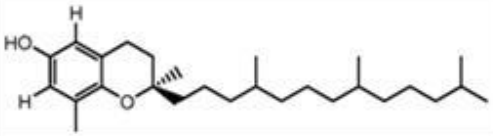
		R^1	R^2	R^3
				
Alfa - tocotrienol		metil	metil	metil
Beta - tocotrienol		metil	H	metil
Gamma - tocotrienol		H	metil	metil
Delta - tocotrienol		H	H	metil
Alfa - tocoferol		metil	metil	metil
Beta - tocoferol		metil	H	metil
Gamma - tocoferol		H	metil	metil
Delta - tocoferol		H	H	metil

Figura 1.26. Estructuras químicas de α, β, γ y δ tocoferol y α, β, γ y δ tocotrienol. Adaptación Kamal-Eldin, 1996.

Como se ha mencionado anteriormente, la vitamina E es el término utilizado para designar a un grupo de potentes antioxidantes liposolubles, tocoferoles y tocotrienoles. Debido a las

potentes propiedades antioxidantes de los tocoferoles, a menudo se ha estudiado el impacto del tocoferol en la prevención de enfermedades crónicas que se cree están asociadas con estrés oxidativo, demostrando en gran medida efectos beneficiosos frente a dicho proceso oxidativo. Los tocoferoles son compuestos naturales que además de poseer una fuerte actividad antioxidante, ejercen otras propiedades biológicas, cuya capacidad de interactuar con las membranas se ha estudiado en numerosas ocasiones en relación con su efecto antioxidante. Estos estudios, se han realizado principalmente utilizando especies moleculares individuales de fosfolípidos, que han proporcionado información sobre la existencia de complejos estequiométricos entre α-tocoferol y fosfolípidos específicos (Gutiérrez *et al*., 2003). Además, los tocoferoles son un nucleófilo capaz de atrapar mutágenos electrofílicos en compartimientos lipófilos y genera un metabolito que facilita la natriuresis (Brigelius-flohe y Traber, 1999).

El α-tocoferol es el antioxidante más potente conocido en la naturaleza. Durante años, se pensó que la única función del α-tocoferol consistía en eliminar los radicales peroxilo lipídicos, específicamente de la lipoproteína oxidada de baja densidad (LDLox) siendo el antioxidante principal para la prevención de la ateroesclerosis (Halliwell, 2001; Butterfield, 2002; Ogita y Liao, 2004; Ball, 2005; Carocho y Ferreira, 2012).

En los últimos años, se han descubierto numerosas funciones adicionales del α-tocoferol e incluyen no sólo funciones antioxidantes, sino también pro-oxidante, interviniendo de manera activa en la señalización celular y funciones reguladoras de genes. En la actualidad, existen estudios que han mostrado resultados sobre la eficacia del α-tocoferol en la prevención y el tratamiento de enfermedades del corazón, el cáncer y la enfermedad de Alzheimer (Tucker y Towsend, 2005).

Otros compuestos bioactivos presentes en los cítricos son los **limonoides**. Se caracterizan por pertenecer a la familia de los terpenoides al igual que los carotenoides y tocoferoles, particularmente son triterpenos que se obtienen por variaciones de la estructura de un núcleo de furanolactona. Hasta la fecha se han aislado en la naturaleza alrededor de 300 limonoides, siendo los más comunes en cítricos el linalool y el d-limoneno que se encuentra principalmente en el extracto de aceites esenciales de la piel de cítricos (Palencia, 2010; Kamal, 2011). La **Tabla 1.6** muestra los contenidos de los principales limonoides presentes en los frutos cítricos encontrados en la literatura disponible.

Tabla 1.6. Contenido de los principales limonoides de frutos cítricos encontrado en la literatura

CÍTRICO	d-limoneno (% de extracto)	Linalool (% de extracto)	Referencias
Naranja	1,2 − 80,9	0,3 − 1,52	Fisher y Phillips, 2006; Kamal *et al*., 2011
Mandarina	20,16 − 69,9	1,1	Baghurst, 2003; Kamal *et al*., 2011
Pomelo	50,8 − 92,9	0,04 − 0,1	Baghurst, 2003; Kamal *et al*., 2011
Limón	70 − 95	0,4	Fisher y Phillips, 2006
Lima	47,5 − 59,65	0,11 − 1,3	Baghurst, 2003; Atti-Santos *et al*., 2005

Recientemente, estos metabolitos secundarios han pasado a ser objeto de estudio debido a su complejidad estructural y a su diversificada y alta actividad biológica, así como su papel en la prevención de enfermedades como el cáncer. En este sentido, los limonoides presentes en cítricos son capaces de prevenir la formación de tumores por estimulación las enzimas glutation-S-transferasa (GST) y quinona reductasa, las cuales intervienen en la fase II del proceso de biotransformación. Los organismos están expuestos a diferentes xenobióticos que, una vez absorbidos por el organismo, se acumulan en él y pueden amenazar su equilibrio funcional. Si la concentración de cualquier xenobiótico en el organismo es excesiva, inevitablemente comportará un riesgo para las funciones de las biomoléculas que actúen en su entorno. Por este motivo, es necesaria la biotransformación, un conjunto de reacciones metabólicas por medio de las cuales los organismos modifican la estructura de estos xenobióticos (mayoritariamente aumentando su polaridad) y facilitan su excreción (Jacob, 2000; Poulose *et al*., 2006; Ebere, 2008). Además, han mostrado inhibir fuertemente la proliferación de células humanas de cáncer de mama ER^+ y ER^- (Pérez, 2012), en esta misma línea un estudio *in vitro* realizado en el año 2000 concluyó que la capacidad de los limonoides para inhibir la proliferación de células de cáncer de mama estrógeno-dependientes se asemeja a la del Tamoxifeno e incluso es superior en células de cáncer de mama estrógeno-independientes (Jacob, 2000).

Los **compuestos fenólicos** son metabolitos secundarios de las plantas, formados a partir de fenilalanina y tirosina. Estos compuestos están formados por más de 8.000 compuestos divididos en varias clases (**Tabla 1.7**), la mayoría de ellos existen en las plantas de forma glicosilada (Tsao, 2010). Además, algunos son indispensables por intervenir en múltiples

funciones vegetales (crecimiento, reproducción) y por participar en funciones de defensa (Olmedilla *et al*., 2001a).

Tabla 1.7. Ordenamiento de las especies fenólicas, atendiendo al número de carbonos que poseen. Adaptación de Harborne, 1990.

Número de átomos	Esqueleto	Clases
6	C_6	Fenoles simples, Benzoquinonas
7	C_6-C_1	Ácidos fenólicos
6	C_6-C_2	Acetofenononas, Ácidos fenilacéticos
9	C_6-C_3	Cumarinas, Isocumarinas y Cromonas
10	C_6-C_4	Naftoquinonas
13	C_6-C_1-C_6	Xantonas
14	C_6-C_2-C_6	Estilbenos y Antraquinonas
15	C_6-C_3-C_6	Flavonoides e Isoflavonoides
18	$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanos y Neolignanos
30	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoides
n	$(C_6$-$C_3)_n$	Ligninas, Melaninas de catecol y
	$(C_6)_6$ $(C_6$-C_3-$C_6)_n$	Flavolanos

Su estructura química se caracteriza por la presencia de uno o varios anillos fenólicos, lo que les va a conferir mayor o menor capacidad antioxidante. En función del número de anillos y de los elementos estructurales que presentan estos anillos, los clasificaremos en dos grandes grupos o familias: flavonoides y no flavonoides (Crozier *et al*., 2006a), dentro de estos últimos, los más destacados son: ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (Scalbert y Williamson, 2000).

Los múltiples grupos hidroxilo y la disposición de los anillos fenólicos en su estructura les hacen desarrollar su gran capacidad antioxidante, inteviniendo en reacciones de captación de radicales y como agentes quelantes de metales (Ndhlala *et al*. 2010).

La familia de los **flavonoides** engloba los compuestos fenólicos más abundantes en la dieta, por su amplia distribución en los alimentos de origen vegetal (Ignat *et al*. 2011; Nakajima *et al*., 2014), su estructura se basa en el esqueleto de 2-fenil-benzo-α-pirona, formado por dos

anillos fenilo (A y B) unidos por un heterociclo, en todos ellos puede distinguirse la disposición C_6-C_3-C_6 (Wiczkowski y Piskula, 2004). Según sus estructuras moleculares (**Figura 1.27**), los flavonoides se dividen a su vez en seis clases: flavonas, flavanonas, flavonoles, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (o catequinas, Peterson, Dwyer, & Dsc, 1998; Crozier *et al*. 2006a).

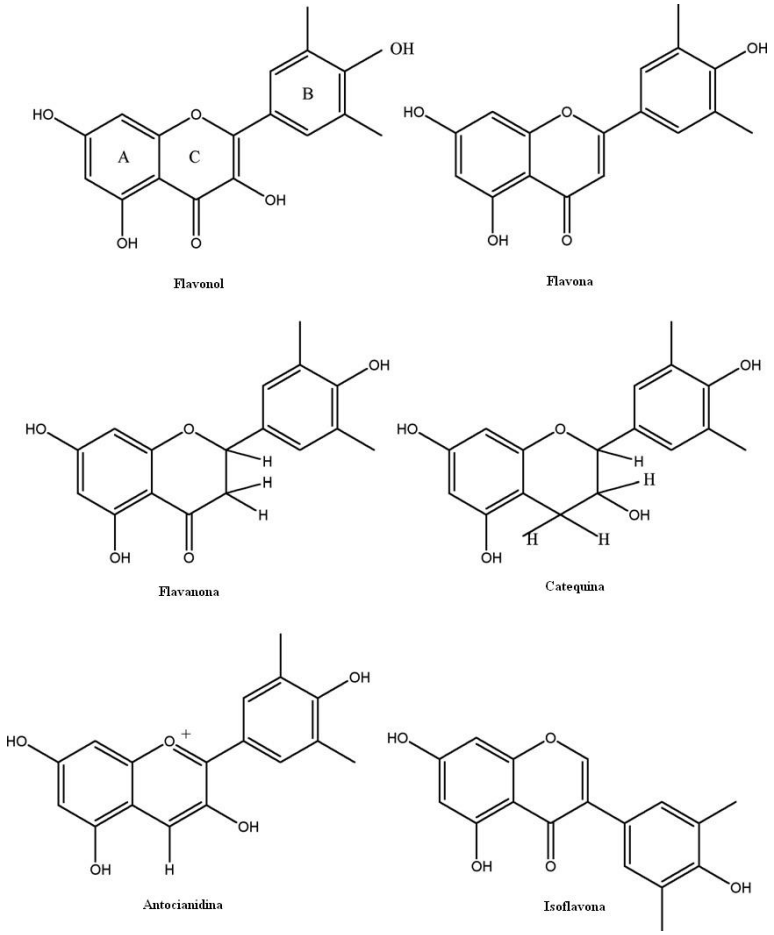


Figura 1.27. Estructura molecular de flavonoides. La estructura básica consiste dos anillos unidos (A y C), con el anillo fenilo B unido a través de su posición 10 a la posición 2 del anillo C (numerado desde el oxígeno de pirano). Adaptación de Tripoli (2004).

Las **flavanonas** presentan un centro quiral en posición C_2, lo que les proporcionan una alta reactividad, pueden sufrir hidroxilación, glicosilación y *O*-metilación. Estos compuestos están presentes en altas concentraciones en los cítricos (Tripoli *et al*., 2004; Londoño *et al*., 2006; Crozier *et al*., 2006a). Las principales agliconas son hesperidina, naringenina y eriodictiol; su *O*-glicosilación, forma en la que aparecen fundamentalmente en los cítricos, se da normalmente en el carbono C_7 (Gattuso *et al*., 2007). La flavonona más común es la

hesperidina-7-*O*–rutinósido (hesperidina) que se encuentra en la piel de los cítricos (Crozier *et al*., 2009).

Los **flavonoles** son los compuestos más ampliamente distribuidos en el reino vegetal a excepción de las algas y hongos: son miricetina, quercetina, kaempferol e isoramnetina, más comúnmente encontrados como *O*-glucósidos (Crozier *et al*., 2006a). Se encuentran típicamente glicosilados en posiciones 5, 7, 4´, 3´ y 5´. Las cebollas blancas y rojas son una fuente de flavonoles que contienen altas concentraciones de quercetina-4´-O-glucósido y de quercetina-3,4´-*O*-glucosido (Del Rio *et al*., 2013), siendo estos los principales flavonoides que han sido aislados e identificados (Benavente-García *et al*., 1997).

Las **flavonas** son estructuralmente similares a los flavonoles, aunque no presentan hidroxilación en el carbono C_3, son mucho menos comunes que los flavonoles en frutas y verduras. Las flavonas están formadas principalmente de glucósidos de luteolina y apigenina (Manach *et al*., 2004). Se encuentran principalmente en perejil, apio y achicoria (Jaganath. y Crozier, 2010), siendo el perejil la principal fuente de apigenina y la salvia y tomillo de la luteolina (Kyle y Duthie, 2006; Londoño *et al*., 2006). Su rango de sustituciones incluye hidroxilación, metilación *O*- y *C*- alquilación y glicosilación (mayoritariamente forman 7-*O*-glucósidos).

Los **flavanoles** son un grupo complejo formado por monómeros (catequina y epicatequina), oligómeros o polímeros como las proantocianidinas. Se ha detectado en vino, chocolate negro y té verde (Crozier *et al*., 2006a; Soto-Vaca *et al*., 2012). Poseen dos centros quirales en posiciones C_2 y C_3, de modo que por cada hidroxilación se producen cuatro isómeros (Crozier *et al*., 2009). Los flavanoles están presentes en las plantas como agliconas, como oligomeros o esterificados con ácido gálico (Fraga y Oteiza, 2011). La catequina y epicatequina son los mayoritarios en las frutas mientras que galocatequina, epigalocatequina y galato de epigalocatequina se encuentran en ciertas semillas de leguminosas, en uvas, y más significativamente en té (Manach *et al*., 2004).

Las **proantocianinas**, también conocidas como taninos condensados, están formadas por varias unidades de flavon-3-ol, se subdividen en dos grandes categorías basándose en la hidroxilación del anillo B de las unidades consecutivas que lo forman, así las procianidinas tienen dos grupos hidroxilo vecinales y las prodelfinidinas tres (Déprez *et al*., 2000;

Hellström *et al*., 2009; Gu, 2012). Su nombre refleja el hecho que tras una hidrólisis acida se dividen en antocianinas coloreadas (Dixon *et al*., 2005). Su función en la planta es la protección contra patógenos microbianos, ataques de insectos y de grandes herbívoros (Dixon *et al*., 2005). Las principales fuentes de proantocianidinas son las uvas pasas, el chocolate amargo y avellanas (Gu *et al*., 2004).

Otro de los grupos principales de esta familia de flavonoides, son las **antocianinas**. Se trata de antocianidinas unidas a uno o más restos de azúcar. Existen del orden de 15 a 20 veces más antocianinas que antocianidinas en la naturaleza, la diferencia entre las distintas antocianinas se debe en primer lugar, al número de grupos hidroxilo en la molécula y su grado de metilación, además otras diferencias se deben al número y naturaleza de los azúcares unidos a la molécula y la posición de esta unión, así como al tipo de ácidos alifáticos o aromáticos unidos a dichos azúcares (Mazza y Miniati, 1993)

Los azúcares más comunes son glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa y arabinosa, son frecuentes los disacáridos como rutinosa, soforosa y sambubiosa o los trisacáridos como 2-xilosilrutinosa y glucurosilrutinosa (Mazza y Miniati, 1993; Skrede y Wrolstad, 2002; Hidalgo-Jerez, 2013). Esta glicosilación les confiere mayor estabilidad e incrementan su solubilidad en agua respecto de las antocianidinas (Skrede y Wrolstad, 2002). Se encuentran conjugadas con azúcares y también con hidroxicinamatos y ácidos orgánicos (Crozier *et al*., 2006). Aunque se han detectado 31 antocianinas monoméricas el 90 % están basadas estructuralmente en las antocianidinas, peonidina, delfinidina, malvidina, petudina y pelagordina (Andersen y Jordheim, 2006).

Las antocianinas son los pigmentos hidrosolubles responsables de los colores cian (azul), comprendidos del rosa salmón pasando por el rojo, y el violeta al azul oscuro de la mayoría de las flores, las frutas y las hojas de angiosperma (Andersen y Jordheim, 2006). En la planta su función principal es protegerla de la excesiva luz, además de aportar colores llamativos que faciliten su polinización (Crozier *et al*. 2006a).

Las **isoflavonas** presentan en su estructura una diferencia con los demás flavonoides, el anillo B está en posición C_3. Las principales isoflavonas son genisteína y daizeína. Presentan actividad estrógenica llegando a competir con los estrógenos (Crozier *et al.*, 2006). La mayor

concentración de isoflavonas se encuentra en la soja y productos derivados (Crozier *et al*., 2009).

De todas las familias de compuestos fenólicos, los flavonoides es la familia más importante en los cítricos (**Tabla 1.8**). Se han llegado a identificar en los cítricos más de 60 tipos diferentes de flavonoides, presentando cantidades considerables principalmente de flavanonas, flavonoles, flavonas y antocianinas, éstas últimas sólo aparecen en naranjas sanguinas o pigmentadas (Tripoli *et al.*, 2004). En la siguiente tabla se muestran los contenidos de estos compuestos encontrados en la literatura.

Tabla 1.8. Contenido de los principales flavonoides de frutas cítricas disponibles en la literatura

CÍTRICO	Quercetina (mg/100g)	Luteolina (mg/100g)	Tangeretina (mg/100 ml)	Naringina (mg/100 ml)	Hesperidina (mg/kg)	Hesperetina (mg/100g)	Referencias
Naranja	0 − 0,57	-	10 − 70	2,13	35 − 80	9	Baghurst, 2003; Gattuso *et al*., 2007
Mandarina	-	-	250 − 280	0,08	2,43 − 3,99	-	Baghurst, 2003; USDA, 2015
Pomelo	0,17 − 0,49	-	0 − 120	23	2,5 − 6	1,5	Baghurst, 2003; USDA, 2015
Limón	0 − 0,74	0,08	-	0,38	38	17	Baghurst, 2003; USDA, 2015
Lima	-	0,61	0 − 180	-	15 − 20	43	Baghurst, 2003

De entre los flavonoides principales, las flavanonas son las más frecuentes en los cítricos, generalmente en su forma *O*-glicosilada, destacando la hesperidina, narirutina, naringina y eriocitrina (Ghasemi *et al*., 2009; Sun *et al.*, 2015).

Los flavonoides en general, inhiben algunas reacciones catalizadas por la fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y lipooxigenasa. Estas enzimas están implicadas en la síntesis de derivados

proinflamatorios del ácido araquidónico (AADs), como las prostaglandinas E2, F2 y tromboxano A2. Estos AADs son esenciales para la activación de neutrófilos, y de este modo estimulan la formación de ROS en los tejidos inflamados. Además, reducen las citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF-α) y otros mediadores (histamina) y alteran la activación de células que intervienen en la respuesta inmune, incluyendo los linfocitos T y B.

En los últimos años se ha sugerido que la administración oral de flavonoides presentes en cítricos puede aliviar la hepatopatía alcohólica mediante la prevención de la excesiva síntesis lipídica provocada por la inflamación de los hepatocitos. Específicamente, la **naringenina** puede inhibir la oxidación de los ácidos grasos en el hígado por regulación de enzimas que intervienen en este proceso oxidativo: glucosa-6-P-deshidrogenasa, fosfatasa del ácido fosfatídico, ácido graso sintasa, carnitina palmitoiltransferasa, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, acil-CoA-colesterol aciltransferasa y paraoxonasa (Ke *et al*., 2015).

Del mismo modo, las flavanonas hesperetina y naringenina han mostrado reducir la proliferación de células humanas de cáncer de mama en animales (Pérez, 2012). Por consiguiente, algunos compuestos bioactivos pueden ser utilizados como modelo para la síntesis de una nueva clase de medicamentos contra el cáncer (Poulose *et al*., 2006).

Entre los **compuestos fenólicos no flavonoides** se encuentran principalmente los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), estilbenos y lignanos**.** Los dos principales grupos de **ácidos fenólicos** son los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico. (Gharras, 2009). Su estructura consiste en un benceno unido a un grupo carboxílico (ácidos benzoicos o hidroxibenzoicos) o a un ácido propenoico (ácidos hidroxicinámicos), las variaciones en la estructura de los distintos ácidos se deben a las hidroxilaciones o metoxilaciones del anillo aromático (Lafay y Gil-Izquierdo, 2008).

Estos compuestos no están distribuidos uniformemente a lo largo de los tejidos celulares vegetales, los compuestos insolubles se encuentran principalmente en las paredes celulares, mientras que los solubles se encuentran dentro de las vacuolas de las células vegetales (Naczk y Shahidi, 2006). Además, existe una gran variabilidad encontrada en distintas etapas de maduración. Todavía son desconocidas las funciones concretas de los ácidos fenólicos en las plantas, aunque se han relacionado con algunas como la absorción de los nutrientes, la síntesis de proteínas y componentes estructurales, actividad enzimática, fotosíntesis y

alelopatía (Robbins, 2003). En las plantas pueden encontrarse libres, pero también conjugados, normalmente como ésteres o amidas, con azúcares simples, ácidos orgánicos y polímeros de las plantas (Russell y Duthie, 2011).

Los **ácidos hidroxibenzoicos** son moléculas con estructuras complejas como los taninos hidrolizables, principales responsables de la astringencia de algunas frutas y verduras (Clifford y Scalbert, 2000). Su contenido en las partes comestibles de las plantas es generalmente bajo, con la excepción de algunas frutas rojas, las cuales pueden llegar a tener concentraciones de decenas de miligramos por kilogramo de fruta fresca (Shahidi y Nacz, 1995).

El ácido hidroxibenzoico más importante es el ácido gálico (Crozier *et al*., 2006), junto con su derivado dimérico, el ácido elágico. Se encuentran en forma libre o formando parte de estructuras más complejas como los taninos hidrolizables mencionados anteriormente (Donovan *et al*., 2006), son compuestos que contienen un núcleo central de glucosa u otro poliol esterificado con ácido gálico o su dímero hexahidrodifenilo, obteniéndose respectivamente galotaninos y elagitaninos (Vladimir-Knežević *et al*., 2012), los cuales pueden romperse fácilmente para volver a sus estructuras iniciales.

Es más frecuente encontrar en los alimentos los **ácidos hidroxicinámicos** que los ácidos hidroxibenzoicos. Dichos ácidos hidroxicinámicos y sus derivados provienen casi exclusivamente de los ácidos *p*-cumárico, cafeico y ferúlico. Mientras que los derivados del ácido sinápico no son tan frecuentes y es más raro encontrarlos (Lee y Huang, 1992). El ácido cafeico es el ácido más común, encontrándose en más de un 70% de las frutas, sin embargo, el ácido ferúlico es el más abundante en granos de cereales (Manach *et al*., 2004). Normalmente los ácidos hidroxicinámicos se encuentran esterificados con el ácido quínico, ácido tartárico o incluso con otros derivados de hidratos de carbono (Lafay y Gil-Izquierdo, 2008). Los principales ácidos hidroxicinámicos que se encuentran a menudo en los cítricos son los ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico y sinápico (Manthey y Grohmann, 2001; Gattuso *et al*., 2007; Sun *et al*, 2015). Dentro de los ácidos conjugados, los formados por el ácido quínico y el ácido cafeico, se encuentran en gran variedad de frutas como los cítricos (Crozier at al., 2006).

Los compuestos fenólicos intervienen en la desactivación de los pro-carcinogenes, realizando un mantenimiento de la reparación del ADN, inhibición de la formación de N-nitrosamina y el cambio del metabolismo de los estrógenos, entre otros (Shahidi, 2004; Ramful, 2010). Son responsables de mecanismos de acción antioxidante, ya que eliminan radicales de quelación de metales, especies de oxígeno reactivas, tales como el radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y el radical hidroxilo ($HO^{\bullet}$). Por lo tanto, los compuestos fenólicos juegan un papel determinante en la patogénesis de varias enfermedades humanas (Halliwell *et al*., 1992; Aruoma, 1994; Halliwell, 1996). Estas especies de oxígeno reactivas inducen la oxidación de la membrana celular, y pueden dar lugar a la desintegración de la misma, producir daño a las proteínas y mutación del ADN, que puede iniciar o propagar el desarrollo de enfermedades incluyendo el cáncer (Huang *et al*., 2001), diabetes (Boynes, 1991), enfermedades neurodegenerativas (Perry *et al*., 2000), el proceso de envejecimiento (Hensley y Floyd, 2002) y disfunciones cardiovasculares (Hool, 2006). Los compuestos fenólicos tales como ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, taninos y lignanos pueden eliminar los radicales libres y captar a estas especies de oxígeno reactivas, y así proporcionar un medio eficaz para la prevención y el tratamiento de los radicales libres (Luximon-Ramma *et al*., 2003; Bahorun *et al*., 2004, 2006, 2007; Carocho *et al*., 2013).

De modo que estos compuestos juegan un papel crucial en la promoción de la salud y prevención de enfermedades mediante mecanismos relacionados con la diferenciación celular. Son un grupo de moléculas, que en las plantas ejercen la función de fotoprotección, defensa contra los microorganismos e insectos, siendo responsable de pigmentación y algunas características organolépticas de los alimentos (Escarpa y González, 2001).

Actividad Biológica de los cítricos: Capacidad antioxidante in vitro

El simple hecho de respirar o de obtener energía genera gran cantidad de moléculas estructuralmente inestables de oxígeno, conocidas como especies reactivas de oxígeno (EROs), que son contrarrestadas por enzimas que contienen las células. De este modo, se mantiene la homeostasis entre los procesos de oxidación – antioxidación. El problema surge cuando estos sistemas de defensa endógenos son superados por la formación de EROs (situación conocida con el nombre de estrés oxidativo), que interaccionan con diferentes biomoléculas (carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos) y ocasionan daños celulares. Como consecuencia pueden ser los causantes no sólo de enfermedades como el cáncer sino de otras como la arterioesclerosis, trastornos oculares (degeneración macular asociada a la edad y cataratas) y del sistema nervioso central (Alzheimer, Parkinson), obesidad, osteoporosis e incluso debilitamiento del sistema inmunitario y envejecimiento. Por este motivo es importante implementar una dieta rica en antioxidantes, como los compuestos bioactivos, que sean capaces de atenuar el estrés oxidativo (Palencia, 2010).

Los compuestos antioxidantes, como el ácido ascórbico y los compuestos fenólicos, son aquellas sustancias que reaccionan con los radicales libres para formar compuestos estables no reactivos, proceso conocido como "captura", siendo en la actualidad un parámetro interesante para valorar la calidad nutricional del producto. Existen dos tipos principales de sustancias antioxidantes, los de origen endógeno (sintetizados por el organismo) como las enzimas, glutation, etc, y exógenos procedentes de los alimentos, entre estos s eencuentran las vitaminas A, E y C, los β-carotenos, luteína, licopenos, tocoferoles, flavonoides, el ácido lipoico y cofactores (cobre, zinc, manganeso, hierro y selenio), entre otros.

Los radicales libres son moléculas muy inestables, procedentes del metabolismo y del normal funcionamiento fisiológico, que presentan electrones desapareados, siendo las especies reactivas de oxígeno las más importantes, además de metales de transición (Fe, Mn, Co, Ni y Cu) y radicales de nitrógeno (NO, NO_2), el desbalance entre radicales libres y antioxidantes, produce un fenómeno llamado estrés oxidativo, el cual ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades (Domínguez *et al*., 2014; Carocho y Ferreira, 2012).

Un radical libre es cualquier especie reactiva que contiene uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, es decir, se trata de átomos o moléculas inestables de alta energía con electrones desapareados en sus órbitas exteriores, que tienden a reaccionar con otros compuestos. El radical libre, es muy reactivo en estas condiciones y busca otro electrón para poder aparearse y así poder estabilizarse (Zamora, 2007). Por la capacidad de detener o retardar procesos oxidativos, los cuales pueden causar daños en las células o afectar la preservación de productos, los compuestos con actividad antioxidante tienen una gran aplicación en el campo de los alimentos, la industria alimentaria, la medicina, la cosmética, etc. (Lachance *et al*., 2001; Wiseman, 2005).

Los antioxidantes, tal y como se ha mencionado anteriormente, son sustancias químicas que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias, principalmente de los ácidos grasos. Estas reacciones de oxidación se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano, en el cual puede dar lugar a alteraciones fisiológicas importantes desencadenantes de diversas patologías. Otra de las funciones de los antioxidantes es facilitar el uso fisiológico del oxígeno por parte de las mitocondrias celulares, ayudando a reducir los efectos del estrés oxidativo y la falta de oxígeno, formando complejos que mitigan las reacciones productoras de radicales oxidantes y, por consiguiente, desempeñando una función fundamental en la prevención de las enfermedades crónicas no trasmisibles (Zamora, 2007).

Los antioxidantes enzimáticos endógenos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) constituyen la primera línea de defensa antioxidante y previenen el daño oxidativo interaccionando directamente con los radicales del oxígeno. Por otra parte, el sistema exógeno está formado por los nutrientes básicos y por las denominadas “sustancias fitoquímicas” (Ugartondo, 2009). Los nutrientes básicos que ingerimos a través de la dieta (proteínas, lípidos, vitaminas y minerales) ayudan a los mecanismos de defensa internos contra todas las oxidaciones no deseadas, ya sea actuando como antioxidantes por si solos o haciendo de cofactores de los sistemas antioxidantes endógenos (Diplock, 1998; Lozano *et al*., 2005).

A través de la dieta, obtenemos también, una de las principales fuentes de antioxidantes exógenos, las sustancias fitoquímicas. Se trata de compuestos bioactivos procedentes del reino vegetal de estructura química y propiedades muy variadas, que juegan un papel

importante en el mantenimiento del equilibrio redox y en la disminución de la incidencia del daño producido por los radicales libres, por lo que actualmente se consideran altamente beneficiosos para la salud (Ugartondo, 2009).

Por ejemplo, diferentes estudios *in vitro* indican que los polifenoles procedentes de cítricos podrían ayudar en el tratamiento de la obesidad, ya que inducen una reducción de la diferenciación de los adipocitos y del contenido de lípidos en la célula. La mayoría de estos ensayos indican una reducción en el tejido adiposo, aumento de la expresión de genes relacionados con el estímulo para la β-oxidación, mejora el perfil lipídico y la glucemia, así como alguna evidencia de mejora del estado inflamatorio. Concretamente, diferentes ensayos clínicos en humanos han demostrado el efecto positivo de flavonoides cítricos en la reducción de citoquinas pro-inflamatorias en los seres humanos (Mayumi *et al*., 2014). Así mismo, se han evaluado estas frutas en un intento de prevenir y tratar la obesidad debido a los polifenoles que contienen, para ello se han desarrollado diferentes estudios con la finalidad de evaluar el papel de estos compuestos frente a esta patología (Mayumi *et al*., 2014).

En este sentido, se ha estudiado extensamente la relación inversa entre la ingesta de antioxidantes dietéticos, a través del consumo de distintos tipos de frutas y verduras, y el daño oxidativo (Liu, 2003; Prior, 2003; Landete, 2012; Jomova y Valko, 2013).

Así mismo, se han realizado numerosos estudios *in vivo* de intervención que comprenden tanto el consumo agudo como crónico de cítricos. En dichos estudios, se puede comprobar como la ingesta de estas frutas influye en distintos marcadores que miden el estatus antioxidante (Sánchez-Moreno *et al*., 2003; Guarnieri *et al*., 2007). Por ejemplo, la ingesta de zumo de naranja (200 mL/día) durante 26 días aumentó la capacidad antioxidante en plasma medida mediante el ensayo ORAC en fumadores crónicos (Alvarez-Parilla *et al*., 2010). En esta misma línea, Ghanim *et al*. (2007) mostraron que una ingesta de zumo de naranja de 600 mL minimizó el estrés oxidativo postprandial manteniendo el estatus basal y obteniéndose un nivel de generación de ROS más bajo que con respecto a la ingesta de solución azucarada.

Otros estudios han mostrado el efecto protector de los cítricos sobre el daño oxidativo del ADN en humanos disminuyendo significativamente el daño oxidativo en linfocitos (Bub *et*

al., 2003; Riso *et al*., 2005; Guarnieri y col., 2007). En este sentido, Franke *et al*. (2005) mostraron un descenso en el nivel de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (16%), marcador del daño oxidativo en ADN tras la ingesta de zumo de naranja.

Milenkovic *et al*. (2011) realizaron un estudio nutrigenómico con humanos sanos para identificar los cambios en la expresión de genes en células mononuclerares tras el consumo crónico de zumo de naranja (500 mL/ día, durante 4 semanas). Los resultados mostraron que el consumo regular de zumo de naranja modifica la expresión de numerosos genes en leucocitos. Varios de los cambios observados en la expresión génica podrían describirse como respuestas anti-inflamatorias y anti aterogénicas a esta intervención dietética, mostrando el papel relevante de la hesperidina, como flavonoide principal en cítricos en este efecto biológico de estos alimentos.

En este sentido, otros estudios evaluaron el aumento de la concentración en plasma de diversos compuestos boactivos con la ingesta diaria de cítricos como la naranja, como la vitamina C (alrededor de un 50 %), carotenoides como el β-caroteno (17 %), así como flavonoides como hesperetina y naringenina las cuáles experimentaron un considerable aumento (512 % y 874 % respectivamente, Franke *et al*., 2005; Riso *et al*., 2005; Aptekmann y Cesar, 2010; Morand *et al*., 2011).

De estos estudios se deduce que la ingesta de antioxidantes naturales a través del consumo diario de cítricos puede proporcionar una protección adicional contra la oxidación *in vivo* de biomoléculas celulares.

Por otro lado, diferentes estudios sugieren que determinadas variedades de mandarinas como la Satsuma pueden actuar como un supresor contra el daño celular hepático e inhiben la progresión de la disfunción hepática inducida por la hiperglucemia crónica (Sugiura *et al*., 2005). Los zumos cítricos comerciales podrían contribuir hasta un 12 % de la ingesta diaria de antioxidantes en España, mientras que los zumos recién exprimidos pueden contribuir hasta un 49 % (Álvarez *et al*., 2014; Londoño *et al*., 2006).

Por tanto, los compuestos que se encuentran en los cítricos, tales como la vitamina C, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, carotenoides, tocoferoles, entre otros, poseen una gran capacidad antioxidante y se ha descrito su papel en la prevención de numerosas patologías (O'Neil *et al*., 2011; Rapisarda *et al*., 1999; Yang *et al*., 2013).

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 OBJETIVOS

Cada día se hace más evidente la preocupación del consumidor por la alimentación, incorporando a su dieta más cantidad de alimentos frescos y saludables con cualidades organolépticas excelentes. Alimentos que además de su aporte nutricional sean alimentos ricos en compuestos bioactivos que jueguen un papel fundamental, actuando como agentes promotores para la salud, proporcionando determinados efectos fisiológicos que puedan beneficiar la salud de los consumidores, mediante la prevención del el inicio o retraso en el desarrollo de ciertas enfermedades crónicas.

En este sentido, el presente trabajo tiene como **objetivo principal**:

Evaluar la calidad nutricional y funcional de distintas frutas cítricas como son las clementinas y las naranjas pigmentadas, mediante el estudio de su contenido en nutrientes y compuestos bioactivos, así como la evaluación de su actividad biológica antioxidante.

Para dar cumplimiento a este objetivo principal se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la influencia del proceso de maduración en la caracterización de tres variedades de **clementinas**, Basol, Clemenrubí y Clemensoon, en relación a su contenido en macro y micronutrientes, así como su contenido en compuestos bioactivos y valoración de su actividad biológica.

2. Realizar un estudio comparativo del perfil nutricional, contenido en compuestos bioactivos y actividad biológica de las tres variedades de clementinas estudiadas en el estado de maduración organoléptico.

3. Caracterizar distinas variedades de **naranja pigmentada,** Sanguinelli y Tarocco, en relación a su contenido en compuestos bioactivos y sus cualidades organolépticas (color).

Este trabajo ha formado parte de lo**s proyectos** de investigación OTRI UCM − ANECOOP S. Coop. (Referencia 322/2012) y OTRI UCM-ANECOOP S. Coop – UCM (Referencia 25/2015) realizados en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y está relacionado con las líneas de investigación del Grupo de Investigación ALIMNOVA

(Nuevos Alimentos. Aspectos científicos, tecnológicos y sociales), de la Universidad Complutense de Madrid.

Algunas de las determinaciones llevadas a cabo en el presente trabajo, se realizaron como parte de una estancia internacional de investigación predoctoral realizada en el Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada, pertenecientes al Departamento de biología y Biotecnología (DBB) del Centro de Investigación de Montaña (CIMO, Escola Superior Agrária de Bagança entre el 1 de julio y el 6 de octubre de 2014, bajo la dirección de la investigadora Dra. Lillian Bouçada de Barros, así como la determinación de flavonoides se llevó a cabo en el Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia (España) con la colaboración de la Dra. Marta Igual Ramo.

2.2. PLAN DE TRABAJO

Para conseguir la consecución de los objetivos propuestos anteriormente, se desarrolló el siguiente plan de trabajo.

Se realizó un primer estudio centrado en el análisis de tres variedades de **clementinas** (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) extra-precoces: **Basol, Clemenrubí y Clemensoon**, todas ellas procedentes de la Comunidad Valenciana y recolectadas en dos estados de maduración diferentes, estado de maduración intermedio (E1) y estado de maduración organoléptico (E2) correspondientes a las campañas de otoño de tres años consecutivos 2011, 2012 y 2013. Un segundo estudio se centró en el análisis de dos variedades de naranja pigmentada: **Sanguinelli** (*Citrus sinensis* L. cv Sanguinelli) **y Tarocco** (*Citrus sinensis* L. cv Tarocco) **(Tarocco Rosso, Tarocco T. 70 y Tarocco T. 100)**, las cuales fueron recolectadas en tres momentos a lo largo de la campaña de invierno-primavera de 2015.

La selección y recolección de todas las muestras objeto de estudio de la presente tesis doctoral fue realizada por técnicos de ANECOOP, quienes las enviaron en el mismo día de su recolección al laboratorio de la Universidad Complutense de Madrid, manteniendo unas condiciones de humedad y temperatura adecuadas.

Para el cumplimiento de los objetivos propuestos se realizó una selección adecuada de los métodos analíticos para la determinación del valor nutricional, evaluación del contenido en compuestos bioactivos (compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y vitamina C) así como la evaluación de la capacidad antioxidante, utilizando en todos los casos los métodos oficiales disponibles, o aquellos validados según la bibliografía científica.

3. ESTUDIO DE CLEMENTINAS
(*Citrus Clementina* Hort. Ex Tan.)

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Considerando la importancia del consumo de clementinas (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) en España, sus cualidades organolépticas (sabor muy dulce, piel fina, facilidad para pelar, pequeño tamaño y ausencia de semillas), y teniendo en cuenta las evidencias científicas que relacionan su consumo con distintos efectos beneficiosos para la salud (Yahia, 2011; Legua *et al*, 2014), los objetivos específicos de este estudio han sido:

1. Estudiar la influencia del proceso de maduración en la caracterización de tres variedades de **clementinas**, Basol, Clemenrubí y Clemensoon, en relación a su contenido en macro y micronutrientes, así como su contenido en compuestos bioactivos y valoración de su actividad biológica antioxidante.

2. Realizar un estudio comparativo de las tres variedades de clementinas estudiadas en el estado de maduración organoléptico.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación OTRI UCM − ANECOOP S. Coop. (322-2012) y se ha llevado a cabo en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid. A excepción de las determinaciones de compuestos fenólicos y actividad antioxidante, las cuales se han realizado en el Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada, pertenecientes al Departamento de biología y Biotecnología (DBB) del Centro de Investigación de Montaña (CIMO), Escola Superior Agrária de Bagança.

A continuación, se muestra a modo de resumen el planteamiento del trabajo realizado con las determinaciones llevadas a cabo en las clementinas objeto de estudio.

PLAN DE TRABAJO EN CLEMENTINAS

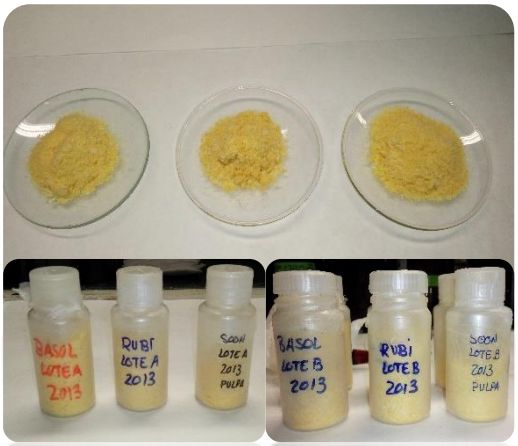
FRESCO





- Humedad
- pH
- Acidez titulable
- Grados Brix
- Vit C (ácido ascórbico y dehidroascórbico)
- Ácidos orgánicos

LIOFILIZADO



- Azúcares solubles
- Fibra
- Proteínas
- Cenizas
- Minerales
- Grasa
- Ácidos Grasos
- Tocoferoles
- Compuestos fenólicos (HPLC - MS)
- Actividad Antioxidante

Esquema 3.1. Determinaciones realizadas en Clementinas.

3.2. MATERIALES

Para el presente estudio se han considerado tres variedades de **clementinas** (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) extra-precoces, motivo por el cual se han seleccionado, siendo: **Basol, Clemenrubí y Clemensoon**, procedentes de la Comunidad Valenciana. La elección de las muestras se realizó en base a un estudio previo de nuevas variedades seleccionando aquellas que presentaban un interés comercial desde el punto de vista del consumidor, cada vez más exigente, en cuanto a calidad organoléptica y nutricional (buen calibre, sin semillas, buen color, de fácil pelado, alto porcentaje de zumo, equilibrio entre azúcares y ácidos), así como por su temprana recolección.

Las tres variedades de clementinas analizadas fueron:

- *Citrus C. Clementina* Hort. Ex Tan. ***Variedad Basol.*** Se originó por mutación espontánea de yema en un árbol de clementina *Oronules* detectada en 1999 en Espinas (Castellón).
- *Citrus C. Clementina* Hort. Ex Tan***. Variedad Clemnrubí***. Se originó por mutación espontánea de yema en un árbol de clementina *Oronules* detectada en 1996 en el término de Loriguilla (Valencia).
- *Citrus C. Clementina* Hort. Ex Tan***. Variedad Clemensoon***. Se originó por mutación espontánea de yema en un árbol de clementina *Oronules* detectada en 1996 en el término de Algimia de Alfara (Valencia).

Las muestras objeto de estudio, fueron proporcionadas por los técnicos ANECOOP S. Coop., asociación perteneciente al consorcio CITRUSEQ-CITRUSGENN, una agrupación público-privada formada por dos organismos públicos de investigación (IVIA y el Centro de Investigación Príncipe Felipe), una fundación privada (Fundación Cajamar) y cinco compañías privadas (Eurosemillas, Source Citrus Genesis-SNFL, GCM Variedades Vegetales, Anecoop, e ICCSA). Este consorcio se formó con el objetivo de desarrollar herramientas genómicas y biotecnológicas para la obtención de nuevas variedades de cítricos con gran potencial comercial, como es el caso de las tres variedades que nos ocupan en el presente estudio.

En el caso de las variedades Basol y Clemenrubí, el árbol (**Figura 3.1**) se caracteriza por tener vigor medio con desarrollo lento; sin embargo, en la variedad Clemensoon se trata de un árbol con desarrollo más vigoroso. Las tres variedades presentan hábito de crecimiento abierto, con entrenudos muy cortos que hace que tenga un aspecto denso y frondoso. Las ramas no presentan espinas, y en el tronco, ramas y en las zonas de injerto aparecen abultamientos con multitud de yemas.



Figura 3.1. Aspecto de árboles clementinos de las tres variedades estudiadas. Izquierda: variedad Basol; Centro: variedad Clemenrubí; Derecha: variedad Clemensoon. Fuente: Anecoop, S. Coop, 2015.

Los árboles de las tres variedades objeto de estudio se caracterizan por presentar hojas similares a las del clementino *Oronules*, son pequeñas, estrechas y coriáceas, de color verde oscuro, y con tendencia a curvarse hacia el envés. Las flores tienen las anteras amarillas, con abundantes granos de polen viables para una posterior polinización (Anecoop, S. Coop.).

El tamaño del fruto (**Figura 3.2**) es similar a otra variedad de clementinas denominada *Oronules*, tratándose de un tamaño medio, con la corteza de color naranja-rojizo intenso, muy atractiva, de consistencia blanda y adherencia ligera por lo que el fruto se pela con facilidad. La pulpa, sin semillas, es de color naranja y tiene unas excelentes características gustativas con buen contenido en zumo de agradable sabor. Las membranas carpelares de los gajos son bastante coriáceas. Puede polinizar y polinizarse con variedades compatibles (Anecoop, S. Coop.).

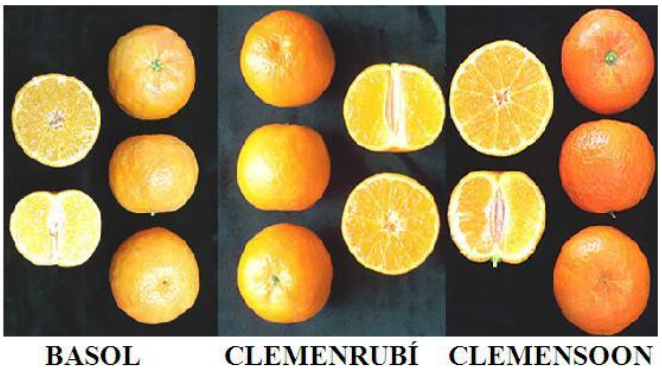


Figura 3.2. Aspecto del fruto de las tres variedades analizadas

Son variedades muy productivas y muy precoces en la entrada en producción, pudiendo recolectarse a principios de septiembre, como es el caso de la variedad Basol (a la vez que la variedad *Prenules*). En el caso de las variedades Clemenrubí y Clemensoon, su recolección es a partir de mediados de septiembre (**Figura 3.3**), unos días después que la variedad Basol.

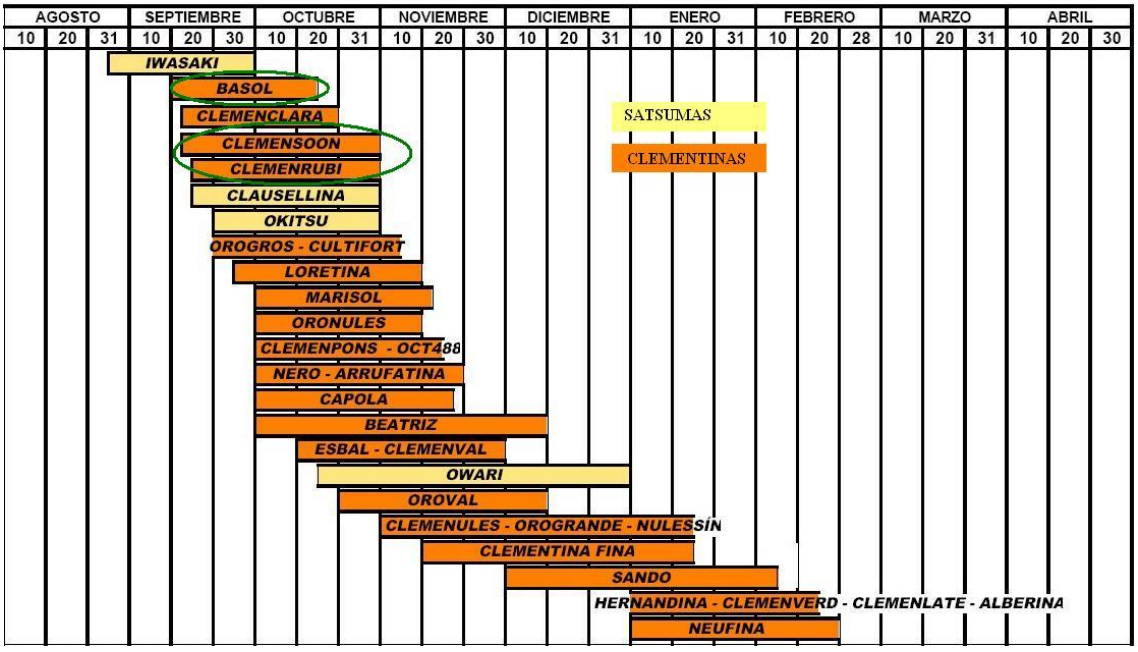


Figura 3.3. Periodos de recolección de satsumas y clementinas. Fuente: IVIA, 2016.

No conviene demorar la recolección mucho después de que los frutos hayan alcanzado la total madurez externa ya que presentan una acusada tendencia al bufado (alteración fisiológica, que se caracteriza porque la corteza del fruto se separa de la pulpa). Su cultivo

está indicado en zonas de mucha precocidad. Tiene cierta tendencia a producir en racimos y es sensible a la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster* (Anecoop, S. Coop.).

Las clementinas objeto del presente estudio se anaizaron en dos estados de maduración diferentes, un primer estado de maduración intermedio (E1) y un segundo estado de maduración organoléptico y/o comercial (E2), según el muestreo descrito en la siguiente tabla.

Tabla 3.1. Muestreo correspondiente a las variedades de clementinas analizadas, 2011-2013.

Temporada	**Estado de maduración**		**Tamaño del Lote**	
	E1	E2	Kg	Nº piezas
2011	_	25/10/2011	2 kg	23 - 30
2012	2/10/2012	26/10/2012	2 kg	23 - 30
2013	7/10/2013	28/10/2013	2 kg	23 - 30

Los frutos recién recolectados fueron transportados al laboratorio de análisis en un plazo de tiempo inferior a 24 h, manteniendo la cadena de frío en todo momento para asegurar la correcta conservación de las mismas. Una vez recibidas en el laboratorio, se procedió a la preparación de las mismas para posteriores determinaciones analíticas.

3.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

La preparación de las muestras supuso la separación de la piel de la pulpa, trituración y homogeneización por separado en estado fresco, mediante un dispersor de alto rendimiento (Ultraturrax®) obteniéndose diferentes alícuotas. Una parte del producto homogeneizado se empleó para las determinaciones físico-químicas, como humedad, pH y acidez titulable y grados Brix, así como para la determinación de vitamina C en sus dos formas activas (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico) y otros ácidos orgánicos. El índice de madurez (IM) se calculó mediante la relación entre grados Brix y acidez titulable.

Por otro lado, otras alicuotas del producto fresco homogeneizado se sometieron a liofilización, protegido de la luz, para asegurar su conservación durante el periodo de tiempo necesario para completar todos los análisis. Las muestras liofilizadas se guardaron en recipientes herméticos, en oscuridad y a temperatura controlada (-20 °C) para evitar la alteración del producto. A partir de esos productos liofilizados se preparó una muestra de cada una de las variedades estudiadas, conteniendo cantidades iguales del material de cada año y de cada una de las etapas de recolección sujetas al estudio.

3.3.1. Parámetros físico-químicos

Humedad

La Humedad se determinó por desecación en estufa a 105 °C durante 4 − 6 horas, hasta peso constante (984.25 A.O.A.C., 2005).

Ph

Se llevó a cabo la medida potenciométrica en pHmetro modelo MicropH – 2000 (Crison Instruments). El equipo se ajustó con las disoluciones tampón de pH 4 y 7 a la temperatura de trabajo. A continuación, se efectuó la lectura del pH de la muestra (981.12 A.O.A.C., 2005).

Acidez titulable

Se valoró la acidez debida a los ácidos presentes en la muestra por volumetría ácido-base con NaOH 0,1 N de factor conocido, valorando por potenciometría hasta pH 8,1. La acidez se expresó como mL de NaOH 0,1 N necesarios para neutralizar los ácidos presentes en 100 gramos de porción comestible (942.15, A.O.A.C., 2005).

Grados Brix

Se llevó a cabo la determinación de grados Brix de las muestras por medida refactrométrica en el refractómetro Atago a la temperatura de trabajo, temperatura ambiente (20 °C). Los resultados fueron expresados como °Brix, porcentaje de sacarosa medido a 20 °C (932.14C, A.O.A.C., 2005; Horwitz & Latimer, 2005).

Índice de madurez

El índice de madurez (I.M) se calculó mediante la relación ºBrix/AT (**Ecuación 3.1**). Siendo AT, la acidez titulable expresada en mg/100 g de porción comestible.

I.M. = °Brix / Acidez Titulable

Ecuación 3.1. Ecuación para el cálculo del índice de madurez de las muestras analizadas.

3.3.2. Caracterización nutricional

Tras la liofilización y conservación de las muestras a -20°C, se procedió al análisis de la composición de la fracción hidrocarbonada, los azúcares solubles (fructosa, glucosa y sacarosa) se determinaron por HPLC-IR y fibra (soluble, insoluble y total) según el método enzimático-gravimétrico (Horwitz & Latimer, 2005).

Azúcares solubles

En las muestras objeto de estudio la determinación de los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) se realizó por HPLC-IR (Cámara *et al*., 1992) previa extracción con etanol (80%) durante 45 minutos en un baño de agua a una temperatura de 55 − 60 °C con agitación magnética y constante. El extracto obtenido fue filtrado y evaporado a sequedad en rotavapor a 40 °C. El residuo obtenido se re-disolvió en 25 mL de agua destilada, y posteriormente purificado a través de cartuchos Sep-pak C18. A continuación, se tomaron 2 mL del filtrado y se diluyeron en 8 mL de acetonitrilo, la disolución resultante se filtró a través de un filtro Milipore de nylon 0,45 µm para posterior inyección en el equipo de HPLC. La fase móvil empleada fue acetonitrilo:H_2O (80:20) a un flujo de 0,9 mL/min. Los datos fueron analizados mediante el software Biocrom 2000, 3.0.

La identificación y cuantificación de los azúcares solubles (**Figura 3.5**) se realizó comparando los tiempos de retención con los obtenidos de los patrones comerciales puros de fructosa, glucosa y sacarosa, expresando su contenido en g/100 g de porción comestible.

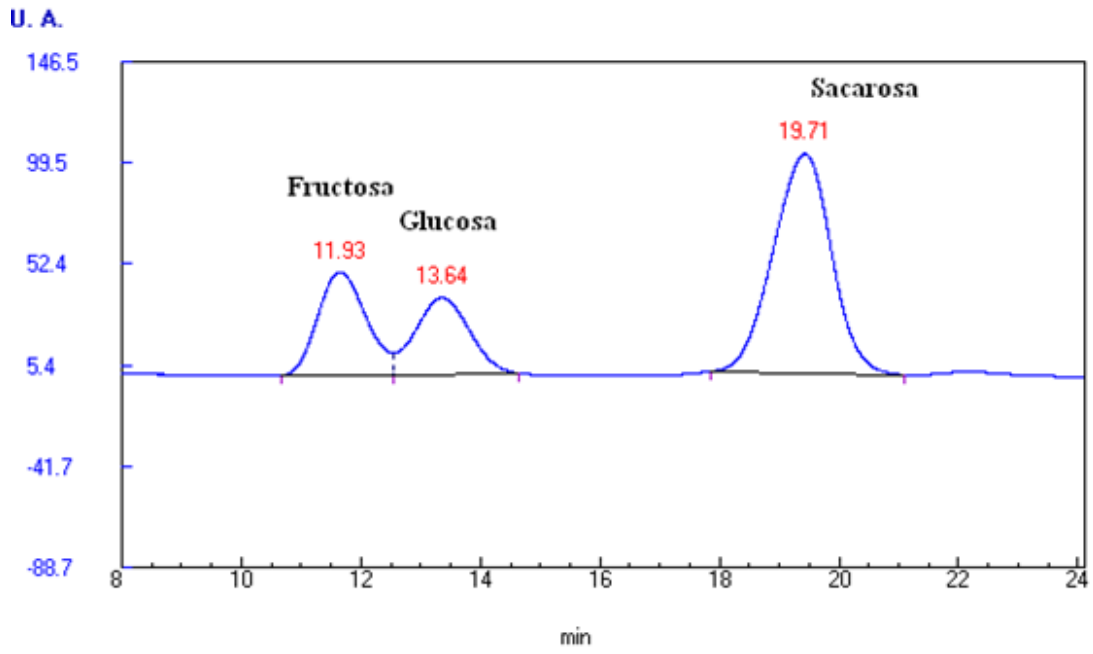


Figura 3.5. Perfil cromatográfico (HPLC-IR) obtenido en el análisis de azúcares solubles en la variedad de clementina Basol (temporada 2012, estado de maduración organoléptico E2).

Fibra soluble, insoluble y total

Se analizaron la fracciones soluble e insoluble de la fibra alimentaria por los métodos enzimático-gravimétrico, según el método 993.19 y 991.42 de la AOAC (Horwitz y Latimer, 2005). Las muestras se sometieron a tratamiento enzimático (α-amilasa termamil, proteasa y amilo-glucosidasa). La fracción insoluble se separó por filtración a vacío, para posteriormente precipitar (con etanol) y filtrar (a vacío) la fracción soluble. Los residuos de las filtraciones se desecaron a 100 °C, y se determinó en ellos los contenidos de cenizas y proteínas, que fueron sustraídos del peso del residuo. El valor de **fibra total** se obtuvo a través de la suma de ambas fracciones cuantificadas, soluble e insoluble. Los resultados se expresaron como g de fibra (soluble, insoluble o total) /100g de porción comestible.

Proteína Bruta

El contenido de proteínas bruta se determinó como la cantidad de nitrógeno presente en la muestra cuantificado a través del método Kjeldahl. El factor de conversión del nitrógeno en cantidad de proteína (g/100 gramos de porción comestible) para las muestras objeto de análisis fue de 6,25, según el método 920.152 de A.O.A.C. Este método se basa en la cantidad de nitrógeno presente en una muestra que está directamente relacionado con la cantidad de proteínas bruta. Su fundamento se basa en la destrucción de toda la materia orgánica por adición de un ácido fuerte (H_2SO_4 concentrado) encontrándose el nitrógeno contenido en la muestra bajo la forma de $(NH_4)_2SO_4$. Después se adiciona de NaOH para liberar el en forma de NH_3 (destilación por vapor) y se recoge mediante H_2SO_4 N/10, para su posterior cuantificación mediante una valoración por retroceso con NaOH N/10 utilizando rojo de metilo como indicador (Horwith y Latimer, 2005).

Grasa Total

El contenido en grasa total de las muestras analizadas se determinó gravimétricamente tras la extracción en continuo de muestra liofilizada con éter de petróleo en un equipo Soxtec Sistem HT durante 45 minutos y posterior evaporación del éter en estufa 40 °C hasta sequedad, según el método 983.23 de la AOAC (Horwith y Latimer, 2005). Los resultados se expresaron como g grasa/ 100 gramos de porción comestible.

Perfil de ácidos grasos

Una vez obtenido el contenido total de grasa, el estudio del perfil de ácidos grasos se llevó a cabo por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) como se describió anteriormente por los autores Morales *et al*. (2013).

La extracción etérea se sometió a un proceso de esterificación (metilación) de los ácidos grasos presentes en la misma, mediante la adición de 5 mL de la solución de metanol:ácido sulfúrico:tolueno (2:1:1; v/v/v), y posterior incubación durante al menos 12 horas en un baño a 50 °C y agitación continua (160 rpm). A continuación, se adicionaron 3 mL de agua desionizada, para facilitar la separación de las fases. Los ácidos grasos presentes en la fase lipídica se recuperaron adicionando 3 mL de éter etílico y posterior agitación en vórtex, y la fase esterificada se pasó por un vial con sulfato de sodio anhidro, para eliminar el contenido de agua residual. Finalmente, la muestra se recuperó en un vial de teflón previa filtración por un filtro Milipore de nylon de 0,2 µm.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo con un equipo DANI modelo GC 1000 (Milán, Italia) equipado con un inyector con split/splitless, un detector de ionización de llama (FID a 260 °C) y una columna Macherey-Nagel (Düren, Alemania) compuesta por 50% cianopropilo-metil y 50% fenilmetilpolisiloxano, con un diámetro de columna de 30 mm x 0,32 mm x 0,25 µm.

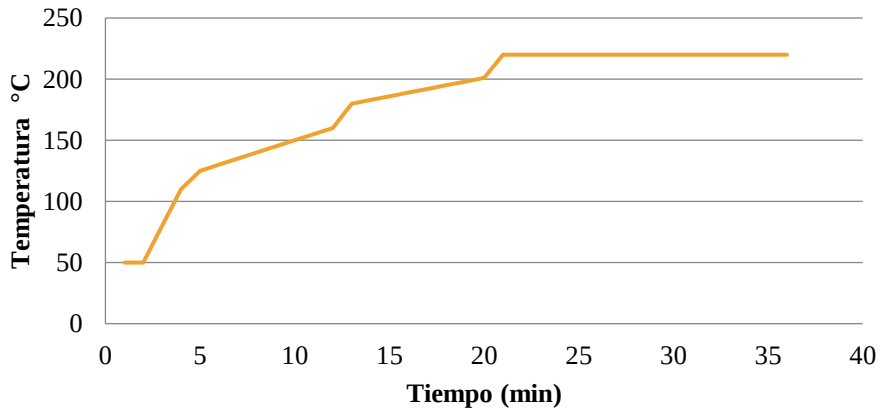


Figura 3.6. Rampa de temperatura empleada en la determinación del perfil de ácidos grasos en las muestras analizadas.

El programa de temperatura (**Figura 3.6**), se llevó a cabo mediante un gradiente de temperatura que siguió el siguiente esquema: la temperatura inicial de la columna fue de 50 °C, se mantuvo durante 2 minutos, a continuación, se fue incrementando de manera constante 30 °C por minuto hasta llegar a 125 °C, después se fue incrementando 5 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 160 °C, seguido de un incremento de 20 °C por minuto hasta alcanzar los 180 °C, para seguir con un incremento de 3 °C por minuto hasta 200 °C, por último se incrementó en 20 °C por minuto hasta alcanzar los 220 °C donde se mantuvo durante 15 min. El gas portador (hidrógeno) viajó a una velocidad de flujo de 4,0 mL/min a 0,61 bares de presión, medidos a 50 °C. La inyección (1:40) se llevó a cabo a 250 °C.

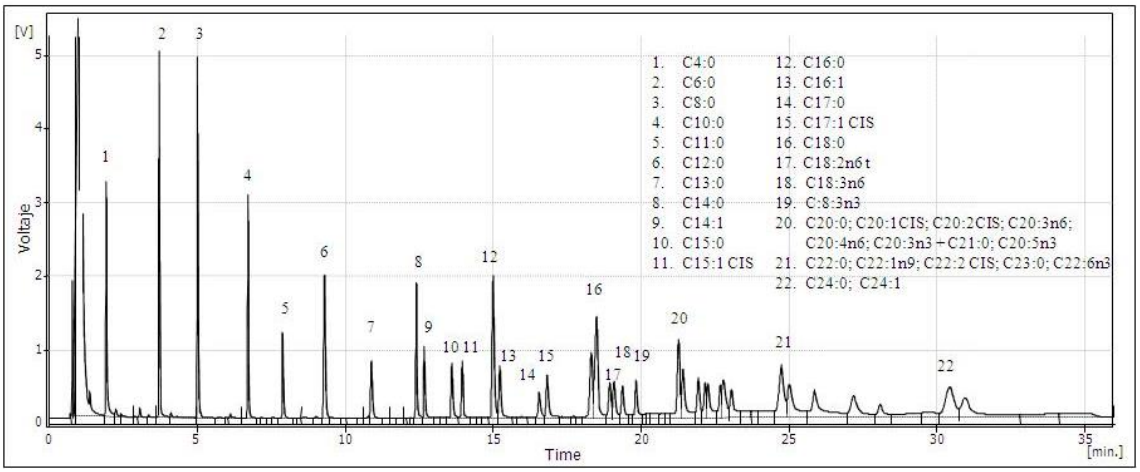


Figura 3.7. Perfil de ácidos grasos del patrón de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) empleado en la identificación por cromatografía de gases (GS-FID).

La identificación de ácidos grasos se realizó mediante la comparación de los tiempos de retención relativos de los picos de las muestras de FAMEs con los estándares correspondientes y los resultados se expresaron en porcentaje relativo de cada ácido graso (**Figura 3.7**). Los resultados se registraron y procesaron utilizando el software *Clarity*.

Cenizas Totales

El contenido de cenizas de las muestras analizadas se determinó sometiendo a las mismas a una completa destrucción de la materia orgánica, evitando al máximo una posible

contaminación. Este proceso se realizó mediante mineralización por vía seca a una temperatura de 450 °C, durante 24 h hasta obtener cenizas blancas, empleandose un horno microondas Milestone Muffle Furnace, modelo mls 1200 piro, a 450 °C. El contenido de cenizas se calculó mediante gravimetría, según el método 930.05 A.O.A.C. (Horwith y Latimer, 2005).

Composición de elementos minerales

Sobre las cenizas obtenidas por mineralización de las muestras liofilizadas (apartado 3.4.10.), se llevó a cabo el análisis de los elementos minerales presentes en los mismos por Espectroscopía de Absorción Atómica (EAA), determinándose los macroelementos potasio, sodio, calcio y magnesio, y los microelementos hierro, cobre, manganeso y zinc.

Las cenizas obtenidas se pesaron y se disolvieron en una mezcla ácida formada por 2 mL de HCl al 50 % y 2 mL de HNO_3 al 50 %. La solución resultante se filtró a través de papel Albert® Nº 145 y se diluyo hasta 25 mL con agua destilada. Posteriormente, se envasaron en frascos de polietileno hasta su posterior lectura por EAA. Para ello, se utilizó un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 2.280, que consta de:

- Sistema de nebulización de alta sensibilidad.
- Sistema de atomización (fuente de excitación): llama de aire/acetileno, con carácter oxidante
- Fuente de emisión: lámparas de cátodo hueco: lámpara múltiple de intesidad 25 mA (Fe, Cu, Mn y Zn); lámpara de intensidad 15 mA para Ca y Mg, y de intensidad 12 mA para K y Na.

Los microelementos minerales se midieron directamente en el espectrofotómetro a partir de la disolución anteriormente descrita. Mientras que para los macroelementos, con el fin de evitar interferencias, para la cuantificación, se procedión a preparar una disolución 1/10 (v/v) con $CsCl_2$ (0,4%) para K y Na, y otra disolución 1/10 (v/v) con una disolución conteniendo 1,16% de La_2O_3 + 1,75% HCl dando lugar a la formación de $LaCl_3$, para el análisis de Ca y Mg.

Las condiciones instrumentales empleadas fueron fijadas según las bandas de absorción características de cada elemento, seleccionando las condiciones óptimas de sensibilidad y precisión en las medidas. Los parámetros ópticos para micro y macroelementos minerales se fijaron en los ensayos preliminares, eligiéndose las condiciones que se muestran en la **Tabla 3.2**.

Los resultados obtenidos para macro y microelementos se expresaron como mg/100 g porción comestible, respectivamente.

Tabla 3.2. Condiciones empleadas para la determinación de minerales.

Elemento Mineral	Longitud de onda (λ, nm)	Rango de concentración (ppm)	R^2	Ecuación de la recta
Ca	423,0	1 − 10	0,999	y = 0,0457x - 0,0009
Mg	202,58	1 − 10	0.998	y = 0,0577x + 0,0176
Na	589,2	1 − 10	0,999	y = 0,0339x + 0,0240
K	404,4	2 − 20	0,996	y = 0,0211x + 0,0118
Fe	248,33	0,1 − 10	0,998	y = 0,0235x + 0,0007
Cu	324,8	0,1 − 10	0,998	y = 0,0484x + 0,0013
Mn	279,48	0,1 − 10	0,995	y = 0,0712x + 0,0084
Zn	213,86	0,1 − 5	0,994	y = 0,1326x + 0,0045

Valor Energético

La determinación del valor energético se calculó de acuerdo a la Reglamento 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. Dicho valor energético fue expresado en Kcal/100 g de porción comestible. Este valor energético se calculó a través de la **Ecuación 3.2**, con los correspondientes factores de conversión:

Energía (Kcal/100 g) = 4 × (g de hidratos de carbono totales disponibles) + 4 × (g de proteína) + 9 × (g grasa) + 3 × (g de ácidos orgánicos) + 2 × (g de fibra dietética)

Ecuación 3.2. Cálculo del valor energético en Kcal / 100g de fruta fresca.

3.3.3. Vitamina C y Ácidos Orgánicos

En las muestras objeto de análisis, se llevó a cabo la extracción de la vitamina C y ácidos orgánicos en medio ácido y posterior separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa con detección UV (Sánchez-Mata *et al.,* 2000).

Dado que el ácido dehidroascórbico (ADHA), prácticamente no absorbe en el UV, para su cuantificación por esta técnica, es necesario la reducción del ADHA a AA, utilizándose para ello diversos agentes reductores, como L-cisteína (Sánchez-Mata *et al*., 2012), homocisteína (Petersen y Berends, 1993), ditiotreitol (Esteve *et al*., 1997), u otros compuestos reductores con grupos tioles. En el presente trabajo se escogió la L-cisteína como agente reductor del ADHA, por su rapidez y eficacia en el mecanismo de reducción, llevándose a cabo la determinación de la vitamina C total.

Para la extracción, se tomó la porción fresca comestible homogeneizada, y se añadieron 25 mL de ácido metafosfórico al 4,5 % (p/v), se mantuvo bajo agitación en placa magnética (P-Selecta, Asincro) durante 15 minutos y en oscuridad. El extracto se filtró por filtro de papel Albet nº 1242; una alícuota de este extracto se filtró de nuevo por un filtro de membrana de 0,45 μ para posterior inyección en HPLC.

El equipo de HPLC (Micron Analítica, Madrid, España) empleado, está equipado con una bomba isocrática (modelo PU-II) y un inyector automático AS-1555 (Jasco, Japón). La separación se realizó con una columna ODS Sphereclone (2) 250 × 4,60, 5 μm Phenomenex, un detector de UV-visible (Thermo Separation Specta Serie UV100). La fase móvil empleada fue de 1,8 mM H_2SO_4 (pH = 2,6). Para el análisis de AA se empleó un flujo de 0,9 mL/min y λ de 245 nm. Mientras que la determinación de ácidos orgánicos se llevó a cabo a una longitud de onda de 215 nm con un flujo de 0,4 mL/min. Los datos fueron analizados mediante el software Biocrom 2000, 3.0.

La cuantificación del ácido ascórbico presente en las muestras, así como la cuantificación de los diferentes ácidos orgánicos (ácido oxálico (OX), ácido quínico (QUIN), ácido málico (AM), ácido isocítrico (AI), ácido cítrico (AC), y ácido fumárico (FU) se realizó comparando

las áreas obtenidas para las muestras analizadas con las obtenidas a partir de una recta patrón preparada diariamente.

La recta de calibrado para la determinación de vitamina C se preparó diariamente a partir de una disolución madre de ácido ascórbico en ácido metafosfórico con una concentración determinada de 1 mg/mL. (**Figura 3.8 y 3.9**).

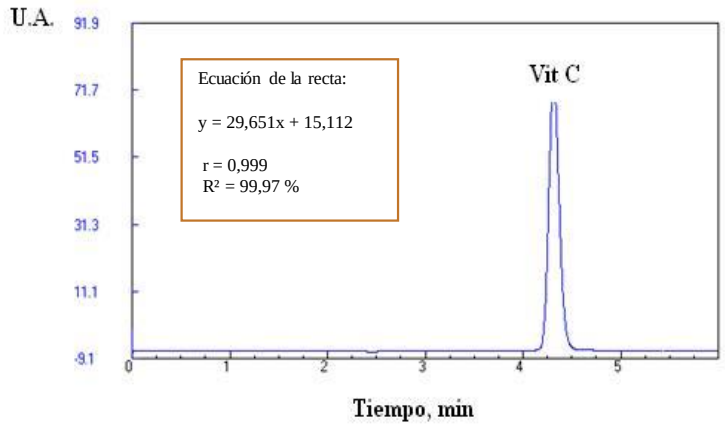


Figura 3.8. Ejemplo de cromatograma correspondiente al patrón de vitamina C (ácido ascórbico) empleado para la identificación y cuantificación de ácidos orgánicos presentes en las clementinas estudiadas.

En la siguiente figura se presenta un ejemplo de cromatograma correspondiente al patrón múltiple empleado para la determinación de los ácidos orgánicos presentes en las muestras analizadas.

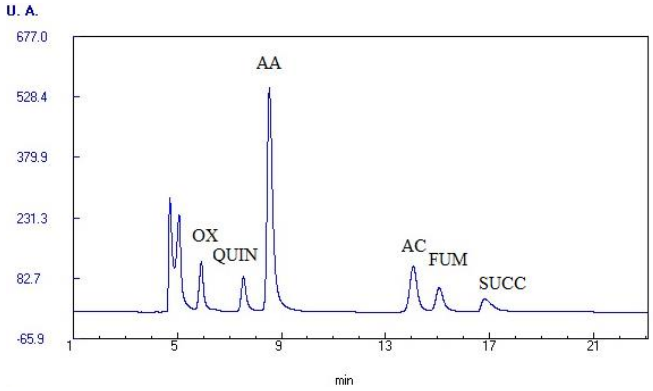


Figura 3.9. Cromatograma patrón múltiple empleado para la identificación y cuantificación de los ácidos orgánicos presentes en las muestras analizadas. OX: Oxálico; QUIN: Quínico; AM: Málico; AA: Ascórbico; AC: Cítrico; FU: Fumárico; SUCC: Succínico.

Tanto la vitamina C como el contenido en ácidos orgánicos se expresaron en mg/100 g de porción comestible.

3.3.4. Compuestos fenólicos

Para la determinación de compuestos fenólicos, se realizó una extracción y posterior purificación. Para la *extracción* de compuestos fenólicos se tomó 1 g de muestra liofilizada, se añadió 30 mL de mezcla metanólica, MeOH: H_2O (80:20, v/v), y se dejó una hora bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró a través de filtro de pliegues y se procedió a la re-extracción del residuo sólido en las mismas condiciones. La combinación de ambos extractos se llevó a sequedad mediante rotavapor a 40 °C. Para la *purificación* del extracto, se disolvió el extracto obtenido en 5 mL de H_2O destilada y se pasó a través de una columna C-18 de fase inversa AQUA® (5 μm, 150 x 4,6 mm; Phenomenex) termostatizada a 35 °C previamente activada con MeOH y H_2O destilada para eliminar los azúcares y otras sustancias polares. Posteriormente se evaporó en rotavapor para re-disolverlo de nuevo en 2 mL de mezcla H_2O:MeOH (80:20, v/v). El extracto se filtró a través de nylon de 0,22 μm para inyectarlo en HPLC.

Los compuestos fenólicos se determinaron por HPLC (Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EE.UU.) según la metodología descrita por Barros *et al*., (2013); Morales *et al*. (2016). La detección se llevó a cabo en un detector de diodo array (DAD), a longitud de onda de 280 nm, acoplado a un espectrómetro de masas (EM) conectado al sistema de HPLC a través de la salida de la célula DAD. La detección por espectrometría de masas se realizó por medio de un API 3200 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) con analizador de trampa de iones triple-cuadrupolo equipado con una fuente de electropulverización o *electrospray* de iones ESI. Los espectros se registraron en el modo de ión negativo entre *m/z* 100 y 1700.

Los compuestos fenólicos se identificaron mediante la comparación de su tiempo de retención, UV-visible y con los espectros de masa obtenidos a partir de soluciones estándar, siempre y cuando estén disponibles. En el caso de no contar con las disoluciones estándar,

los compuestos se identificaron tentativamente mediante su tiempo de retención y la comparación de la información obtenida con los datos disponibles en la biblioteca de compuestos o los descritos en la literatura.

La cuantificación del compuesto se realizó a través de la curva de calibración del patrón fenólico del mismo grupo. El análisis cuantitativo, se realizó a través de curvas de calibración analizadas a 280 nm frente a concentraciones conocidas (1 − 100 mg/mL) de los patrones de compuestos fenólicos, es decir, 1- ácido sinápico (y=270.42x+62.29; R^2=0.999); 2- ácido ferúlico (y=525.36x+233.82; R^2=0.999); 3- ácido cafeico (y=359.01x+488.40; R^2=0.998); 4- apigenina-6-C-glucósido (y=179.52x+116.83; R^2=0.999); 5- naringenina (y=539.98x+161.46; R^2=0.995); 6- luteolina-6-C-glucósido (y=423.95x+91.13; R^2=0.999); 7- ácido cinámico y=1979x+787.15; R^2=0.994); 8-quercetina-3-O-rutinósido (y=280.87x+373.73; R^2=0.998); 9-hesperetina (y=792.22x-76.88; R^2=0.999); 10-kaempferol-3-O-rutinósido (y=182.94x+96.64; R^2=0.999). Los resultados se expresaron en mg/100 g de porción comestible.

3.3.5. Vitamina E. Tocoferoles

El contenido de tocoferoles se determinó siguiendo un procedimiento previamente optimizado y descrito por Barros *et al.* (2012).

Se realizó una extracción en n-hexano partiendo de muestra liofilizada, a la que se le adicionó 100 µL de solución de BHT (butilhidroxitolueno) en n-hexano (10 mg/mL) y 250 µL de patrón interno (PI) compuesto por una solución de tocol en hexano (2,0 mg/mL). Posteriormente, se homogeneizó con 4 mL de metanol, agitando vigorosamente mediante vórtex durante 1 minuto aproximadamente.

Una vez obtenida la solución de partida, se procedió a la extracción, adicionando 4 mL de n-hexano seguido de homogeneización durante un minuto. A continuación, se adicionaron 2 mL de solución saturada de NaCl en agua destilada para favorecer la migración de los tocoferoles a la fase orgánica (n-hexano). La mezcla fue homogeneizada durante 1 minuto y

posteriormente centrifugada a baja temperatura durante 5 minutos a 6185 r.p.m. (Centrífuga refrigerada Centurion K24OR-2003), la capa superior fue transferida cuidadosamente a un vial, repitiéndose el proceso de extracción 2 veces más a partir del residuo obtenido tras la centrifugación. Todo el proceso se llevó a cabo a baja una temperatura de 10 °C y en recipientes de topacio para evitar la degradación de los tocoferoles.

La combinación de los extractos se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno, y posteriormente fueron redisueltos en 1 mL de n-hexano previamente deshidratado con sulfato de sodio anhidro. Se filtró a través de un filtro de nylon de 0,22 μm y se transfirió a un vial topacio para su posterior análisis por HPLC-FL.

El equipo cromatográfico (HPLC) está compuesto por una Bomba isocrática de Smartline 1000 (Knauer, Alemania), con sistema desgasificador Smartline manager 5000, un inyector automático AS2057 y un detector de ultravioleta 2500 UV a una longitud de onda de 295 nm (Knauer, Alemania) conectado en serie con un detector de fluorescencia FP2020 (Jasco, Japon) programado con una λ de excitación a 290 nm y una λ de emisión a 330 nm. La columna utilizada fue de fase normal 250 mm x 4,6 mm, 5 μm, Poliamida II, con un diámetro interno pre-columna del mismo material de 10 mm x 4 mm, (YMC Waters, Dinslaken, Alemania), que opera a 30 ° C. Software: DataApex, 2.4 Software. La fase móvil utilizada fue una mezcla de n-hexano y acetato de etilo (70:30, v/v) a una velocidad de flujo de 1 mL/min.

La identificación (**Figura 3.10**) de las cuatro isoformas de tocoferoles (α, β, γ y δ - tocoferol) se realizó comparando los tiempos de retención relativos de los picos de la muestra con los patrones utilizados (α y δ tocoferol SIGMA®; β y γ – tocoferol y el tocol de METRAYA®). Se empleó un patrón interno, Tocol, de concentración conocida para comprobar el normal funcionamiento del proceso. La cuantificación se basa en la respuesta de la señal de fluorescencia, utilizando el método de patrón interno. Se realizó mediante la comparación de áreas obtenidas a partir de las rectas de calibrado realizadas con los patrones de cada una de las isoformas analizadas, el rango de concentraciones fue de 0,25 − 8 μg/mL, y se obtuvieron las rectas de calibrado con R^2 superiores al 99,9 % en todos los casos. Los valores se expresan en mg/100 g de porción comestible.

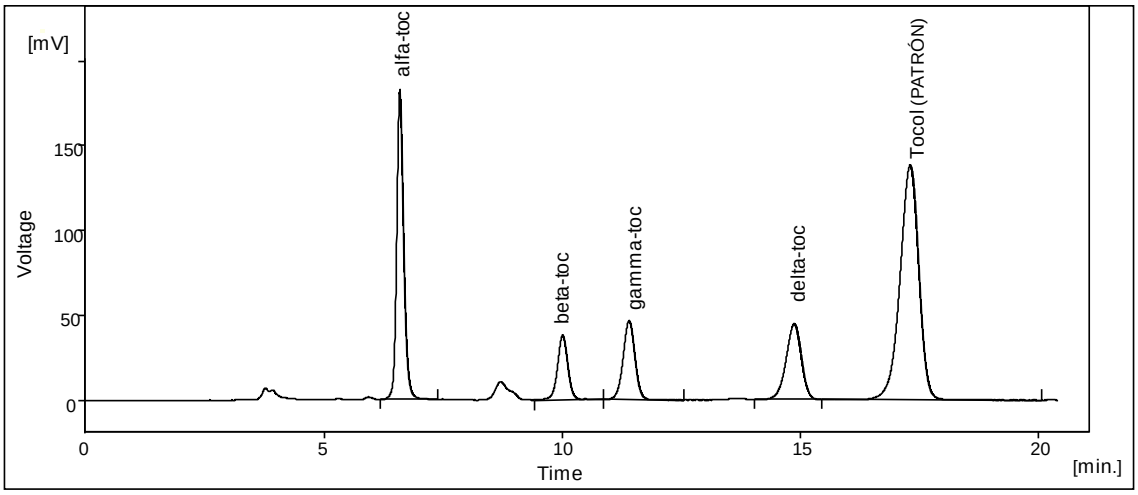


Figura 3.10. Perfil cromatográfico del patrón múltiple de todas las isoformas α, β, γ y δ – tocoferol junto con el patrón interno (Tocol).

3.3.6. Actividad Antioxidante *in vitro*

Existen varias metodologías para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, aunque no existe consenso en cuanto al método universal que pueda medir la capacidad antioxidante de todas las muestras de forma precisa y cuantitativa debido a la presencia de compuestos de diferente solubilidad, y al hecho de realizar la actividad sobre diferentes sistemas oxidativos (Prior *et al*., 2005).

En este trabajo se realizó la valoración de capacidad antioxidante *in vitro* de las muestras analizadas a partir del extracto metanólico previamente descrito en el apartado 4.3.5., evaluando la capacidad antioxidante total y la inhibición de la peroxidación lipídica. Los métodos escogidos en el presente trabajo fueron (Morales *et al.,* 2012):

- Método de DPPH
- Método del poder reductor ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$)
- Método de inhibición de la decoloración del β-caroteno

En la discusión de los datos relativos a la capacidad antioxidante *in vitro*, emplearemos el parámetro EC_{50} (**Ecuación 3.3**) correspondiente a la concentración del extracto metanólico

capaz de inhibir el 50% de cualquier proceso oxidativo, incluyendo los correspondientes a la cadena de radicales libres y/o al proceso de peroxidación lipídica (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998).

Para calcular la concentración inhibitoria 50 % (EC_{50}, mg/mL), se empleó la siguiente ecuación:

$$\mathbf{EC_{50} = [(x_2 - x_1) / (y_2 - y_1)] \times (50 - y_1) + x_1}$$

Ecuación 3.3. Cálculo de la concentración inhibitoria del 50%.

Donde:

- X_1: concentración (mg/mL) de extracto cuyo porcentaje de inhibición es inferior al 50%
- X_2: concentración (mg/mL) de extracto cuyo porcentaje de inhibición es superior al 50%
- Y_1: porcentaje inhibitorio inferior al 50%
- Y_2: porcentaje inhibitorio superior al 50%

Método DPPH:

Este método se basa en la estabilidad del radical orgánico 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), la cual se atribuye a la deslocalización del electrón desapareado, esta deslocalización también le otorga una coloración violeta caracterizada por su banda de absorción. Cuando una disolución de DPPH entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno o con otra especie radical ($R^{\cdot}$) se produce la forma reducida DPPH-H o DPPH-R con la consecuente pérdida del color y por lo tanto la pérdida de la absorbancia (**Figura 3.11**). Es decir, dicho método evalúa el grado de captura de dicho radical, en presencia del agente antioxidante (Brand-Williams *et al*., 1995), valorándose espectrofotométricamente la decoloración del reactivo radicalario, a una longitud de onda definida de 515 nm.

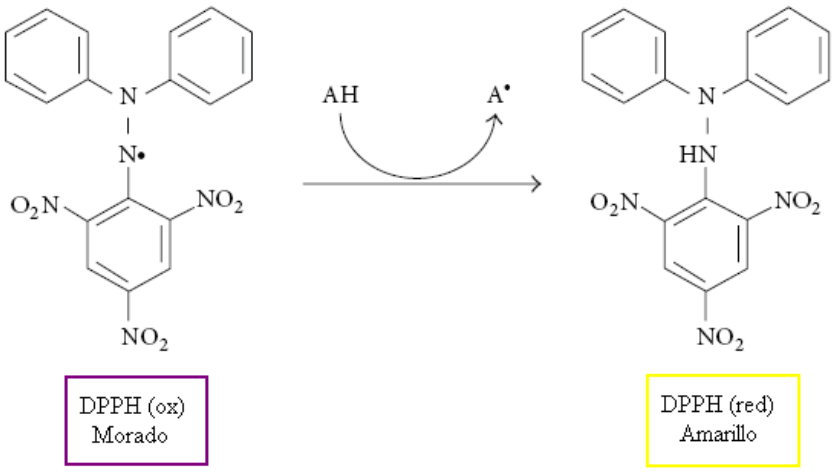


Figura 3.11. Principio de ensayo de la capacidad de captación de radicales DPPH. Elaboración propia.

Según el método descrito previamente por Hatano *et al*. (1986) y posteriormente modificado por Barros *et al*. (2008), la reacción fue llevada a cabo en microplacas de 96 pocillos (**Figura 3.12**). En cada uno de los cuales se adicionaron 30 µL de las diferentes muestras objeto de estudio, empleándose 6 diluciones en total para cada una de ellas, el blanco empleado fue metanol.

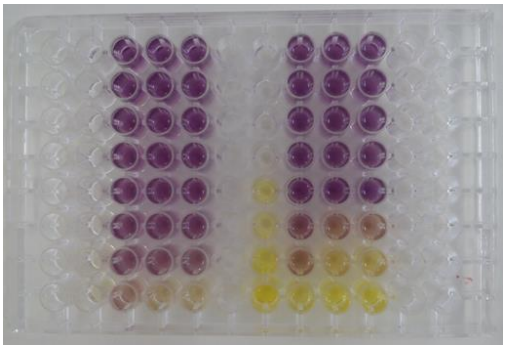


Figura 3.12: Placa ensayo DPPH.

A continuación, se adicionó 270 µL de una disolución de DPPH en metanol ($6x10^{-5}$ mol/L), y la mezcla se dejó incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, para posteriormente evaluar la reducción de los radicales DPPH, midiendo su absorbancia a 515 nm mediante un lector de microplacas (Bio – Tek Instruments, Inc.). Los resultados obtenidos fueron expresados en EC_{50} mg/mL.

Método del poder reductor ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$)

El método se basa en la evaluación de la capacidad de los compuestos antioxidantes de reducir el hierro (Fe^{3+} a Fe^{2+}), midiéndose para ello el cambio de coloración producido en el ligando cromogénico, selectivamente unido al anión férrico.

$$2_n\,[Fe(CN)_6]^{3+} + Ar\,(OH)_n \rightarrow 2_n[Fe(CN)_6]^{4-} + Ar(=O)_n + 2_nH^+[Fe(CN)_6]^{4-} + Fe^{3+} \rightarrow Fe[Fe(CN)_6]$$

La especie oxidante Fe^{3+}- L, ferrocianina: $Fe(CN)_6^{3-}$, en presencia de compuestos antioxidantes [$Ar(OH)_n$], dará lugar a la reducción de la ferrocianina ($[Fe(CN)_6]^{4-}$) y al antioxidante oxidado [$Ar(=O)_n$], una vez estabilizada la ferrocianina mediante $Fe^{3+}(FeCl_2)$, ésta actuará como compuesto cromógeno (azul Prusia). La coloración producida se mide espectrofotométricamente a 690 nm (Berker *et al*., 2010).

Para ello, según la metodología descrita por Barros *et al*. (2010b), se emplearon diferentes concentraciones de los extractos metanólicos de las muestras. Diferentes alícuotas de 0,5 mL de cada concentración se mezclaron con 0,5 mL de buffer sodio fosfato (200 mmol/L, pH 6,6) y 0,5 mL de ferrocianuro potásico (1% p/v, en agua destilada). La mezcla fue incubada durante 20 minutos a 50 ºC, empleándose 0,5 mL de ácido tricloroacético (10% p/v, en agua) para frenar la reacción.

Posteriormente, una alícuota (0,8 mL) de la mezcla fue transferida a cada pocillo (en microplacas de 48 pocillos, (**Figura 3.13**), se adicionó 0,8 mL de agua desionizada y 0,16 mL de cloruro férrico (0,1% p/v), midiéndose la absorbancia a 690 nm mediante un lector de microplaca (Bio – Tek Instruments, Inc.).

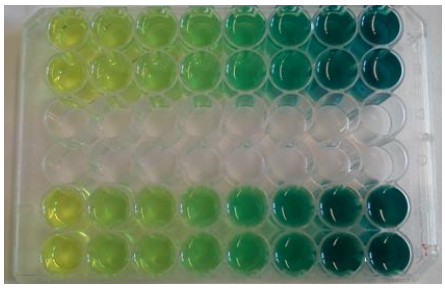


Figura 3.13. Placa ensayo poder reductor.

La actividad anti-radicalaria del poder reductor, se calcula a partir de la diferencia de absorbancias entre el blanco y la muestra del problema. Posteriormente, se calculó la correspondiente EC_{50} para cada extracto, en el caso del presente ensayo, la concentración inhibitoria 50 (EC_{50}) es aquella que proporciona una absorbancia de 0,5.

Método de Inhibición de la decoloración del β-caroteno

El ensayo de decoloración del β-caroteno implica la medición de la decoloración del β-caroteno a 470 nm por acción de los productos derivados del proceso de oxidación del ácido linoleico (Laguerre *et al*., 2007).

Para ello es necesario el empleo de una emulsión formada por ácido linoleico y β-caroteno utilizando el Tween-80 para favorecer la dispersión de dichos compuestos.

La oxidación del ácido linoleico es inespecífica y catalizada por el calor (50 ºC). La adición de extractos que contengan compuestos antioxidantes, favorece el retraso de la decoloración del β-caroteno por inhibición de la oxidación del ácido linoleico (Laguerre *et al*., 2007). Teniendo lugar las siguientes reacciones:

$$\text{β-caroteno-H (naranja)} + \text{ROO}^{\bullet} \rightarrow \text{β-caroteno}^{\bullet}\text{ (decolorado)} + \text{ROOH}$$

$$\text{β-caroteno-H (naranja)} + \text{ROO}^{\bullet} + \text{AH} \rightarrow \text{β-caroteno-H (naranja)} + \text{ROOH} + \text{A}^{\bullet}$$

Donde:

- $\text{ROO}^{\bullet}$ es el radical del ácido linoleico
- AH el compuesto antioxidante presente en la muestra
- $\text{A}^{\bullet}$ dicho compuesto antioxidante oxidado.

Según Barros *et al*. (2010b), se debe preparar previamente una solución de β-caroteno, añadiéndose 2 mL de β-caroteno (2 mg/10 mL de cloroformo) en un matraz piriforme, para

la posterior evaporación del cloroformo (mediante rotavapor a 40ºC). Tras este proceso se añadieron 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de emulsificante Tween-80 y agua destilada (100 mL), homogeneizándose por agitación vigorosa. Una alícuota (4,8 mL) de la emulsión fue transferida en diferentes tubos, a los cuales previamente se les adicionó alícuotas de (0,2 mL) de las diferentes concentraciones del extracto.

Los tubos fueron agitados (vórtex) e incubados al baño maría a 50 °C durante 120 min (**Figura 3.14**). Una vez que la emulsión fue adicionada a cada uno de los tubos, se determinó espectrofotométricamente (λ =470 nm) la decoloración de la solución a tiempo 0 (T_0) y tras el periodo de incubación de 120 minutos (T_{120}), empleándose como blanco una solución de β-caroteno.

La inhibición de la decoloración del β-caroteno (I. D. β-caroteno) fue calculada empleando la siguiente ecuación:

I.D. β-caroteno = (contenido de β-caroteno a T_{120} respecto al contenido a T_0) x 100

Ecuación 3.4. Cálculo de la inhibición de la decoloración del β – caroteno.

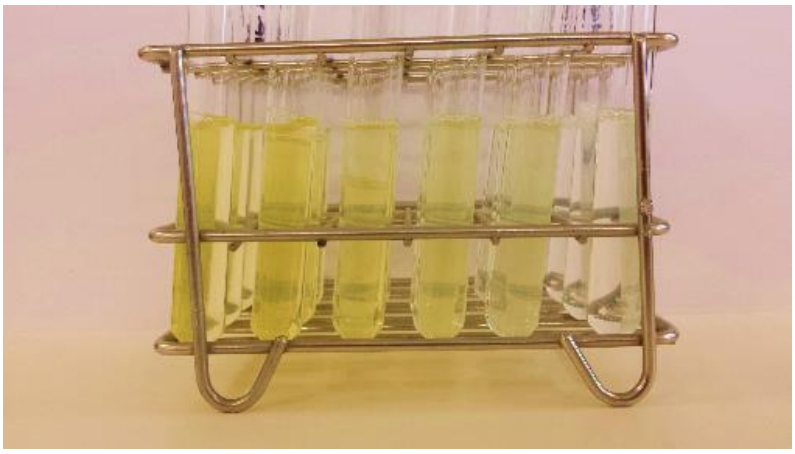


Figura 3.14. Tubos con las diferentes decoloraciones obtenidos a través del método de Inhibición de la decoloración del β-caroteno

3.3.7. Análisis estadístico

Análisis de la varianza

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo con el programa *Statgraphics Centurion XVII.II - X64*. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA), potente herramienta estadística que proporciona un análisis de la varianza total, con el fin de determinar si existen o no diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas, empleando un intervalo mínimo de confianza del 95% (se considera que existen dichas diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$). Para poder determinar cuáles de las variables identificadas en el análisis ANOVA, presentan diferencias estadísticamente significativas se utilizó un test de rango múltiple (Test de Tukey), que tiene como objeto profundizar en la variabilidad de los resultados a un nivel de confianza mínimo del 95% para poder distinguir los grupos homogéneos entre sí.

Correlación de Pearson

Con el fin de estudiar la posible asociación entre dos variables continuas, se empleó el método de las correlaciones. Estas asociaciones se evalúan mediante un coeficiente de correlación (r) que es una medida que muestra el grado de asociación entre las variables. Las matrices de correlaciones generadas, muestran el coeficiente de correlación obtenido entre cada par de variables, cuyo rango (-1 a +1) mide la fuerza de relación lineal entre las variables y arroja el autovalor que permite valorar la significación de las correlaciones estimadas, de modo que *p*-valores por debajo de 0,05 indican una importancia estadística de correlaciones no-cero para un nivel de confianza del 95%. El coeficiente de correlación de Pearson, es un índice que mide el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente. Adviértase que decimos "variables relacionadas linealmente". Esto significa que puede haber variables fuertemente relacionadas, pero no de forma lineal, en cuyo caso no procede a aplicarse la correlación de Pearson.

Análisis de componentes principales

Para completar la comparación entre las muestras de objeto de estudio de la presente tesis doctoral, se ha llevado a cabo el Análisis de Componentes Principales (PCA), lo que permite explicar un determinado porcentaje de la varianza, de forma, que cuantos menos componentes se necesiten para explicar la varianza, mejores resultados obtendremos de este

análisis. El análisis de componentes principales establece combinaciones lineales entre variables, considerándose como variables a todos los parámetros analizados que van a caracterizar las muestras bajo estudio y como “componentes” a unas nuevas variables linealmente independientes entre sí, que se denominan componentes principales de manera que unas pocas variables (componentes principales) permitirán caracterizar dichas muestras, ya que cada componente principal está basada en la combinación de distintas variables correlacionadas entre sí.

3.4. INFLUENCIA DEL ESTADO DE MADURACIÓN EN LA COMPOSICIÓN DE CLEMENTINAS

El estudio de la influencia de la maduración de las clementinas se ha ralizado comparando el estado de maduración intermedio (E1) y el estado de maduración organoléptico/comercial (E2) para una misma variedad, teniendo en cuenta dos temporadas de recolección correspondientes a los años 2012 y 2013.

Parámetros físico-químicos analizados en las clementinas

Los principales parámetros que determinan la calidad organoléptica de las frutas son el pH y la acidez titulable, así como los grados Brix, puesto que son indicadores del contenido de sólidos solubles totales como los azúcares y ácidos orgánicos presentes en dichas frutas.

Los resultados obtenidos para los **parámetros físico-químicos** indicadores de la calidad de las clementinas objeto de estudio en la presente tesis doctoral (pH, acidez titulable, ºBrix e índice de madurez), teniendo en cuenta las dos variables mencionadas anteriormente (temporada de recolección y estado de madurez), se muestran en la **Tabla 3.3**.

Los valores de pH para todas las clementinas estudiadas oscilaron en un rango reducido (2,81 – 3,30), aunque se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para cada temporada en las variedades Clemenrubí y Clemensoon, mientras que la variedad Basol mostró valores similares y homogéneos entre los diferentes estados de maduración (E1 y E2).

En cuanto a la **acidez titulable** de las muestras objeto de estudio, se observó una ligera variabilidad de los resultados (11,63 – 15,86 mL de NaOH/100 gramos de porción comestible, para Basol y Clemensoon respectivamente). Comparando los resultados obtenidos entre los diferentes estados de maduración, en general se observó un descenso de la acidez conforme aumentaba el grado de madurez.

Tabla 3.3. Parámetros físico-químicos en las variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración (E1 y E2).

Variedades	Temporada	Estado de maduración	pH	AT*	°Brix	IM**
Basol	2012	E1	3,04 ± 0,01a	13,89 ± 0,27b	11,23 ± 0,12a	13,14 ± 0,90a
		E2	3,07 ± 0,02a	11,63 ± 0,12a	11,90 ± 0,00b	16,08 ± 0,20b
	2013	E1	3,02 ± 0,01a	14,10 ± 0,04b	12,61 ± 0,10a	13,99 ± 0,63a
		E2	3,03 ± 0,01a	12,95 ± 0,04a	14,80 ± 0,00b	17,85 ± 0,06b
Clemenrubí	2012	E1	3,17 ± 0,01b	12,80 ± 0,27b	12,47 ± 0,06a	13,71 ± 0,22a
		E2	3,03 ± 0,01a	11,76 ± 0,19a	13,20 ± 0,01b	15,44 ± 0,69b
	2013	E1	2,90 ± 0,05a	14,05 ± 0,34b	11,53 ± 0,12a	12,83 ± 0,34a
		E2	3,30 ± 0,02b	11,93 ± 0,67a	14,83 ± 0,06b	19,47 ± 1,00b
Clemensoon	2012	E1	3,14 ± 0,04b	15,43 ± 0,14b	11,97 ± 0,06a	11,37 ± 0,11a
		E2	3,03 ± 0,02a	12,61 ± 0,20a	13,11 ± 0,00b	14,75 ± 0,23b
	2013	E1	2,81 ± 0,03a	15,86 ± 0,83b	13,23 ± 0,06a	13,06 ± 0,74a
		E2	3,20 ± 0,01b	12,85 ± 0,33a	13,20 ± 0,00a	16,06 ± 0,41b

*AT: Acidez titulable medida en mL de NaOH 0,1 N / 100 g de porción comestible. **IM: Índice de madurez expresado como ºBrix/AT en g de ácido cítrico/L. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptico. En cada columna (entre temporadas para cada variedad) las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Sin embargo, al realizar el estudio comparativo de la influencia del estado de madurez sobre el pH con independencia de la temporada de recolección, se observaron valores similares y homogéneos para todas las variedades estudiadas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Esto significaría que el efecto de la temporada es más fuerte que el efecto del proceso de maduración para cada una de las mismas. Mientras que para la acidez si se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) destacando la variedad Clemensoon tal y como se puede observar en la **Figura 3.16**, con un descenso de la acidez de hasta un 19 % entre ambos estados de madurez.

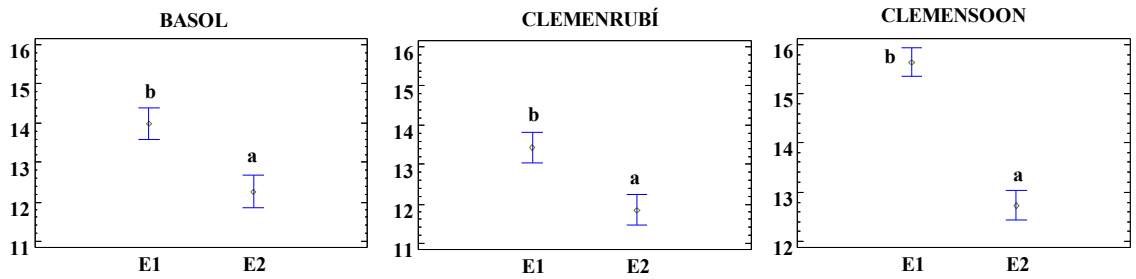


Figura 3.16. Test de Tukey sobre la influencia del estado de maduración en la acidez titulable (mL NaOH 0,1 N/100g) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Otro de los principales parámetros estudiados relacionado con la calidad organoléptica en las clementinas, y que determina la madurez de las mismas, es el contenido de **sólidos solubles** totales (°Brix), que es indicativo en parte del dulzor de las mismas, debido fundamentalmente a que el 80% de éstos corresponde a los azúcares solubles (Kimball, 1999), un 10% correspondería al ácido cítrico y sus sales, y el resto correspondería a compuestos nitrogenados, vitaminas, elementos minerales y otras substancias solubles en agua como veremos más adelante en este capítulo (Bartholomew y Sinclair, 1943). Se obtuvieron valores para los grados Brix que oscilaron entre 11,23 – 14,83 (**Tabla 3.3**) dependiendo de la variedad, la temporada y estado de maduración.

En general, el contenido de sólidos solubles para todas las clementinas estudiadas, aumentó a medida que aumentó el grado de madurez (**Figura 3.17**), excepto para el caso de la variedad Clemensoon recolectada en la temporada 2013, la cual mostró valores relativamente constantes entre ambos estados de madurez.

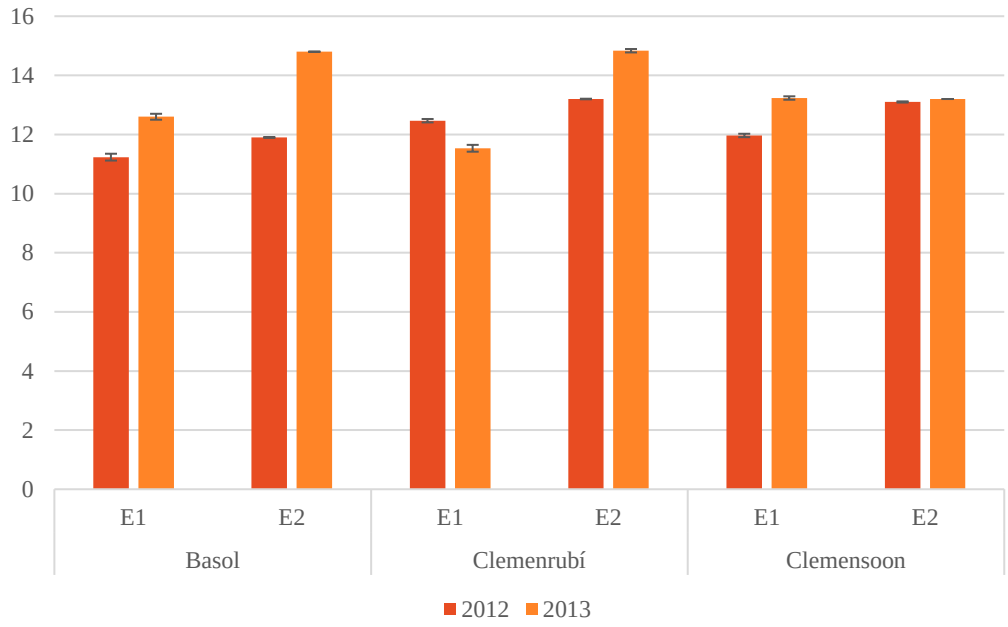


Figura 3.17. Valores medios de °Brix para las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas por temporada y estado de maduración (E1 y E2)

Comparando estos resultados de sólidos solubles en base a los diferentes estados de madurez, con independencia de la temporada de recolección, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para la variedad Clemenrubí, la cual presentó un incremento de hasta el 22 % entre ambos estados de madurez (**Figura 3.18**).

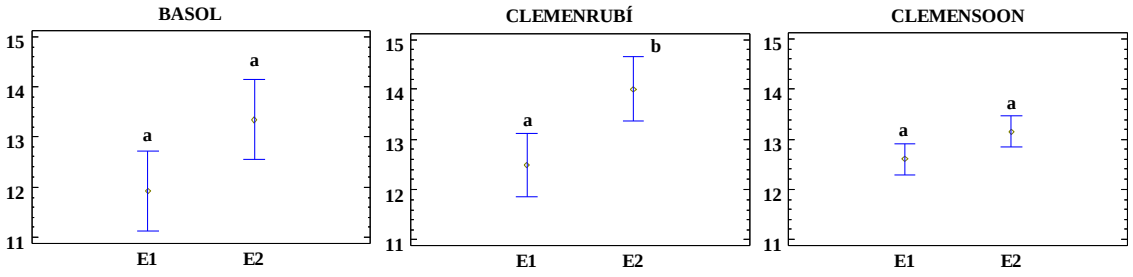


Figura 3.18. Test de Tukey sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de sólidos solubles (ºBrix) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Las diferencias podrían deberse al propio proceso de maduración, así como de las diferentes condiciones ambientales entre años de recolección que influyen sobre este proceso, principalmente la temperatura y la humedad del suelo (Agustí *et al*., 1998). Las temperaturas medias más elevadas proporcionan las mayores tasas de crecimiento de las clementinas y las

más bajas proporcionan tasas de crecimiento inferiores. Sin embargo, una humedad edáfica adecuada, bien sea por lluvias o riego, mejora significativamente el tamaño de las clementinas durante la fase de crecimiento y maduración (Albrigo, 1992, 1993; Davies y Albrigo 1994; Agustí *et al*., 2003; Cercós *et al*., 2006). Además, existen otros estudios que evidencian el efecto de la intensidad luminosa sobre los sólidos solubles totales, de modo que, una baja intensidad luminosa contribuye a reducir los contenidos de sólidos solubles totales (Sites y Reitz, 1949; García *et al*., 1985; Agustí *et al*., 2003; Cercós *et al*., 2006).

La relación dulzor/acidez, determina el índice de madurez de las clementinas estudiadas, tal y como podemos observar en la **Figura 3.19**, todas las variedades de clementinas estudiadas mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambos estados de maduración, con independencia de la variable temporada, lo cual confirma la idoneidad del muestreo realizado.

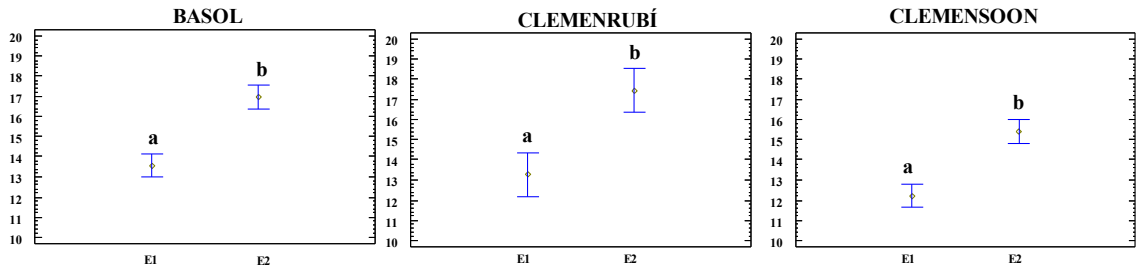


Figura 3.19. Test de Tukey sobre la influencia del estado de maduración en el índice de madurez (IM) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Composición nutricional en las clementinas

La **Tabla 3.4** recoge los datos de composición centesimal, correspondientes a la humedad, fracción hidrocarbonada, que en el caso de las clementinas consta de azúcares solubles y fibra fundamentalmente, junto con el contenido en proteína bruta, grasa y contenido en cenizas, además del valor calórico de las clementinas extra precoces estudiadas. Como cabría esperar para este tipo de frutas, el componente mayoritario de las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas fue el agua, presentando contenidos relativamente elevados, en un rango reducido que osciló entre 84,92 – 87,76 g/100 g.

En general, el estudio comparativo entre los diferentes estados de madurez para cada variedad y temporada de recolección, mostró diferencias estadísticamente significativas (*p*

$< 0,05$) relativas a su **contenido acuoso**. Según diferentes autores la mayor parte del aumento en peso fresco del fruto es debida precisamente a la acumulación de agua, y su contenido está estrechamente relacionado con el proceso de maduración, puesto que dicho contenido es máximo inmediatamente antes o en el momento de la maduración organoléptica (Guardiola, 1992; Cercós *et al*., 2006). Sin embargo, ateniendo exclusivamente a la influencia del proceso de maduración, sin tener en cuenta la temporada de recolección, se encontraron valores similares y homogéneos con respecto al contenido acuoso para cada una de las tres variedades de clementinas estudiadas, lo cual indicaría que el rango de variación para dicho parámetro entre temporadas no se ve influenciado por el proceso de maduración.

La segunda fracción mayoritaria de las variedades de clementinas analizadas, son los **azúcares totales** (**Tabla 3.4**). En general, el contenido de azúcares totales aumentó con respecto al grado de maduración, mostrando las clementinas los contenidos más elevados para el estado de maduración organoléptico (E2), correspondiéndose estos resultados con los obtenidos en la determinación de grados Brix (**Tabla 3.3**). En este sentido, destaca la variedad Clemensoon por presentar el contenido más elevado (13,47 g azúcares totales/100 g de porción comestible), por tanto, sería la clementina más dulce de entre las variedades de clementinas estudiadas.

El estudio comparativo sobre el contenido de azúcares totales (**Figura 3.20**) para cada variedad de clementinas con independencia de la temporada de recolección, mostró la existencia de una influencia clara del estado de maduración, encontrándose en todas las variedades estudiadas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes grados de madurez.

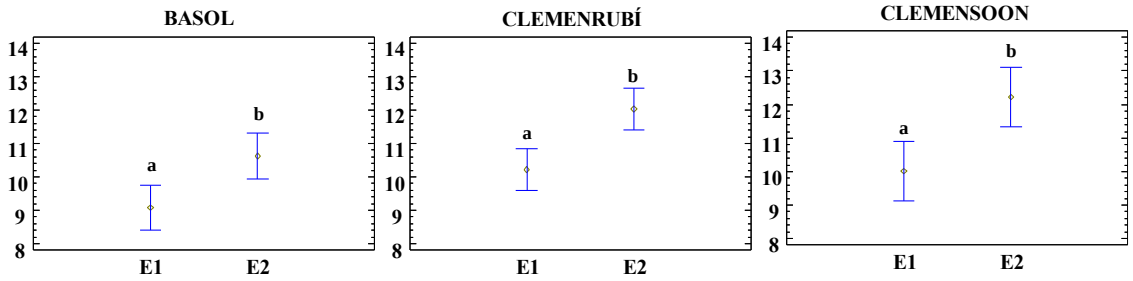


Figura 3.20. Test de Tukey sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de azúcares totales (g/100 g) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 3.4. Composición centesimal (g/100 g de porción comestible) y valor calórico (Kcal/100 g de porción comestible) de variedades extra precoces de clementinas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración

Variedad	Año	Estado Maduración	Humedad	Azúcares Totales	Fibra Total	Proteínas	Grasa	Cenizas	Valor Calórico
Basol	2012	E1	87,05 ± 0,07a	8,59 ± 0,12a	2,18 ± 0,11a	1,31 ± 0,04b	0,05 ± 0,03a	0,27 ± 0,01a	44,45 ± 1,10a
		E2	87,76 ± 0,29b	9,38 ± 0,03b	2,13 ± 0,05a	1,23 ± 0,01a	0,07 ± 0,01a	0,34 ± 0,01b	47,23 ± 0,37b
	2013	E1	86,37 ± 0,20b	9,58 ± 0,26a	3,15 ± 0,26a	1,40 ± 0,03b	0,05 ± 0,03a	0,31 ± 0,03b	50,69 ± 1,93a
		E2	84,92 ± 0,07a	10,71±0,17b	3,45 ± 0,21a	1,23 ± 0,02a	0,08 ± 0,02a	0,25 ± 0,02a	55,35 ± 1,31b
Clemenrubí	2012	E1	85,31 ± 0,22b	11,13±0,03a	2,37 ± 0,12a	1,62 ± 0,11a	0,04 ± 0,01a	0,42 ± 0,01b	56,06 ± 0,87a
		E2	84,99 ± 0,08a	12,86±0,04b	2,36 ± 0,22a	1,65 ± 0,07a	0,05 ± 0,00a	0,37 ± 0,00a	63,16 ± 0,92b
	2013	E1	87,05 ± 0,01b	9,30 ± 0,11a	1,47 ± 0,11a	1,41 ± 0,06a	0,03 ± 0,01a	0,26 ± 0,03a	46,06 ± 0,94a
		E2	86,31 ± 0,15a	10,61±0,01b	2,98 ± 0,26b	1,34 ± 0,02a	0,04 ± 0,00a	0,27 ± 0,00a	54,16 ± 0,69b
Clemensoon	2012	E1	86,70 ± 0,19b	10,17±0,02a	2,63 ± 0,12b	1,68 ± 0,08a	0,04 ±0,01a	0,41 ± 0,01b	52,98 ± 0,72a
		E2	86,04 ± 0,33a	10,47±0,01a	2,18 ± 0,10a	1,60 ± 0,01a	0,04 ± 0,00a	0,31 ± 0,01a	52,97 ± 0,30a
	2013	E1	86,90 ± 0,39a	9,85 ± 0,68a	2,03 ± 0,19a	1,41 ± 0,05b	0,04 ± 0,01a	0,30 ± 0,01a	49,43 ± 3,38a
		E2	86,38 ± 0,14a	13,47±0,52b	2,71 ± 0,24b	1,24 ± 0,05a	0,04 ± 0,00a	0,31 ± 0,00a	64,58 ± 2,78b

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptica. En cada columna (entre temporadas para cada variedad), las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Así pues, tal y como se observa en la **Tabla 3.5** los mayores contenidos totales de azúcares solubles totales en un rango de 9,38 – 13,98 g/100g, en Basol y Clemensoon, respectivamente, se observaron en el estado de maduración organoléptico (E2).

Tabla 3.5. Contenido en azúcares solubles (g/100 g de porción comestible) de las variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración (E1 y E2).

Variedad	Año	Estado Maduración	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Azúcares Totales
Basol	2012	E1	2,11 ± 0,13a	2,02 ± 0,14a	4,46 ± 0,29a	8,59 ± 0,12a
		E2	2,36 ± 0,04b	2,27 ± 0,02b	4,75 ± 0,07a	9,38 ± 0,03b
	2013	E1	2,51 ± 0,07a	2,56 ± 0,07a	4,51 ± 0,12a	9,58 ± 0,26a
		E2	2,88 ± 0,05b	2,90 ± 0,04b	4,93 ± 0,07b	11,84 ± 0,17b
Clemenrubí	2012	E1	2,78 ± 0,05a	2,81 ± 0,06a	5,54 ± 0,07a	11,13 ± 0,03a
		E2	3,19 ± 0,06b	3,22 ± 0,05b	6,45 ± 0,11b	12,86 ± 0,04b
	2013	E1	2,41 ± 0,04a	1,47 ± 0,02a	4,43 ± 0,05a	9,30 ± 0,11a
		E2	2,64 ± 0,01b	2,63 ± 0,02b	5,34 ± 0,02b	11,21 ± 0,01b
Clemensoon	2012	E1	2,44 ± 0,02a	2,45 ± 0,03a	5,28 ± 0,04a	10,17 ± 0,02a
		E2	2,40 ± 0,00a	2,37 ± 0,02b	5,70 ± 0,01b	10,47 ± 0,01b
	2013	E1	2,31 ± 0,17a	2,30 ± 0,12a	5,24 ± 0,38a	9,85 ± 0,68a
		E2	3,59 ± 0,13b	3,50 ± 0,13b	6,38 ± 0,24b	13,98 ± 0,52b

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedia; E2: estado de maduración organoléptica. En cada columna (entre temporadas para cada variedad), las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

En las variedades tempranas como es el caso de las clementinas objeto de estudio, el contenido en azúcares aumenta rápidamente a medida que el fruto madura, debido sobre todo a la acumulación de sacarosa. Las clementinas continúan su maduración cuando la temperatura desciende, a diferencia de las variedades tardías en las cuales el periodo de maduración se da cuando la temperatura tiende a elevarse, y la sacarosa aumenta su contenido en el fruto relativamente poco (Agustí *et al*., 2003).

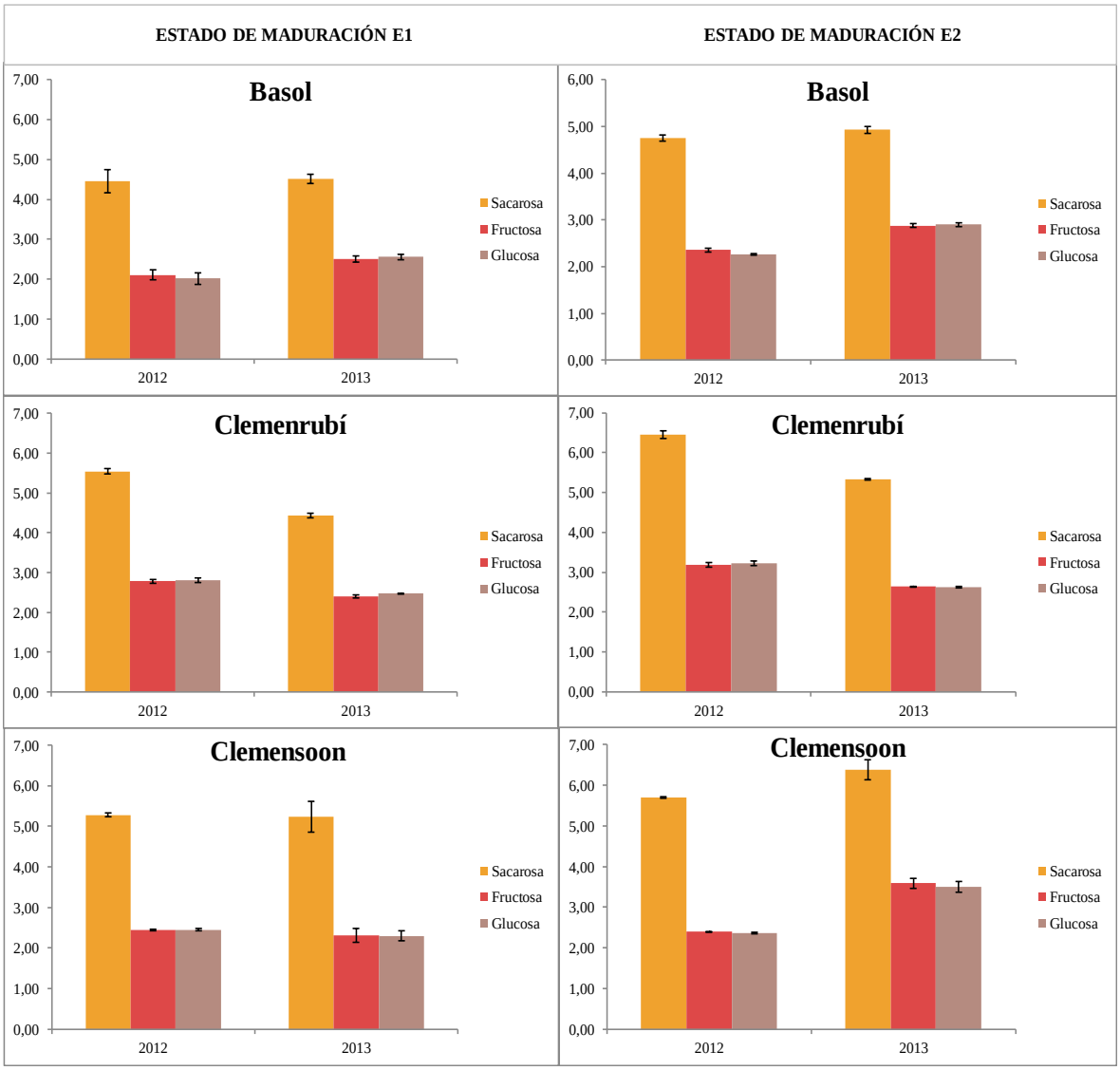


Figura 3.21. Distribución de azúcares solubles en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2). Cantidades expresadas en g de azúcar/100 g de porción comestible.

Como cabría esperar, la evolución de los **azúcares solubles individuales** en el proceso de maduración, siguió la misma tendencia que los azúcares totales, mostrando diferencias

estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los distintos estados de maduración, siendo en el estado de maduración organoléptica (E2) donde se observaron los valores más elevados, aumentando su contenido total hasta un 61 % tal y como ocurrió en el caso de la variedad Basol.

Dichos azúcares solubles individuales, representan la mayor contribución a la fracción hidrocarbonada total en las muestras objeto de estudio y son los responsables de las propiedades organolépticas en cuanto a la relación dulzor/acidez tal y como se ha indicado anteriormente.

Bermejo y Cano (2012), indicaron la misma tendencia en la variación del contenido de azúcares solubles con respecto a la maduración de tres clementinas, *Fina*, *Loretina* y *Arrufatina*, aumentando el contenido de estos azúcares solubles con el grado de maduración hasta un 40 % como fue el caso de clementina *Fina*. Así mismo, existen diferentes estudios en los cuáles se indican proporciones de estos azúcares similares a las obtenidas en el presente trabajo para variedades de clementina procedentes de España, tal y como indicaron Legua *et al*., (2014).

Por otro lado, se llevó a cabo la determinación de **fibra dietética total** como parte de la fracción hidrocarbonada. En general, como se observa en la **Tabla 3.6**, los contenidos de fibra dietética total, únicamente mostraron valores similares y homogéneos en la variedad Basol, mientras que en Clemenrubí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambos estados de maduración para la temporada 2013 y en Clemensoon en ambas temporadas.

Sin embargo, en la **fracción soluble** sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes grados de madurez para todas las variedades estudiadas, lo que indicaría que dicha fracción se vio influenciada por el proceso de maduración, aumentando sus contenidos en el estado de maduración organoléptico, debido principalmente a la acumulación de agua que se da en esta fase del desarrollo de las clementinas (Agustí *et al*., 2003). Estas diferencias se hacen más visibles en la temporada 2013, tal y como se muestra en la **Figura 3.22**.

Tabla 3.6. Contenido de fibra dietética insoluble, soluble y total (g/100g ssf) de variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración.

Variedad	Año	Estado Maduración	Fibra Insoluble	Fibra Soluble	Fibra Total
Basol	2012	E1	1,15 ± 0,09a	1,04 ± 0,06a	2,18 ± 0,11a
		E2	1,00 ± 0,06a	1,15 ± 0,03b	2,13 ± 0,05a
	2013	E1	2,53 ± 0,30a	0,63 ± 0,06a	3,15 ± 0,26a
		E2	2,14 ± 0,11a	1,01 ± 0,09b	3,45 ± 0,21a
Clemenrubí	2012	E1	1,31 ± 0,05a	1,12 ± 0,03a	2,37 ± 0,12a
		E2	1,20 ± 0,10a	1,08 ± 0,05a	2,36 ± 0,22a
	2013	E1	0,80 ± 0,08a	0,61 ± 0,06a	1,47 ± 0,11a
		E2	0,96 ± 0,12a	1,75 ± 0,14b	2,98 ± 0,26b
Clemensoon	2012	E1	1,43 ± 0,05b	1,18 ± 0,17a	2,63 ± 0,12b
		E2	1,11 ± 0,10a	1,07 ± 0,09a	2,18 ± 0,10a
	2013	E1	0,71 ± 0,09a	1,42 ± 0,11b	2,03 ± 0,19a
		E2	1,66 ± 0,15b	1,06 ± 0,11a	2,71 ± 0,24b

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptica. En cada columna (entre temporadas para cada variedad), las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

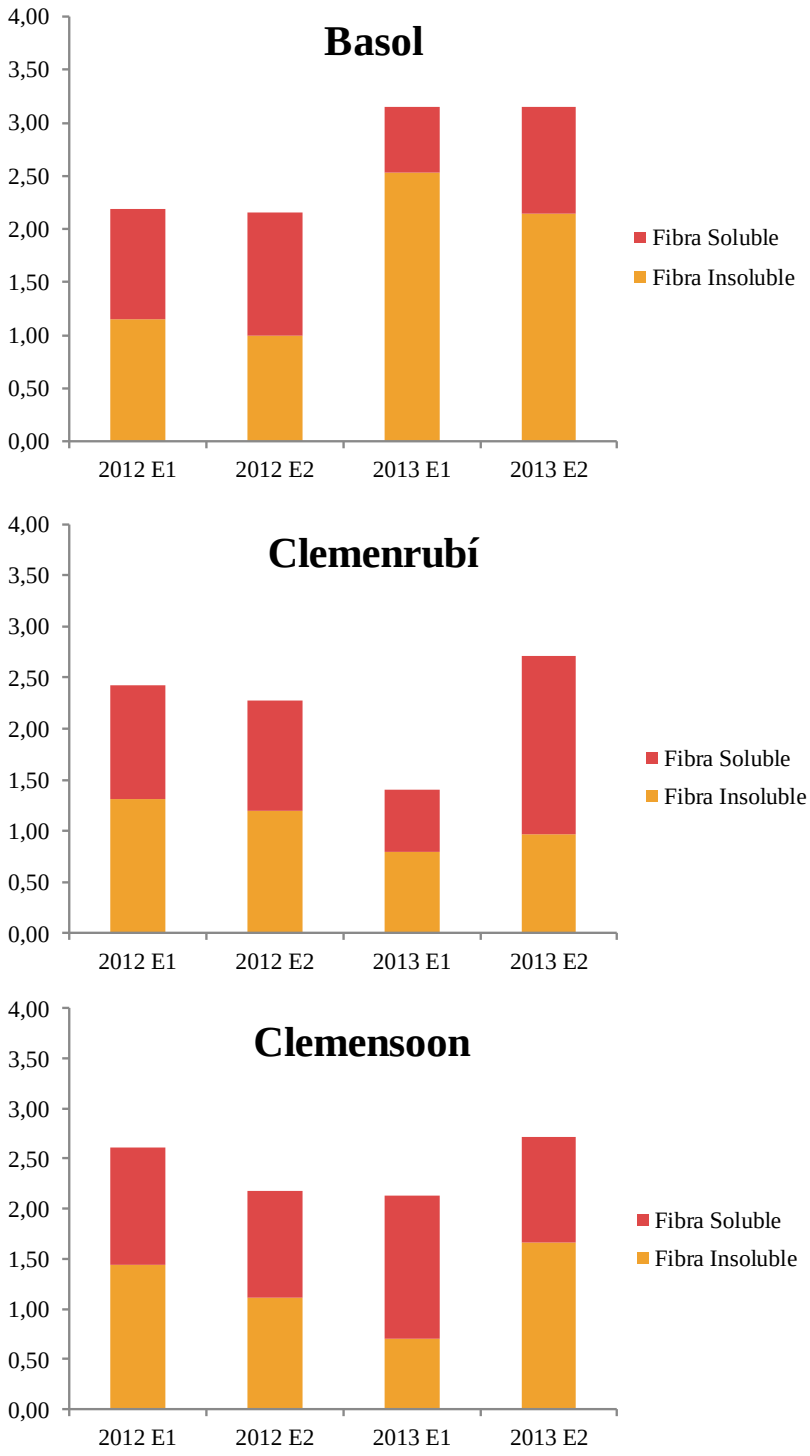


Figura 3.22. Variación de la composición de fibra total, fibra soluble e insoluble (mg/100g) en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

El contenido en fibra soluble en la mayoría de las variedades estudiadas, llegó a representar hasta un 70 % del total de fibra dietética total, tal y como ocurrió en la variedad Clemensoon, en su estado de maduración intermedio (E1) correspondiente a la temporada 2013.

Por último, la **fracción insoluble** no se vio influenciada por el proceso de maduración en Basol y Clemenrubí, mientras que la variedad Clemensoon, tuvo un comportamiento diferente mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ambas temporadas de recolección.

Por otro lado, evaluando la influencia del proceso de maduración sobre el contenido de fibra dietética total con independencia de la temporada de recolección, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=0,0263) en la variedad Clemenrubí tal y como se muestra en la **Figura 3.23**.

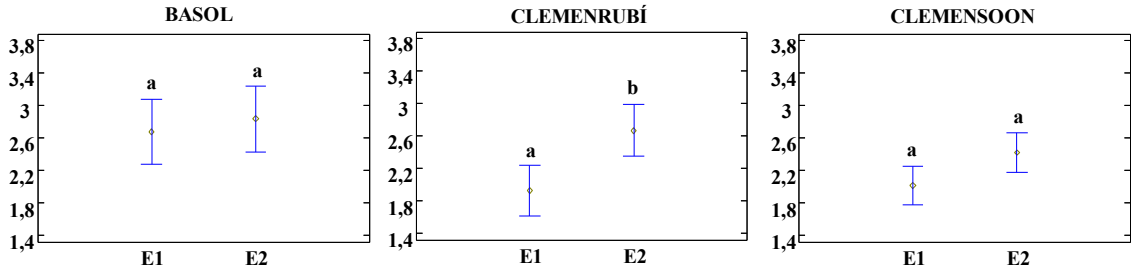


Figura 3.23. Test de Tukey ($p < 0,05$) sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de fibra dietética total (g/100g) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Siguiendo con el análisis de composición centesimal como parte de la caracterización de las clementinas, el **contenido proteico** representó una de las fracciones minoritarias respecto a otros componentes de la composición centesimal, los resultados oscilaron en un rango reducido de 1,23 − 1,68 g/100g de porción comestible (**Tabla 3.4**).

En general, la influencia del estado de maduración no mostró variaciones en el contenido de proteínas, presentando resultados homogéneos entre los diferentes estados de maduración para las diferentes clementinas estudiadas, a excepción de la variedad Basol, en la que se encontraron diferencias estadísticamente significativas (p=0,0001). La máxima fluctuación, fue del 12,1% en la variedad Basol perteneciente a la temporada 2013.

Por otro lado, la **fracción lipídica**, como cabría esperar fue la fracción minoritaria en la pulpa de las clementinas estudiadas, con valores entre 0,03 − 0,08 g/100g de porción comestible. Dichos valores, fueron muy inferiores a los recopilados en la literatura para mandarinas, estos resultados se sitúan en torno a 0,3 g/100g de porción comestible (Souci *et al*., 2008).

La fracción lipídica, no mostró fluctuaciones en su contenido entre los diferentes estados de maduración para cada variedad y temporada, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ninguna de las clementinas estudiadas. Dicha fracción lipídica, incluye una gama de compuestos tanto polares como no polares.

A partir de la fracción lipídica extraída (extracto etéreo), se estudió dicho perfil de ácidos grasos esenciales y no esenciales por cromatografía de gases. Se identificaron un total de 21 ácidos grasos diferentes (**Figura 3.24**).

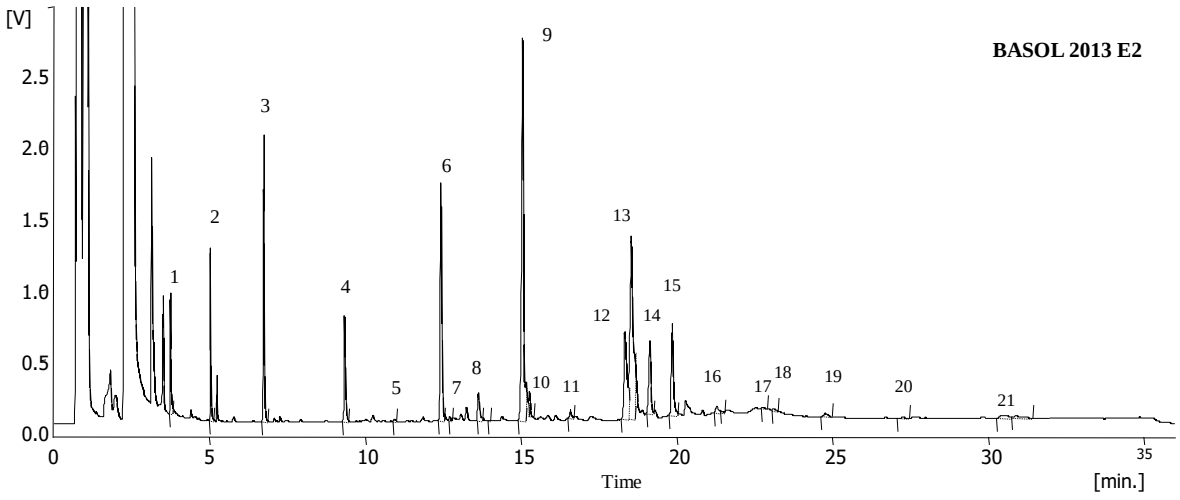


Figura 3.24. Perfil cromatográfico de los ácidos grasos correspondiente a la variedad Basol, en la temporada 2013 y estado de maduración organoléptica (E2). 1. C6:0; 2. C8:0; 3. C10:0; 4. C12:0; 5. C13:0; 6. C14:0; 7. C15:0; 8. C15:1; 9. C16:0; 10. C16:1; 11. C17:0; 12. C18:0; 13. C18:1n9; 14. C18:2n6; 15. C18.3n3; 16. C20:0; 17.C20:3n3; 18. C20:5n3; 19. C22:0; 20. C23:0; 21. C24:0

El perfil de compuestos lipídicos, ácidos grasos individuales monoinsaturados (AGMI), ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y los ácidos grasos saturados (AGS) correspondiente a cada variedad de clementinas extra precoces en los dos estados de maduración estudiados, se muestra en las **Tablas 3.7a, 3.7b** y **3.7c**.

Los ácidos grasos mayoritarios fueron el ácido palmítico (AP, C16:0) seguido de α - linolénico (ALA, C18:3n3) y ácido linoleico (AL, C18:2n6) para todas las variedades de clementinas estudiadas.

El ácido palmítico es uno de los ácidos grasos saturados más comúnmente presentes en animales y plantas. Los valores relativos a este ácido oscilaron en un rango de 24 – 28 %. En general, este ácido permaneció más o menos estable durante el proceso de maduración, presentando pequeñas fluctuaciones entre ambos estados de maduración a excepción de la temporada 2012 para Clemenrubí y 2013 para Clemensoon.

Otro ácido graso saturado (AGS) caracterizado en las tres variedades fue el ácido esteárico (C18:0) con porcentajes relativos bastante inferiores al ácido palmítico (4 – 9 %). La contribución de este ácido al total de ácidos grasos saturados, no se vio influenciada por el proceso de maduración de manera significativa, puesto que mostró valores homogéneos entre los diferentes estados de maduración para todas las clementinas, con excepción de Clemensoon en la temporada 2012.

Por otro lado, el ácido graso monoinsaturado más abundante en las tres variedades de clementinas analizadas fue el ácido oleico (C18:1n9) con valores comprendidos entre 4 – 10 %; en general, este ácido permaneció estable durante la maduración en la variedad Basol, mostrando valores homogéneos y similares en los diferentes estados de maduración, tal y como ocurrió con la fracción de ácidos grasos saturados. Mientras que para las variedades Clemenrubí y Clemensoon presentó fluctuaciones entre ambos estados de maduración.

De entre los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las clementinas estudiadas, tal y como se ha comentado anteriormente, se encontraron como ácidos grasos mayoritarios el ácido α - linolénico (ALA, C18:3n3) y ácido linoleico (AL, C18:2n6), los cuales son los ácidos poliinsaturados pertenecientes al grupo de ácidos grasos esenciales denominados omega-3 y omega-6, respectivamente, ácidos grasos que no se pueden producir en el organismo y deben ser adquiridos a través de la dieta (Lands, 2014).

Tabla 3.7a. Perfil de ácidos grasos para la variedad Basol en las diferentes temporadas y estados de maduración.

PERFIL ÁCIDOS GRASOS VARIEDAD BASOL (% RELATIVO)				
COMPUESTO	**2012**		**2013**	
	E1	**E2**	**E1**	**E2**
C6:0	0,03 ± 0,00	0,11 ± 0,02	1,32 ± 0,47	1,45 ± 0,10
C8:0	0,15 ± 0,01	0,10 ± 0,00	1,93 ± 0,59	1,81 ± 0,23
C10:0	0,35 ± 0,01	0,18 ± 0,01	5,55 ± 1,62	5,64 ± 0,85
C12:0	1,69 ± 0,04	1,07 ± 0,04	3,70 ± 0,90	3,56 ± 0,42
C13:0	0,54 ± 0,11	0,21 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01
C14:0	3,09 ± 0,08	2,07 ± 0,04	8,65 ± 1,84	8,24 ± 1,04
C15:0	1,50 ± 0,01	1,09 ± 0,02	1,34 ± 0,20	1,08 ± 0,13
C15:1	0,25 ± 0,01	0,06 ±0,01	0.03 ± 0,02	0,03 ± 0,00
C16:0	**24,89 ± 0,08**	**27,21 ± 0,86**	**25,34 ± 0,36**	**26,48 ± 0,72**
C16:1	4,72 ± 0,06	3,81 ±0,22	1,73 ± 0,36	1,11 ± 0,06
C17:0	1,11 ± 0,05	1,04 ± 0,05	0,90 ± 0,04	0,74 ± 0,07
C18:0	**4,72 ± 0,21**	**4,20 ± 0,44**	**8,84 ± 0,60**	**9,70 ± 0,62**
C18:1n9	**9,00 ± 0,15**	**9,45 ± 0,83**	**14,72 ± 2,08**	**15,64 ± 2,11**
C18:2n6	**20,57 ± 0,22**	**14,26 ± 0,17**	**8,6 ± 2,16**	**13,59 ± 2,69**
C18:3n3	**21,53 ± 0,25**	**30,88 ± 1,55**	**13,37 ± 4,60**	**9,21 ± 0,33**
C20:0	0,34 ± 0,01	0,96 ± 0,32	0,79 ± 0,21	0,37 ± 0,05
C20:3n3	0,02 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,20 ± 0,05	0,08 ± 0,00
C20:5n3	1,11 ± 0,08	0,49 ± 0,01	1,56 ± 1,08	0,45 ± 0,08
C22:0	1,50 ± 0,07	0,89 ± 0,02	0,58 ± 0,05	0,38 ± 0,07
C23:0	1,04 ± 0,05	0,36 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01
C24:0	2,04 ± 0,01	1,53 ± 0,16	0,58 ± 0,03	0,29 ± 0,02
AGS	**42,95 ± 0,62a**	**41,00 ± 0,63b**	**59,71 ± 6,27a**	**59,90 ± 4,33a**
AGMI	**13,97 ± 0,22a**	**13,32 ± 1,13a**	**16,48 ± 1,68a**	**16,78 ± 2,05a**
AGPI	**43,08 ± 0,40a**	**45,69 ± 1,76a**	**23,81 ± 7,95a**	**23,33 ± 2,29a**

AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptica. En cada fila, diferentes letras entre los dos estados de maduración para cada temporada indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 3.7b. Perfil de ácidos grasos para la variedad Clemenrubí en las diferentes temporadas y estados de maduración.

PERFIL ÁCIDOS GRASOS VARIEDAD CLEMENRUBÍ (% RELATIVO)				
COMPUESTO	**2012**		**2013**	
	E1	**E2**	**E1**	**E2**
C6:0	0,10 ± 0,02	0,13 ± 0,04	1,01 ± 0,25	1,45 ± 0,15
C8:0	0,14 ± 0,01	0,33 ± 0,02	1,35 ± 0,40	1,83 ± 0,25
C10:0	0,38 ± 0,01	0,54 ± 0,05	4,15 ± 1,33	5,87 ± 0,77
C12:0	1,29 ± 0,06	1,95 ± 0,23	3,19 ± 0,80	4,13 ± 0,45
C13:0	0,03 ± 0,00	0,09 ± 0,04	0,11 ± 0,00	0,11 ±0,01
C14:0	2,30 ± 0,08	3,33 ± 0,31	6,74 ± 1,68	8,90 ± 0,54
C15:0	1,10 ± 0,04	1,31 ± 0,22	0,99 ± 0,23	1,24 ± 0,02
C15:1	0,18 ± 0,02	0,13 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00
C16:0	**26,78 ± 0,69**	**26,34 ± 1,99**	**24,53 ± 1,21**	**27,72 ± 0,15**
C16:1	2,81 ± 0,00	2,95 ± 0,32	3,00 ± 0,45	2,29 ± 0,06
C17:0	1,45 ± 0,02	1,15 ± 0,04	0,68 ± 0,02	0,93 ± 0,08
C18:0	**6,05 ± 0,28**	**6,18 ± 0,06**	**7,84 ± 0,87**	**9,18 ± 0,55**
C18:1n9	**7,82 ± 0,25**	**9,84 ± 1,59**	**10,51 ± 1,43**	**12,87 ± 0,36**
C18:2n6	**20,57 ± 0,24**	**15,62 ± 1,03**	**10,85 ± 2,16**	**6,95 ± 0,69**
C18:3n3	**21,15 ± 0,10**	**23,72 ± 1,26**	**22,16 ± 5,37**	**13,80 ± 1,14**
C20:0	0,78 ± 0,02	0,50 ± 0,00	0,79 ± 0,03	0,42 ± 0,01
C20:3n3	0,27 ± 0,02	0,46 ± 0,00	0,09 ± 0,08	0,11 ± 0,01
C20:5n3	1,64 ± 0,11	0,70 ± 0,12	0,67 ± 0,10	0,97 ± 0,19
C22:0	1,94 ± 0,18	1,21 ± 0,02	0,54 ± 0,10	0,61 ± 0,01
C23:0	1,01 ± 0,06	0,88 ± 0,01	0,14 ± 0,06	0,12 ± 0,01
C24:0	2,19 ± 0,12	2,66 ± 0,09	0,61 ± 0,05	0,44 ± 0,07
AGS	**45,55 ± 0,27a**	**46,59 ± 2,66a**	**52,67 ± 6,57a**	**62,96 ± 1,33b**
AGMI	**10,81 ± 0,27a**	**12,92 ± 1,26b**	**13,56 ± 0,98a**	**15,21 ± 0,30b**
AGPI	**43,64 ± 0,00a**	**40,49 ± 1,99b**	**33,77 ± 7,54a**	**21,83 ± 1,63b**

AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptica. En cada fila, diferentes letras entre los dos estados de maduración para cada temporada indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 3.7c. Perfil de ácidos grasos para la variedad Clemensoon en diferentes temporadas y estados de maduración.

PERFIL ÁCIDOS GRASOS VARIEDAD CLEMENSOON (% RELATIVO)				
COMPUESTO	**2012**		**2013**	
	E1	**E2**	**E1**	**E2**
C6:0	0,03 ± 0,01	0,08 ± 0,00	1,11 ± 0,30	1,11 ± 0,65
C8:0	0,21 ± 0,02	0,15 ± 0,01	1,41 ± 0,31	1,32 ± 0,71
C10:0	0,36 ± 0,01	0,29 ± 0,02	4,44 ± 0,98	4,20 ± 2,31
C12:0	2,05 ± 0,02	1,32 ± 0,01	3,38 ± 0,46	3,23 ± 1,22
C13:0	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,02
C14:0	3,47 ± 0,03	2,64 ± 0,01	7,42 ± 0,10	6,72 ± 2,76
C15:0	1,43 ± 0,02	1,31 ± 0,06	1,07 ± 0,09	1,03 ± 0,21
C15:1	0,06 ± 0,03	0,23 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00
C16:0	**25,09 ± 0,46**	**28,38 ± 0,33**	**25,10 ± 0,09**	**25,03 ± 1,12**
C16:1	3,29 ± 0,34	1,43 ± 0,03	2,34 ± 0,26	2,15 ± 0,46
C17:0	1,15 ± 0,05	1,11 ± 0,04	0,91 ± 0,07	1,03 ± 0,10
C18:0	**7,12 ± 0,11**	**6,50 ± 0,03**	**8,82 ± 0,36**	**7,92 ± 1,27**
C18:1n9	**11,10 ± 0,12**	**13,72 ± 0,44**	**12,31 ± 1,61**	**9,67 ± 2,13**
C18:2n6	**15,72 ± 0,73**	**15,42 ± 0,10**	**9,27 ± 1,45**	**8,81 ± 2,54**
C18:3n3	**21,13 ± 0,38**	**18,39 ± 0,25**	**19,89 ± 3,47**	**24,49 ± 8,85**
C20:0	1,32 ± 0,23	0,67 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,59 ± 0,07
C20:3n3	1,90 ± 1,02	2,48± 0,18	0,07 ± 0,06	0,14 ± 0,03
C20:5n3	0,58 ± 0,06	0,97 ± 0,06	0,61 ± 0,02	0,71 ± 0,26
C22:0	1,47 ± 0,08	1,79 ± 0,01	0,74 ± 0,06	0,88 ± 0,18
C23:0	0,54 ± 0,01	0,76 ± 0,12	0,18 ± 0,04	0,17 ± 0,06
C24:0	1,89 ± 0,05	2,26 ± 0,23	0,35 ± 0,05	0,71 ± 0,10
AGS	**46,22 ± 0,11a**	**47,37 ± 0,08b**	**55,45 ± 3,54a**	**53,98 ± 9,7a**
AGMI	**14,45 ± 0,26a**	**15,38 ± 0,09b**	**14,71 ± 1,38a**	**11,87 ± 1,69a**
AGPI	**39,33 ± 0,15a**	**37,25 ± 0,17b**	**29,84 ± 4,92a**	**34,15 ± 11,48a**

AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptica. En cada fila, diferentes letras entre los dos estados de maduración para cada temporada indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

El ALA se identificó y cuantificó en todas las muestras de clementinas estudiadas, siendo en general el ácido graso poliinsaturado mayoritario, a excepción de la variedad Basol en la temporada 2013 para el estado de maduración organoléptico, en el cual el ácido graso poliinsaturado mayoritario fue AL. El ácido graso ALA osciló en un rango amplio (9 − 31 % relativo). El contenido de dicho ácido graso parece verse influenciado por el proceso de maduración para cada temporada, mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes estados de maduración (E1 y E2). Sin embargo, el estudio comparativo sobre la influencia del proceso de maduración, con independencia de la temporada, mostró resultados homogéneos para todas las clementinas estudiadas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas.

Del mismo modo, el AL se identificó y cuantificó en todas las clementinas, al igual que el ALA, mostrando fluctuaciones entre las diferentes variedades y temporadas, oscilando en un rango bastante amplio (7 − 20,5 % relativo) al igual que ALA. De la misma manera, la influencia del proceso de maduración con independencia de la temporada no influyó de manera significativa sobre el contenido de este ácido poliinsaturado.

Comparando los resultados obtenidos en el presente estudio, con los que aparecen en la literatura, dicho perfil de ácidos grasos se corresponde con el perfil encontrado en otros cítricos como la naranja dulce o naranja amarga (*Citrus Sinensis* (L.) Osbeck; *Citrus Aurantium*, respectivamente), tal y como describen Izquierdo *et al*., (2003); Souci *et al*., (2008) y Letaief *et al*., (2016).

En general, la fracción de ácidos grasos insaturados, suma de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), fue la fracción mayoritaria para todas las clementinas estudiadas en la temporada 2012. Sin embargo, en la temporada 2013, la fracción de ácidos grasos saturados (AGS) supuso un porcentaje muy relevante, superando el porcentaje de ácidos grasos insaturados, llegando a alcanzar hasta un 63 % del total del contenido lipídico en la variedad Clemenrubí.

Por otro lado, la influencia del estado de maduración sobre las familias de los ácidos grasos identificados, pertenecientes a la caracterización del perfil lipídico en las clementinas estudiadas, presentó fluctuaciones más o menos significativas en función de la variedad tal y como se muestra en la **Figura 3.25**.

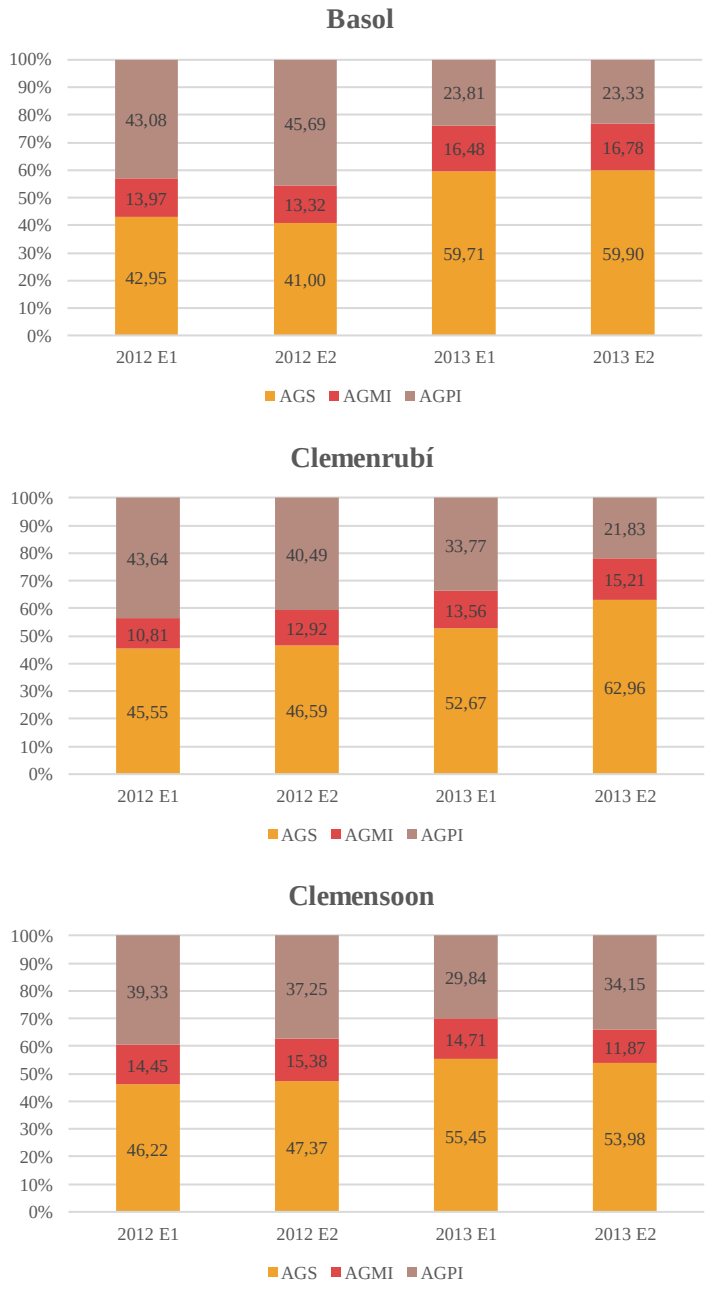


Figura 3.25. Contribución de AGS, AGMI y AGPI respecto al contenido total de ácidos grasos presentes en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2). AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

Sin embargo, estas fluctuaciones entre temporadas, no se ven reflejadas si tenemos en cuenta únicamente la variable del estado de maduración, con independencia de la temporada de recolección (**Figura 3.26**).

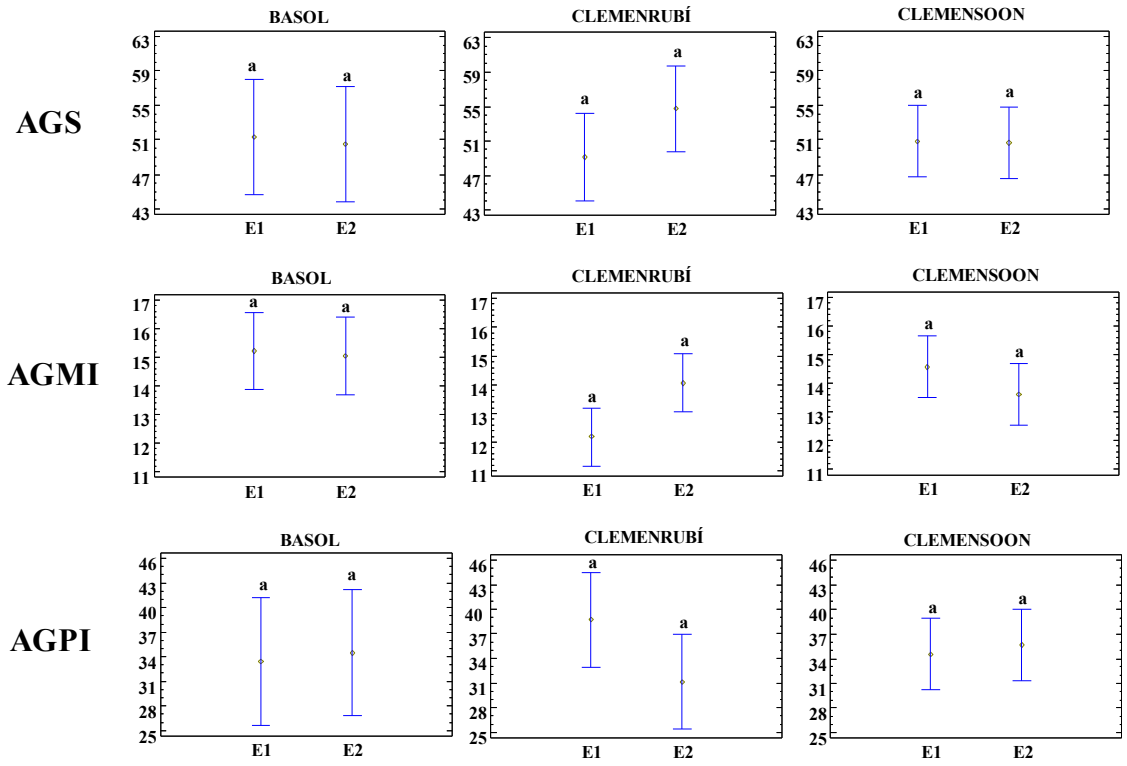


Figura 3.26. Test de Tukey ($p < 0,05$) sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de ácidos grasos (%) de las clementinas estudiadas. AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Por último, se llevó a cabo la determinación del **contenido mineral** de las clementinas objeto de estudio. El contenido de cenizas osciló entre 0,25 − 0,42 g/100g de porción comestible (**Tabla 3.4**). En general, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para todas las variedades de clementinas estudiadas, disminuyendo estos contenidos en el estado de maduración organoléptico (E2) para cada temporada de recolección, con la excepción de las variedades Clemenrubí y Clemensoon correspondientes a la temporada 2013 que los valores permanecieron estables en ambos estados de maduración E1 y E2.

Sin embargo, analizando la influencia del proceso de maduración sobre el contenido en cenizas, con independencia de la temporada en que fueron recolectadas, los valores permanecieron relativamente constantes, mostrando resultados homogéneos para cada variedad. Dichos valores obtenidos en nuestro estudio, están en concordancia con los valores indicados en la literatura para mandarinas (Souci *et al*., 2008; Boudries *et al*., 2012).

Tabla 3.8. Contenido de elementos minerales (mg/100g porción comestible) de variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración.

Variedad	Año	Estado Maduración	Microelementos minerales				Macroelementos minerales			
			Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	Mg	K	Na
Basol	2012	E1	0,12 ± 0,01a	0,34 ± 0,01b	0,01 ± 0,00a	0,20 ± 0,00a	14,34 ± 1,47a	7,17 ± 0,63a	111,21 ± 11,65a	10,47 ± 2,95a
		E2	0,18 ± 0,00b	0,23 ± 0,01a	0,02 ± 0,00a	0,26 ± 0,02b	24,05 ± 2,13b	11,27 ± 1,07b	99,96 ± 0,72a	7,10 ± 0,02a
	2013	E1	0,03 ± 0,00a	0,22 ± 0,01a	0,02 ± 0,00a	0,29 ± 0,05b	13,48 ± 0,34b	8,61 ± 1,15a	110,91 ± 3,94b	9,10 ± 0,77a
		E2	0,07 ± 0,00b	0,46 ± 0,03b	0,01 ± 0,00a	0,15 ± 0,01a	11,64 ± 1,13a	6,96 ± 0,13a	68,48 ± 4,81a	16,81 ± 1,12b
Clemenrubí	2012	E1	0,03 ± 0,05a	0,26 ± 0,01a	0,01 ± 0,00a	0,12 ± 0,00a	17,96 ± 0,83a	6,94 ± 0,20a	100,70 ± 7,13a	6,30 ± 0,65b
		E2	0,14 ± 0,02b	0,36 ± 0,00b	0,05 ± 0,01b	0,36 ± 0,03b	22,36 ± 1,24b	9,67 ± 0,66b	106,04 ± 3,92a	5,11 ± 0,43a
	2013	E1	tr	0,31 ± 0,03b	0,02 ± 0,00a	0,11 ± 0,01a	13,07 ± 0,95a	7,57 ± 0,71a	86,79 ± 2,52b	5,58 ± 0,07a
		E2	0,07 ± 0,01	0,24 ± 0,02a	0,01 ± 0,00a	0,15 ± 0,00b	14,47 ± 1,58a	7,40 ± 0,62a	63,59 ± 0,27a	10,45 ± 0,70b
Clemensoon	2012	E1	0,06 ± 0,03a	0,25 ± 0,04a	0,02 ± 0,00	0,10 ± 0,00a	17,40 ± 1.25a	7,31 ± 0,40a	98,86 ± 4,80a	4,45 ± 0,34a
		E2	0,02 ± 0,01a	0,21 ± 0,01a	nd	0,13 ± 0,06a	21,94 ± 1,86b	9,61 ± 0,72b	93,59 ± 1,50a	7,76 ± 0,01b
	2013	E1	tr	0,31 ± 0,04a	tr	0,14 ± 0,01b	16,15 ± 0,89a	8,55 ± 0,82a	114,20 ± 2,36b	9,84 ± 0,62a
		E2	0,06 ± 0,01	0,30 ± 0,02a	0,01 ± 0,00	0,11 ± 0,01a	21,45 ± 1,94b	9,17 ± 0,52a	68,90 ± 0,18a	9,01 ± 0,47a

*nd: No detectado; tr: trazas (<0,01). Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptico. En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Si bien el contenido de cenizas no se vio influenciado por el proceso de maduración, el análisis de minerales mostró algunas fluctuaciones con respecto al estado de maduración de las clementinas. Los resultados del análisis de los elementos minerales se dividieron en macro (K, Na, Ca y Mg) y microelementos minerales (Fe, Cu, Mn y Zn) tal y como se observa en la **Tabla 3.8**.

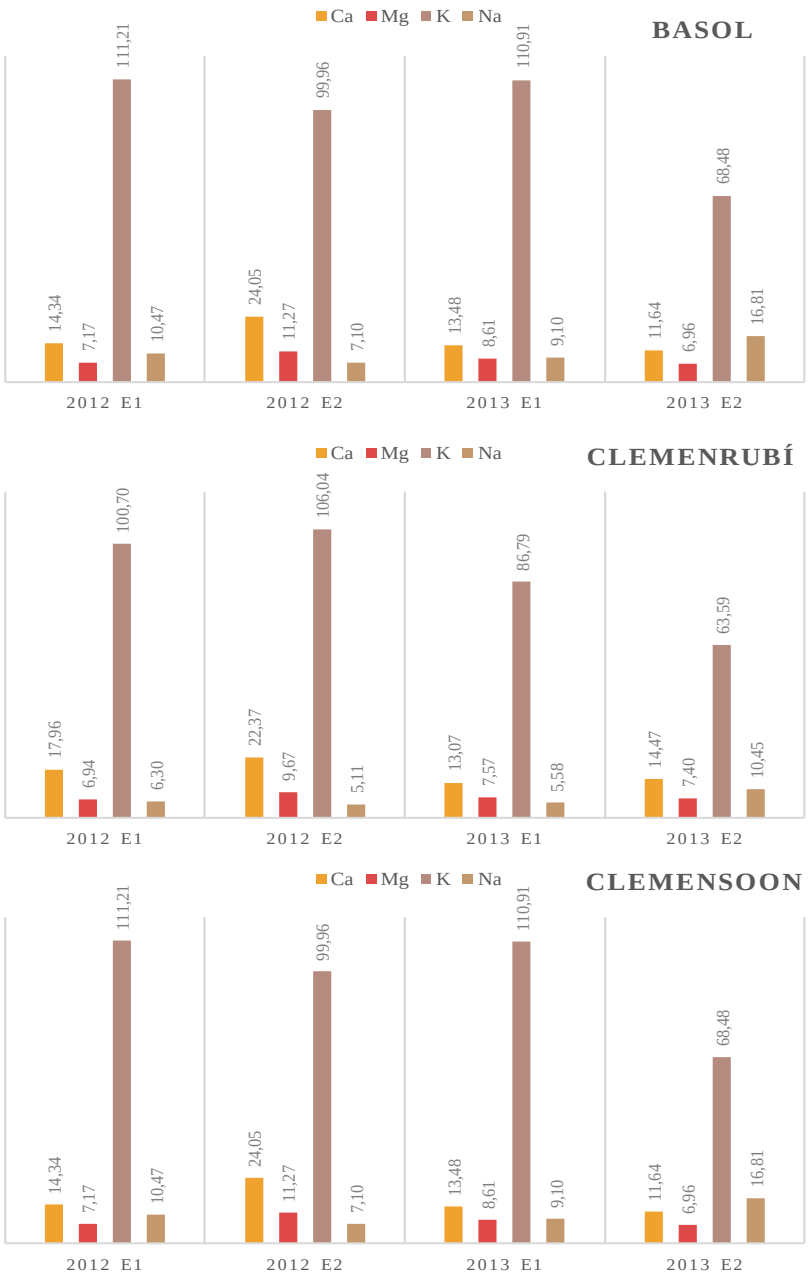


Figura 3.27. Contenido en macro elementos minerales (mg/100g porción comestible) presente en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

Respecto a los macroelementos minerales analizados (**Tabla 3.8** y **Figura 3.27**), en general destaca el potasio (K) como elemento mayoritario (63,59 − 114,20 mg/100g de porción comestible) representando hasta un 38% con respecto al total del contenido en cenizas, como ocurrió en el caso de la variedad Clemensoon en la temporada 2013 en su estado de maduración intermedio (E1).

Dicho contenido de potasio se vio influenciado por el proceso de maduración para todas las variedades estudiadas en la temporada 2013 disminuyendo considerablemente, hasta casi un 40%, tal y como ocurrió en la variedad Clemensoon. Mientras que en la temporada 2012, los valores para este elemento permanecieron relativamente constantes con respecto al proceso de maduración.

Sin embargo, el análisis de la influencia del grado de madurez independientemente de la temporada puso de manifiesto diferencias estadísticamente significativas en las variedades Basol (p=0,0061) y Clemensoon (p=0,0035), mostrando una ligera disminución de los contenidos de potasio en el estado de maduración organoléptico (E2), (**Figura 3.28**).

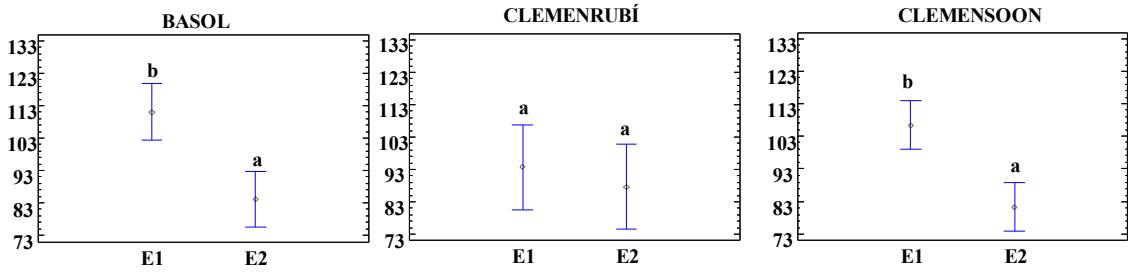


Figura 3.28. Test de Tukey ($p < 0,05$) sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de potasio (mg/100g porción comestible) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Le sigue el calcio (Ca) como segundo macroelemento mayoritario (11,64 − 24,05 mg/100g de porción comestible). En general, el contenido de este mineral aumenta con el proceso de maduración en todas las clementinas estudiadas para cada temporada, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los estados de maduración E1 y E2, a excepción de la variedad Clemenrubí recolectada en el año 2013 que mostró valores similares en ambos estados de maduración.

Por otro lado, el estudio de la influencia de la maduración con independencia del año de recolección, únicamente mostró diferencias significativas en la variedad Clemensoon

(p=0,0001) traduciéndose en un aumento de los contenidos de calcio, mientras que el contenido de dicho mineral en las variedades Basol y Clemenrubí no se vio influenciado por el proceso de maduración mostrando contenidos relativamente estables. En cuanto al magnesio (Mg) y sodio (Na), fueron los macroelementos minoritarios, siendo este último el que presentó los valores más bajos, aunque ambos oscilaron en un rango de valores similar.

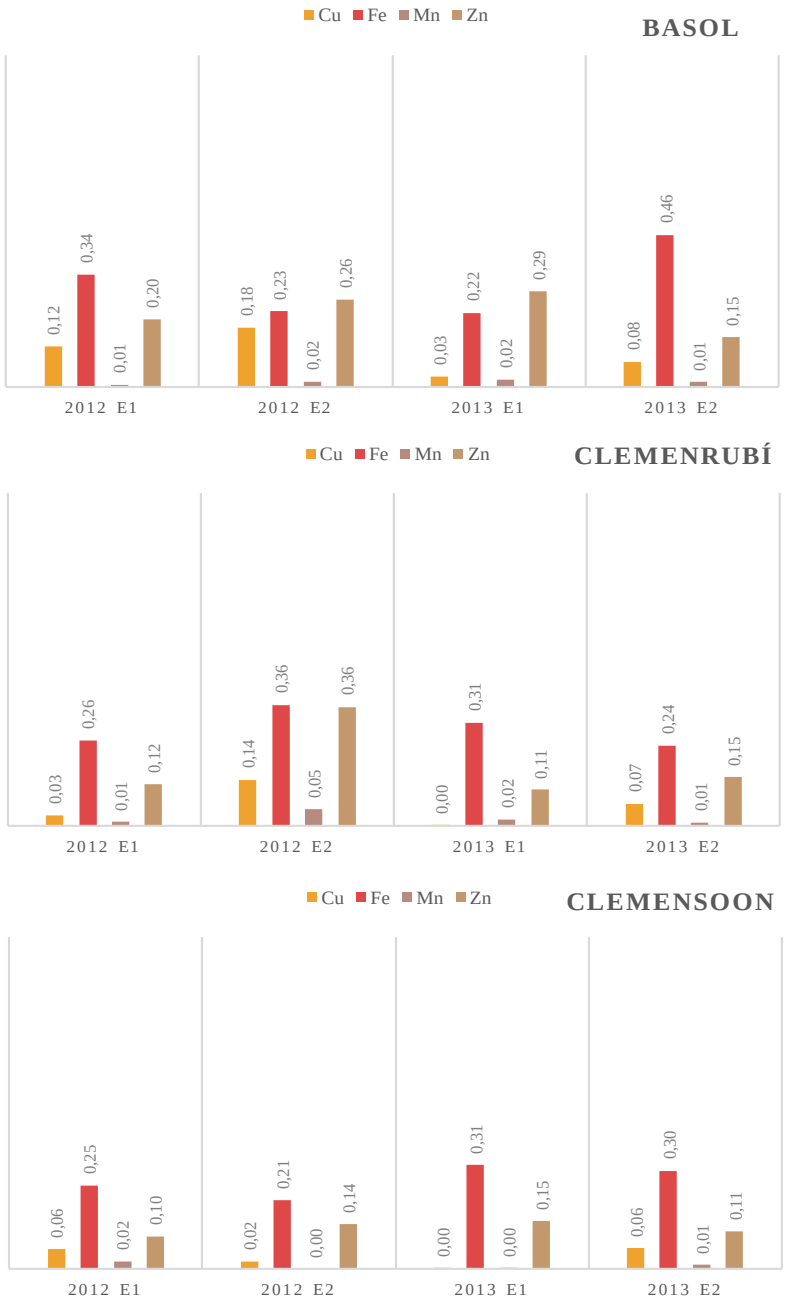


Figura 3.29. Contenido en micro elementos minerales (mg/100g porción comestible) presente en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

Entre los microelementos minerales analizados en las clementinas objeto de estudio (**Tabla 3.8** y **Figura 3.29**), cabe destacar al hierro (Fe) frente al resto de microelementos como el elemento mayoritario. Observandose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para cada temporada en ambos estados de maduración (E1 y E2) en las variedades Basol y Clemenrubí.

Sin embargo, estas diferencias no se tradujeron a la hora de analizar únicamente la influencia de la maduración con independencia de la temporada, tal y como mostró el estudio comparativo sobre la influencia de la maduración en el contenido de Fe (**Figura 3.30**). Todas las clementinas estudiadas mostraron valores homogéneos y similares, de manera que permaneció relativamente estable frente al proceso de maduración.

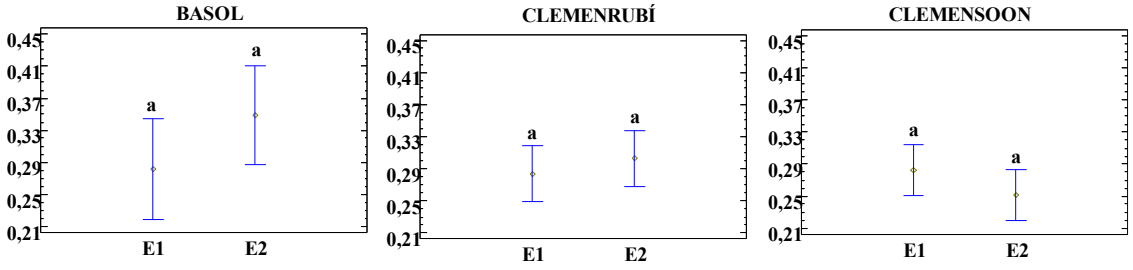


Figura 3.30. Test de Tukey ($p < 0,05$) sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de hierro (mg/100g porción comestible) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Le sigue el zinc (Zn) con valores que oscilan entre 0,11 − 0,36 mg/100g de porción comestible y, por último, el cobre (Cu) y manganeso (Mn) están en similares proporciones para las diferentes variedades de clementinas.

Compuestos bioactivos en clementinas

Una vez realizada la caracterización nutricional de las clementinas, se llevó a cabo la determinación de diferentes **compuestos bioactivos**. Tal y como se ha comentado anteriormente, los beneficios para la salud de los cítricos se han atribuido principalmente a la presencia de estos compuestos, tales como la vitamina C, los ácidos orgánicos, compuestos fenólicos (como por ejemplo los glucósidos de flavanona y los ácidos hidroxicinámicos) y vitamina E (tocoferoles), entre otros.

El interés nutricional del ácido ascórbico (AA), no sólo proviene de su actividad como **vitamina C**, junto con su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico (ADHA), sino también por sus propiedades antioxidantes, ya sea en el propio alimento o en el cuerpo humano, siendo capaz de neutralizar los posibles radicales libres presentes en el medio. La vitamina C abunda en los alimentos de origen vegetal, y especialmente en los cítricos, destacando entre ellos la naranja y la mandarina.

Tabla 3.9. Contenido de ácido ascórbico (AA), dehidroascórbico (ADHA) y vitamina C total (mg/100 g porción comestible) de variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración (E1 y E2).

Variedad	Año	Estado Maduración	AA	ADHA	Vit C total
Basol	2012	E1	61,06 ± 2,14a	2,89 ± 1,20a	62,74 ± 1,86a
		E2	91,48 ± 3,43b	9,86 ± 0,22b	101,01 ± 2,95b
	2013	E1	61,71 ± 0,87a	4,70 ± 0,99a	66,41 ± 0,88a
		E2	116,24 ± 3,24b	5,85 ± 0,65a	118,30 ± 8,95b
Clemenrubí	2012	E1	67,52 ± 4,40a	6,30 ± 0,19b	73,30 ± 6,03a
		E2	91,26 ± 2,95b	5,36 ± 0,94a	94,70 ± 1,37b
	2013	E1	56,18 ± 0,55a	3,78 ± 0,95a	59,96 ± 0,63a
		E2	94,61 ± 5,81b	5,04 ± 0,00b	100,05 ± 8,15b
Clemensoon	2012	E1	68,05 ± 1,08a	0,50 ± 0,05a	68,55 ± 1,09a
		E2	96,20 ± 4,18b	4,55 ± 0,83b	93,79 ± 4,83b
	2013	E1	55,78 ± 1,95a	3,82 ± 0,22a	57,71 ± 1,64a
		E2	100,60 ± 9,52b	4,61 ± 0,80a	105,21 ± 0,79b

Nd: no detectado. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptico. En cada columna, entre temporadas para cada variedad, las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

En la **Tabla 3.9.** se muestran los valores de vitamina C total, ácido ascórbico y dehidroascórbico. Conforme aumentó el grado de maduración se observó un incremento significativo del contenido de vitamina C total, como consecuencia de la regulación del desarrollo de estas frutas no climatéricas. Especialmente destacó la variedad Basol en la temporada de recolección 2012, con un incremento del 38 % entre ambos estados de maduración. Por el contrario, los contenidos correspondientes al estado de maduración intermedio (E1), como cabría esperar, presentaron valores inferiores y en particular fue la variedad Clemensoon perteneciente a la temporada 2012, la variedad que presentó un menor contenido de vitamina C total (57,78 mg/100g porción comestible) para el estado de maduración intermedio (E1).

El AA fue la principal isoforma encontrada por término medio en todas las clementinas estudiadas (**Figura 3.31**), como se ha mencionado anteriormente, representando en todos los casos más del 90 % con respecto al total de vitamina C, mientras que el ADHA se encuentra en menor porcentaje, llegando a alcanzar hasta un 9,8 % como se observó en la variedad Basol en el estado de maduración organoléptica (E2), perteneciente a la temporada 2012.

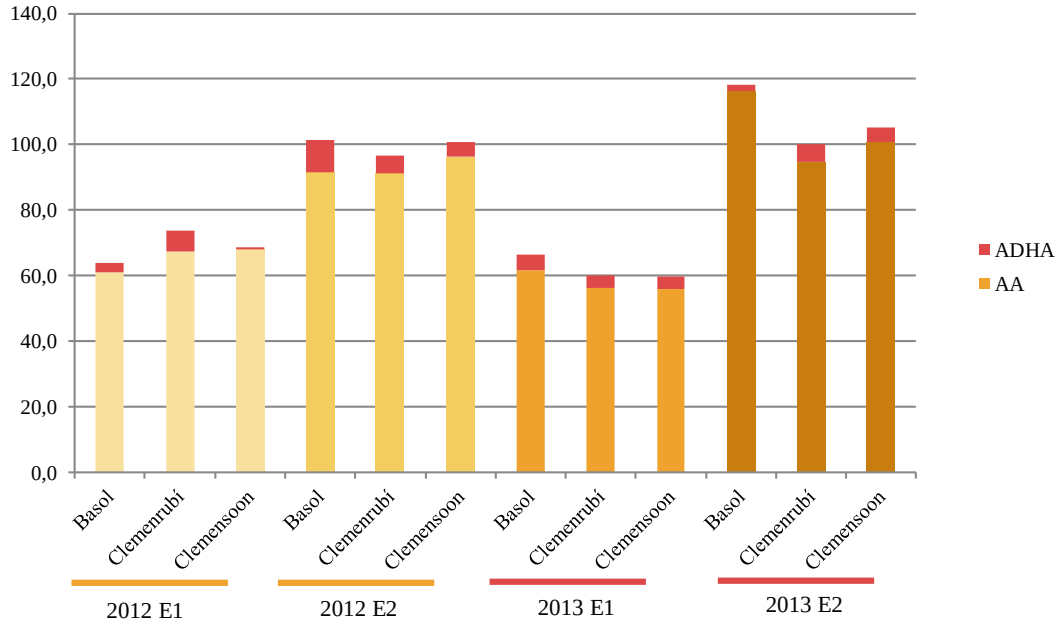


Figura 31. Contenido medio en vitamina C total, AA y ADHA (mg/100g de porción comestible) en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

A la vista de los resultados, podemos determinar que, en general las clementinas objeto de estudio mostraron elevados contenidos de vitamina C, y que dichos contenidos se vieron muy influenciados por el proceso de maduración, mostrando diferencias estadísticamente significativas en todas las variedades estudiadas (Basol: p=0,0000; Clemenrubí: p=0,0231; Clemensoon: p=0,0010), tal y como se observa en la **Figura 3.32**.

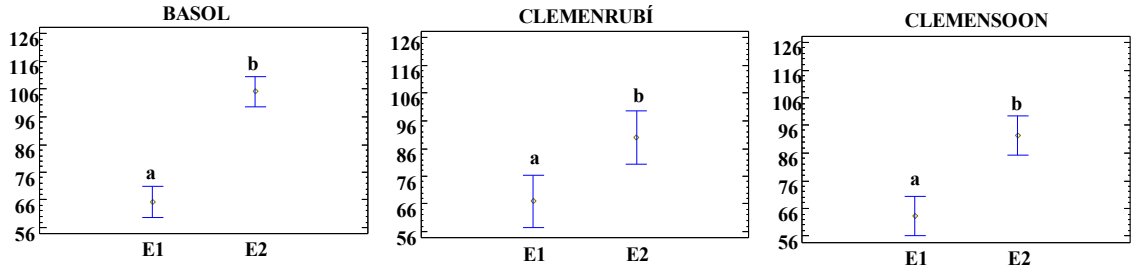


Figura 32. Test de Tukey sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de vitamina C total (mg/100g porción comestible) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Otros de los compuestos importantes en estas frutas cítricas, son los **ácidos orgánicos**, los cuales son compuestos imprescindibles para el normal funcionamiento del metabolismo de las mismas, y algunos de ellos pueden tener actividad biológica como antioxidantes debido a la capacidad de actuar como agentes quelantes o secuestrantes de metales, y por tanto generar efectos beneficiosos para la salud humana (Yahia, 2011).

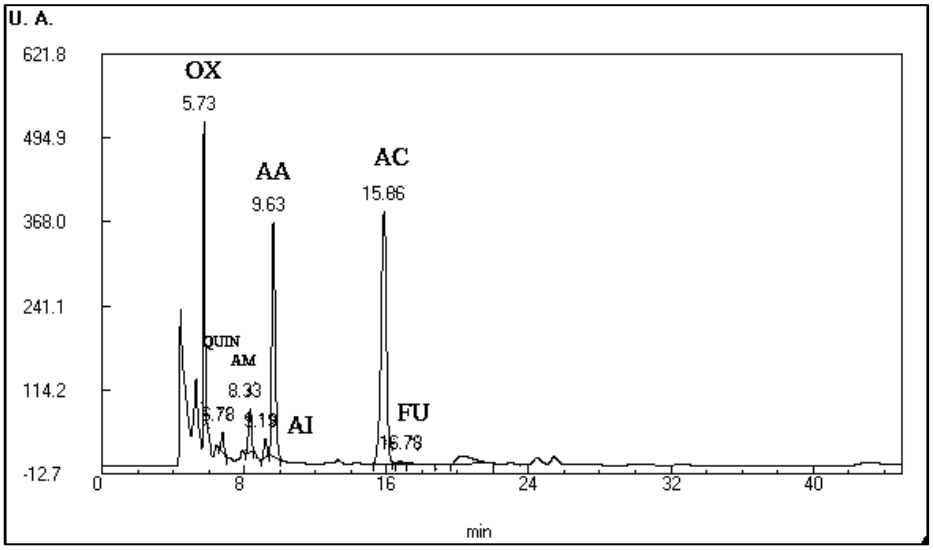


Figura 3.33. Perfil cromatográfico de ácidos orgánicos en la variedad Basol correspondiente a la temporada 2013 y estado de maduración E2. Ácido Oxálico (OX), Ácido Quínico (QUIN), Ácido málico (AM), Ácido Isocítrico (AI), Ácido cítrico (AC) y Ácido Fumárico (FU)

En las clementinas analizadas se identificaron los siguientes ácidos orgánicos: ácido oxálico, quínico, málico, isocítrico, ascórbico, cítrico y fumárico. A modo de ejemplo, en la **Figura 3.33** se muestra el perfil cromatográfico típico de ácidos orgánicos en la clementina Basol correspondiente al año de recolección 2013 y en su estado de maduración organoléptico (E2).

Los resultados de los contenidos en ácidos orgánicos de las variedades de clementinas extra precoces estudiadas se muestran en la **Tabla 3.10**.

Tabla 3.10. Ácidos orgánicos cuantificados (mg/100g ssf) de variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración.

Variedad	Ácidos Orgánicos	2012		2013	
		E1	E2	E1	E2
Basol	Ác. Oxálico	46,83 ± 4,92a	41,04 ± 2,25a	46,18 ± 7,21b	28,71 ± 1,70a
	Ác. Quínico	25,72 ± 1,12a	45,19 ± 3,49b	68,78 ± 2,70a	71,69 ± 1,88a
	Ác. Málico	92,41 ± 0,53a	119,41 ± 3,47b	53,00 ± 3,16a	79,92 ± 6,86b
	Ác. Isocítrico	136,37 ± 3,90a	150,33 ± 5,06b	43,51 ±1,85a	53,79 ± 2,74b
	Ác. Cítrico	624,25 ± 6,60b	482,81 ± 17,24a	821,99 ±51,34b	664,79 ± 15,39a
	Ác. Fumárico	0,77 ± 0,02a	0,79 ± 0,04a	0,05 ± 0,01a	0,04 ± 0,00a
Clemenrubí	Ác. Oxálico	50,93 ± 3,00b	43,10 ± 1,80a	56,77 ± 4,67b	30,12 ± 1,36a
	Ác. Quínico	32,60 ± 0,69a	40,89 ± 3,07b	69,74 ± 4,99a	71,65 ± 6,24a
	Ác. Málico	132,95 ± 0,32a	137,12 ± 4,30a	84,90 ± 4,15a	115,49 ± 8,09b
	Ác. Isocítrico	66,49 ± 1,87a	73,34 ± 3,76b	65.67 ± 3,96b	49,56 ± 5,18a
	Ác. Cítrico	694,65 ± 23,89b	561,01 ± 8,80a	622,00 ± 29,82b	446,39 ± 3,20a
	Ác. Fumárico	1,02 ± 0,02b	0,77 ± 0,03a	0,06 ± 0,00b	0,04 ± 0,01a
Clemensoon	Ác. Oxálico	51,67 ± 1,30b	40,84 ± 2,13a	57,57 ± 4,09b	30,70 ± 0,61a
	Ác. Quínico	24,11 ± 1,52a	38,82 ± 2,23b	95,63 ± 4,21b	73,44 ± 6,71a
	Ác. Málico	108,03 ± 0,69a	126,36 ± 3,63b	69,23 ± 10,19a	99,34 ± 1,95b
	Ác. Isocítrico	118,14 ± 6,79b	69,10 ± 3,20a	61,44 ± 5,49b	47,54 ± 2,76a
	Ác. Cítrico	610,96 ± 13,62b	548,34 ± 23,84a	818,06 ± 1,24b	639,37 ± 35,89a
	Ác. Fumárico	0,90 ± 0,02a	0,99 ± 0,07a	0,10 ± 0,02b	0,04 ± 0,00a

Resultados expresados como Media ± Desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptico. En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

En el presente estudio, el ácido cítrico (AC) fue el ácido orgánico mayoritario en todas las variedades de clementinas estudiadas, alcanzando valores de más de 800 mg/100g de porción comestible, tal y como ocurrió en Basol y Clemensoon, llegando a representar hasta un 79 % del total de ácidos orgánicos identificados y cuantificados. En general, en todas las clementinas estudiadas conforme aumentó el grado de madurez para cada temporada se observó un descenso de este ácido orgánico (hasta 23 % Clemenrubí, temporada 2012).

Del mismo modo, el estudio de la influencia del proceso de maduración sobre el ácido cítrico), independientemente de la temporada de recolección (**Figura 3.35**) mostró la misma tendencia; una significativa disminución entre ambos estados de maduración.

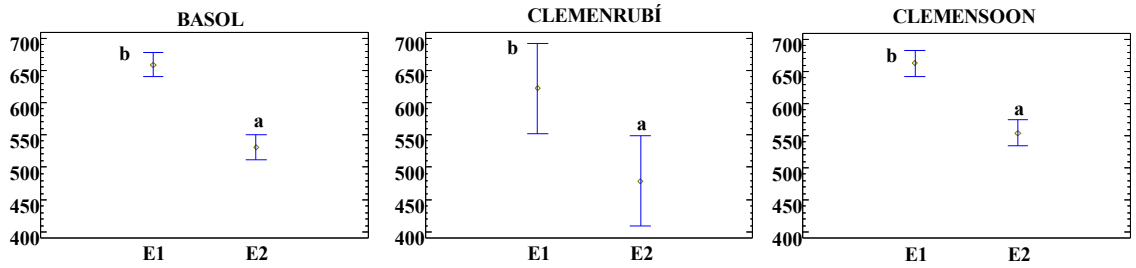


Figura 3.35. Test de Tukey sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de vitamina C total (g/100g) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

El ácido málico (AM) junto con ácido isocítrico (AI), el ácido oxálico (OX) y ácido quínico (QUIN), son los siguientes ácidos orgánicos mayoritarios, su contenido varía con el grado de madurez dependiendo de la temporada. En el caso del ácido málico en general aumenta con el grado de madurez, excepto en la variedad Clemenrubí que en la temporada 2012 permanece estable. Sin embargo, el ácido isocítrico y el ácido quínico muestran un comportamiento irregular con respecto al grado de madurez, probablemente debido a las diferentes transformaciones que sufren en las rutas metabólicas del ciclo de Krebs. En el caso del ácido oxálico sigue el mismo comportamiento que el ácido cítrico, disminuyendo con respecto al estado de maduración de las frutas, excepto en Basol que permanece estable en la temorada 2012.

Por último, el ácido fumárico (FU) fue el ácido orgánico minoritario en todas las clementinas estudiadas, con valores muy inferiores al resto de ácidos orgánicos analizados, oscilando en un rango de 0,04 − 1,02 mg/100g de porción comestible.

Como se observa en la **Figura 3.34**, todas las clementinas objeto del presente estudio ven reducido el contenido de acido cítrico, ácido orgánico mayoritario, en el estado de maduración organoléptico E2.

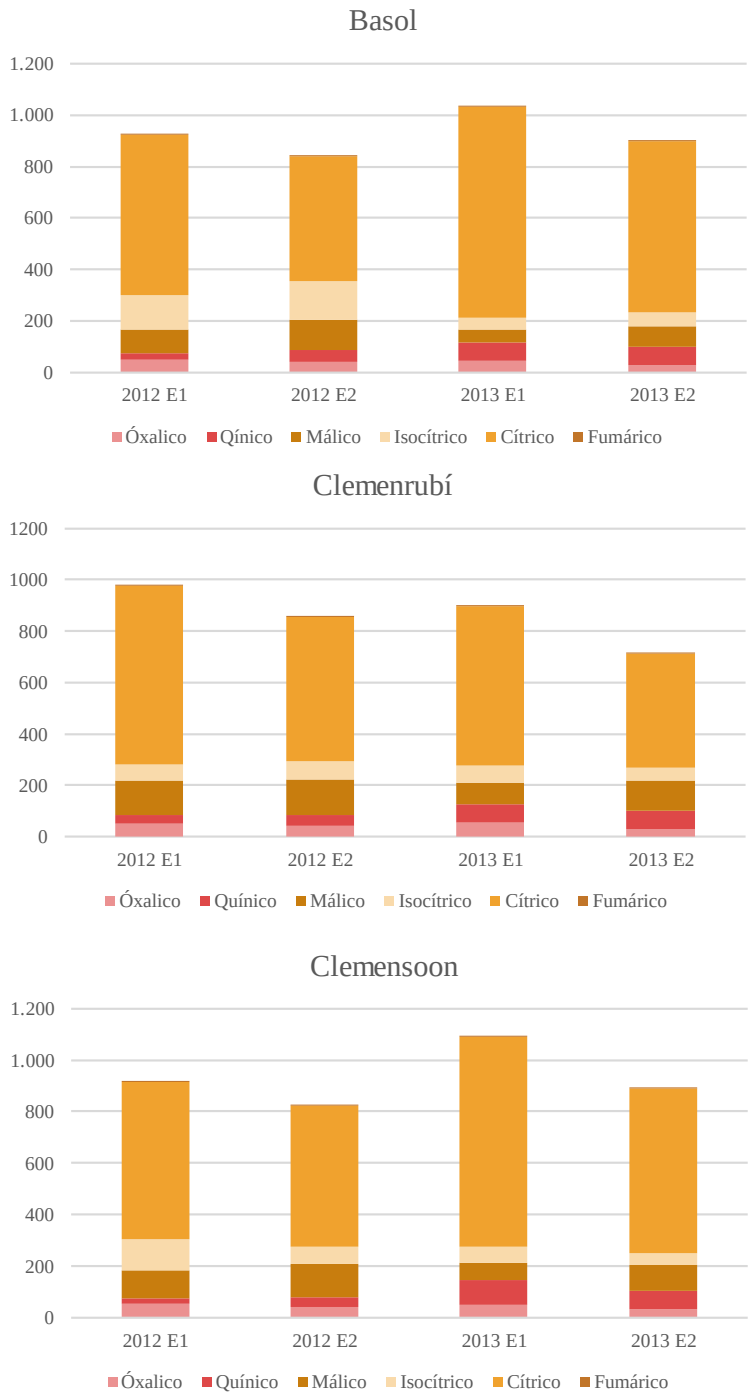


Figura 3.34. Contenido en ácidos orgánicos (g/100g de porción comestible) en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

Dicha reducción en general del contenido de ácidos orgánicos y especialmente del ácido cítrico en la pulpa de las clementinas, es uno de los principales cambios asociados al proceso de maduración. El ácido cítrico se acumula en las primeras etapas del proceso de maduración, de ahí que sus contenidos sean más elevados en el estado de maduración intermedio E1; en dichas etapas iniciales de la maduración la enzima aconitasa, que transforma el ácido cítrico en ácido aconítico podría estar en una forma inactiva. Conforme madura el fruto y aumenta la actividad de dicha enzima, aumenta la cantidad de ácido cítrico transformado en el ciclo de Krebs (Cercós *et al*., 2016), proceso respiratorio bioquímico generador de energía necesaria para el desarrollo del fruto y del resto de los ácidos orgánicos presentes en este tipo de frutas. Este hecho, hace que disminuya o se detenga la acumulación de ácido cítrico, sin embargo, continúan acumulándose hidratos de carbono y agua, por lo que se produce un efecto de dilución de la concentración de ácido, responsable de la característica disminución de la acidez con la madurez del fruto, tal y como se mencionó anteriormente en el presente capítulo en la discusión de los resultados de acidez titulable.

Esudios como el publicado por Bermejo y Cano, (2012) indican que la variación de contenido de los ácidos orgánicos como el ácido cítrico y málico presentes en las clementinas, se ve muy influenciada por el proceso de maduración entre otros procesos como las diferencias genotípicas, condiciones climáticas de la pre-cosecha, e incluso prácticas culturales y métodos de cosecha. Por otro lado, los resultados están en concordancia con el perfil de ácidos orgánicos descritos en otras variedades de mandarinas del tipo clementinas y satsumas procedentes de Turquía, en los cuales los ácidos orgánicos mayoritarios fueron el ácido cítrico y málico (Karadeniz, 2004).

Otros autores como Nour *et al*., 2010 indican la presencia de otros ácidos orgánicos como el ácido tartárico y el láctico en clementinas. Además, en este mismo estudio las cantidades de ácido málico y cítrico en clementinas están en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio. Por otro lado, un estudio realizado sobre las primeras fases de maduración de algunos cítricos, tales como la naranja y limón, indicaron elevadas concentraciones de ácido quínico y oxálico, mientras que a medida que aumentaba el grado de madurez predominaban las concentraciones de ácido cítrico y málico (Albertini *et al*., 2006).

Los cítricos, y en particular las clementinas también son ricos en **compuestos fenólicos**, incluyendo flavonoides, ácidos benzoicos e hidroxicinámicos, con potenciales propiedades promotoras de la salud. Estos componentes se han propuesto como contribuyentes importantes a la capacidad antioxidante total (Burda y Oleszek, 2001; Rapisarda *et al*., 1999). Se ha demostrado que los flavonoides, los compuestos fenólicos más abundantes en los cítricos (Nogata *et al*., 2006), tienen muchas funciones biológicas entre las que destacan por su actividad antioxidante, anticancerígena, cardiovascular y antiinflamatoria (Benavente-García y Castillo, 2008; Huang y Ho, 2010).

En el presente estudio, se detectaron diecisiete compuestos fenólicos diferentes (**Tabla 3.11**) en las muestras de pulpa de las clementinas analizadas, entre los que se encuentran, flavanonas, flavonas, polimetoxiflavonas, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos. La familia mayoritaria de estos compuestos fenólicos fue la familia de los **flavonoides** siendo la mayoría de ellos *C* y *O*-glucósidos, tal y como se podía esperar, puesto que son los compuestos mayoritarios en la mayoría de las variedades de cítricos (Ferreres *et al*., 2011, Rodríguez-Rivera *et al*., 2014; Abad García-Rivera *et al*., 2012).

La identificación tentativa de los mismos se muestra en la tabla 11, tal y como podemos observar, el pico **5p** presentó el ión molecular $[MH]^-$ en una relación m/z de 593, liberando fragmentos MS^2 a m/z 503 (-90 um), 473 (-120 um), 383 (-120 - 90 um) y 353 (-120-120 um), siendo este un patrón de fragmentación típico de las C-glicosil-flavonas (Cuyckens y Claeys, 2004). El pico **9p** presentó el ión molecular $[MH]^-$ a m/z 623, con pérdidas neutrales sucesivas de 90 y 120 unidades de masa (um), señalando su identificación tentativa diosmetina-6,8-di-*C*-glucósido, debido a su descripción previa en muestras de limón de Garcia-Salas *et al*. (2013).

La presencia de esta última C-glicosil flavona también se ha descrito en otras variedades de cítricos como *Citrus suhuiensis* y *Citrus microcarpa* (Roowi y Crozier, 2011) y en zumos de cítricos (Caristi *et al*., 2006, Abad-García *et al*., 2012).

Tabla 3.11. Tiempo de retención, (tR) longitud de onda del máximo de absorción (λ_{max}), datos de espectro de masas (MS^2) e identificación tentativa de compuestos fenólicos presentes en las clementinas analizadas en las diferentes temporadas y estados de maduración

Pico	tR (min)	λ_{max} (nm)	Ión Molecular $[M-H]^-$ (*m/z*)	MS^2 (*m/z*)	Identificación tentativa
1p	5.2	272	385	281(78), 223(3),193(12),133(10)	Sinapoilo-glucósido[1]
2p	6.4	324	385	367(9),209(27),191(100),173(3),147(15),129(19)	Ácido feruloil-glucárico[2]
3p	6.8	266	341	179(100),135(52)	Cafeoilo-glucósido[3]
4p	9.1	274/sh328	355	295(2),235(4),217(13),193(28),175(100)	Feruloilo-6'- *O*-glucósido[2]
5p	9.5	332	593	575(2),503(9),473(20),383(18),353(23)	Vicenina II (Apigenina-6,8-di-*C*-glucósido)[4]
6p	10.7	282/sh336	433	271(100)	Naringenina- *O*-hexósido[5]
7p	10.9	284/sh338	443	399(3),381(4),341(2),299(14),281(15)	Ácido dihidrofaseico-glucósido
8p	11.6	268	281	237(95),189(29),171(100),145(12),139(19),123(54)	Ácido dihidrofaseico
9p	13.0	338	623	605(3),533(5),503(31);413(11);383(22),312(8)	Diosmetina-6,8-di-*C*-glucósido[6]
10p	14.9	286/sh336	427	385(7),367(27),223(9),205(50),179(10),153(100),138(19)	Derivado de Hidroxicinamoilo[7]
11p	16.9	326	561	367(100),337(10),193(84),191(33),173(29),134(18)	Derivado de Ácido feruloilquínico[2]
12p	17.4	326	561	367(100),337(8),193(92),191(29),173(26),134(14)	Derivado de Ácido feruloilquínico[2]
13p	18.2	356	609	301(100)	Rutina (quercetina-3-*O*-rutinósido)[8]
14p	19.8	280/sh334	579	271(100)	Narirrutina/Naringina[5]
15p	22.5	284/sh340	609	301(100)	Herperidina/Neohesperidina[9]
16p	23.1	348	693	633(2),595(9),507(3),395(4)	Nomilina-glucósido[9]
17p	30.8	344	593	285(100)	Kaempferol-*O*-desoxihexósido-hexósido[10]

nd: No identificado. Curvas de calibración usadas: 1- ácido sinápico (y=270.42x+62.29; R^2=0.999); 2- ácido ferúlico (y=525.36x+233.82; R^2=0.999); 3- ácido cafeico (y=359.01x+488.40; R^2=0.998); 4- apigenina-6-*C*-glucósido (y=179.52x+116.83; R^2=0.999); 5- naringenina (y=539.98x+161.46; R^2=0.995); 6- luteolina-6-*C*-glucósido (y=423.95x+91.13; R^2=0.999); 7- ácido cinámico y=1979x+787.15; R^2=0.994); 8-quercetina-3-*O*-rutinósido (y=280.87x+373.73; R^2=0.998); 9-hesperetina (y=792.22x-76.88; R^2=0.999); 10- kaempferol-3-*O*-rutinósido (y=182.94x+96.64; R^2=0.999). En cada fila letras diferentes indicant diferencias estadísticamente significativas (p<0.05).

El resto de los flavonoides se identificaron como glucósidos unidos por oxígeno (*O*). El pico **13p** se identificó como rutina (quercetina-3-O-rutinósida) mediante la comparación de sus espectros de UV y de masas junto con el tiempo de retención de un compuesto estándar comercial. Las características del espectro de masa del pico **14p**, con el ión molecular $[MH]^-$ a m/z 579 liberando un fragmento MS^2 único a m/z 271 (-308 um, lo que correspondería a la pérdida de un fragmento de desoxihexosil-hexósido), coincidiría con naringenin-7-*O*-rutinósida (narirutina) y naringenina-7-*O*-neohesperidosa (naringina), que son flavanonas comunes en los cítricos (Abad-García *et al*., 2007; Barraca *et al*., 2011; Amakura *et al*., 2013; DiDonna *et al*., 2013, García-Salas *et al*., 2013, Rodriguez-Rivera *et al*., 2014). De manera similar ocurre con el pico **15p**, con un ión molecular $[MH]^-$ a m/z 609 liberando un fragmento MS^2 a m/z 301, que podría corresponder a la molécula de hesperetina-7-*O*-rutinósida (hesperidina) o hesperetina-7-O-neohesperidósido (neohesperidina). Los datos obtenidos a partir de este análisis no permitieron decidir sobre la identidad exacta de estos compuestos. En cuanto al pico **6p** presentó un ión molecular ($[MH]^-$ a m/z 433, liberando un fragmento iónico a m/z 271) en el cual podría proponerse una tentativa de identificación como naringenin-*O*-hexósido.

Con respecto al pico **17p**, con ión molecular $[MH]^-$ a m/z 593, liberó un fragmento único a m/z 285 (kaempferol, pérdida de 146 + 162 um), se descartó una identidad como kaempferol-3-*O*-rutinósido después de su comparación con un patrón, de modo que se identificó como kaempferol-O-desoxihexósido-hexósido.

Otro grupo importante de compuestos fenólicos detectados en las muestras estudiadas correspondió a los derivados relacionados con hidroxicinamoílo. El pico **1p** se identificó tentativamente como sinapoilo-glucósido, basado en su ión molecular de $[MH]^-$ a m/z 385, identificado previamente en el zumo de limón (Miyake *et al*., 2007).

El pico **2p** presentó el mismo ión molecular que el pico 1p, pero con un patrón de fragmentación diferente. Un compuesto con características espectrales similares fue descrito por Lorenz *et al*. (2012) en la planta medicinal *Mercurialis perennis* L. e identificado como feruloil-glucarato. Este mismo compuesto (ácido *p*-feruloil-glucárico) así como el ácido *p*-feruloil-galactárico, compuestos análogos se aislaron a partir de cáscara de naranja y se identificaron completamente por Risch *et al*. (1987). Las características espectrales de masas del pico **4p** ($[M-H]^-$ a m/z 355 y fragmentos MS^2 a m/z 295, m/z 235 y m/z 193) son similares

a las descritas por Rodriguez-Rivera *et al*. (2014) para la feruloyl-6'-*O*-glucosa encontrada en la cáscara de *C. limetta* y previamente identificada por Miyake *et al*. (2007) en el zumo de limón, de modo que esta identificación es asumida para el compuesto detectado en la presente tesis doctoral. De forma similar, el pico **3p** correspondería a un cafeoil-glucósido.

Los picos **11p** y **12p**, con el mismo ión molecular $[M-H]^-$ a m/z 561, presentan un fragmento MS^2 a m/z 367 y una fragmentación típica de ácidos feruloil-quínicos (AFQ). Se observaron adicionalmente dos señales de fragmentación a m/z 191 (ácido quínico) y m/z 173 correspondientes a la pérdida del fragmento feruloilo (176 um) y de una molécula de agua. En general, no se pudo establecer una identificación exacta para estos compuestos como derivados del ácido feruloil-quínico.

El pico **10p** ($[MH]^-$ a m/z 427) debería corresponder a un derivado del hidroxicinamoilo como se sugiere por los espectros UV y la observación del patrón de fragmentación característicos de estos compuestos MS^2 a m/z 385, 367, 223 o 179, tal y como se ha discutido anteriormente para otros picos detectados.

Las características UV y de espectroscopía de masas del pico **16p** ($[MH]^-$ a m/z 693) coinciden con las del nomilina-glucósido (Rodriguez-Rivera *et al*., 2014), un compuesto no flavonoide perteneciente a la familia de los limonoides, previamente descrito por otros autores en cítricos (Tian y Ding, 2000, Schoch *et al*., 2001, Vikram *et al*., 2007, Breksa *et al*., 2009).

En cuanto al espectro de masa correspondiente al pico **7p** ($[MH]^-$ a m/z 443) se ha encontrado una concordancia con el compuesto glucósido del ácido dihidrofaseico (Moco *et al*., 2007), un metabolito de la ruta del ácido abscísico identificado en la cáscara de *Citrus kawachiensis* por Amakura *et al*. (2013). Un compuesto con las mismas características también fue encontrado por Rodriguez-Rivera *et al*. (2014) en la cáscara de *C. limetta*, aunque estos autores no propusieron una identificación tentativa para dicho compuesto. El pico **8p** ([M - H] - a m / z 281) podría corresponder a la aglicona del pico 7p, es decir, ácido dihidrofaseico). Si bien, dichos compuestos fueron identificados de forma tentativa, no pudieron ser cuantificados debido a la falta de patrones para realizar la curva de calibrado necesaria para su cuantificación, tal y como se observa en las **tablas 12a y 12b** (**Figura 3.36**).

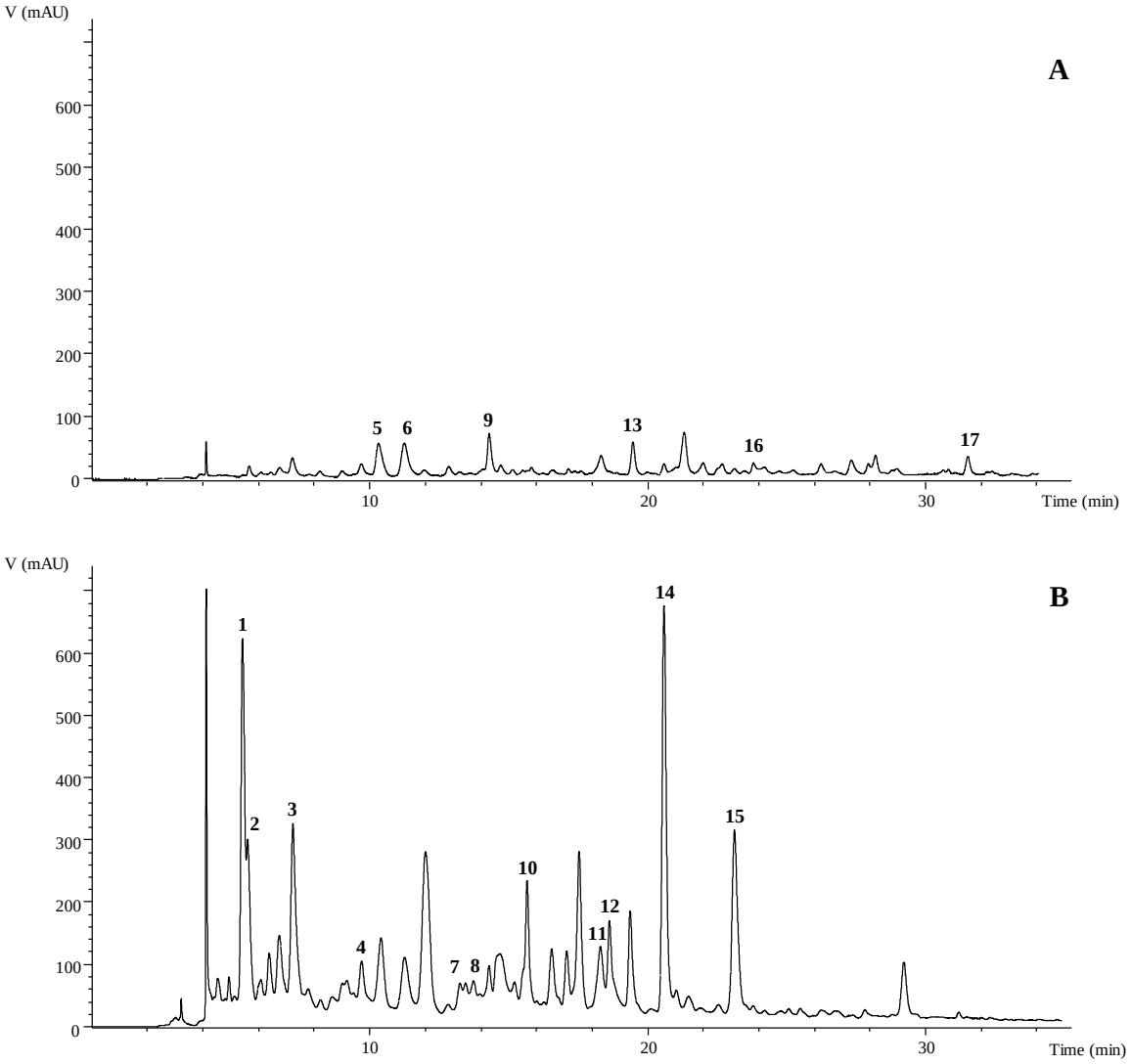


Figura 3.36. Ejemplo de cromatograma correspondiente a la variedad Basol en estado de maduración organoléptico para la temporada 2013. A: longitud de onda 370 nm; B: longitud de onda 280 nm

Tabla 3.12a. Tiempo de retención, (tR) longitud de onda del máximo de absorción en la región del visible (λ_{max}), datos de espectros de masas (MS^2), identificación y cuantificación (mg/100g de porción comestible) de compuestos fenólicos presentes en variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración (E1 y E2) correspondiente a la temporada 2012

Tentativa de identificación de Compuestos	Basol		Clemenrubí		Clemensoon	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
Sinapoilo-glucósido[1]	**1,08 ± 0,01**	**1,09 ± 0,01**	**1,28 ± 0,04**	**1,40 ± 0,04**	**0,90 ± 0,01**	**0,88 ± 0,01**
Ácido feruloil-glucárico[2]	**0,61 ± 0,00**	**0,49 ± 0,01**	**0,53 ± 0,01**	**0,46 ± 0,03**	**0,52 ± 0,01**	**0,58 ± 0,01**
Cafeoilo-glucósido[3]	**1,23 ± 0,01**	**1,03 ± 0,02**	**1,06 ± 0,00**	**0,90 ± 0,01**	**0,87 ± 0,01**	**0,72 ± 0,01**
Feruloilo-6'- *O*-glucósido[2]	0,26 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,23 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,19 ± 0,01
Vicenina II (Apigenina-6,8-di-*C*-glucósido)[4]	**0,59 ± 0,01**	**0,42 ± 0,01**	**0,40 ± 0,01**	**0,46 ± 0,00**	**0,53 ± 0,00**	**0,37 ± 0,00**
Naringenina- *O*-hexósido[5]	0,20 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,13 ± 0,01
Ácido dihidrofaseico-glucósido	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Ácido dihidrofaseico	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Diosmetina-6,8-di-*C*-glucósido[6]	0,22 ± 0,00	0,17 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,16 ± 0,00
Derivado de Hidroxicinamoilo[7]	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,00	0,06 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,00
Derivado de Ácido feruloilquínico[2]	0,38 ± 0,00	0,25 ± 0,00	0,17 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,00	0,13 ± 0,01
Derivado de Ácido feruloilquínico[2]	0,38 ± 0,00	0,26 ± 0,02	0,17 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,13 ± 0,00
Rutina (quercetina-3-*O*-rutinósido)[8]	**0,24 ± 0,00**	**0,23 ± 0,00**	**0,26 ± 0,01**	**0,24 ± 0,01**	**0,29 ± 0,00**	**0,32 ± 0,00**
Narirrutina/Naringina[5]	**1,42 ± 0,01**	**0,80 ± 0,00**	**0,98 ± 0,02**	**0,91 ± 0,01**	**1,03 ± 0,02**	**0,75 ± 0,01**
Herperidina/Neohesperidina[9]	**0,62 ± 0,01**	**0,51 ± 0,01**	**0,42 ± 0,01**	**0,65 ± 0,01**	**0,38 ± 0,01**	**0,34 ± 0,01**
Nomilina-glucósido[9]	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00
Kaempferol-*O*-desoxihexósido-hexósido[10]	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,17 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,14 ± 0,01
Ácidos fenólico Totales	**4,05 ± 0,01**b	**3,36 ± 0,02**a	**3,50 ± 0,04**a	**3,53 ± 0,01**a	**2,99 ± 0,03**b	**2,66 ± 0,01**a
Flavonoides Totales	**3,60 ± 0,06**b	**2,58 ± 0,02**a	**2,60 ± 0,05**a	**2,84 ± 0,02**b	**2,75 ± 0,02**b	**2,24 ± 0,00**a
Compuestos Fenólicos Totales	**7,65 ± 0,07**b	**5,94 ± 0,01**a	**6,10 ± 0,09**a	**6,37 ± 0,01**b	**5,74 ± 0,05**b	**4,91 ± 0,01**a

*nc: no cuantificado. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptico. Curvas de calibración usadas: 1- ácido sinápico (y=270.42x+62.29; R^2=0.999); 2- ácido ferúlico (y=525.36x+233.82; R^2=0.999); 3- ácido cafeico (y=359.01x+488.40; R^2=0.998); 4- apigenina-6-*C*-glucósido (y=179.52x+116.83; R^2=0.999); 5- naringenina (y=539.98x+161.46; R^2=0.995); 6- luteolina-6-*C*-glucósido (y=423.95x+91.13; R^2=0.999); 7- ácido cinámico y=1979x+787.15; R^2=0.994); 8-quercetina-3-*O*-rutinósido (y=280.87x+373.73; R^2=0.998); 9-hesperetina (y=792.22x-76.88; R^2=0.999); 10- kaempferol-3-*O*-rutinósido (y=182.94x+96.64; R^2=0.999). En cada fila, diferentes letras entre los dos estados de maduración para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 3.12b. Tiempo de retención, (tR) longitud de onda del máximo de absorción en la región del visible (λ_{max}), datos de espectros de masas (MS^2), identificación y cuantificación (mg/100g de porción comestible) de compuestos fenólicos presentes en variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración (E1 y E2) correspondiente a la temporada 2013

Tentativa de identificación de Compuestos	Basol		Clemenrubí		Clemensoon	
	E1	E2	E1	E2	E1	E2
Sinapoilo-glucósido[1]	**0,42 ± 0,00**	**1,20 ± 0,02**	**0,88 ± 0,01**	**0,93 ± 0,00**	**0,94 ± 0,00**	**0,90 ± 0,01**
Ácido feruloil-glucárico[2]	**0,35 ± 0,01**	**0,65 ± 0,03**	**0,48 ± 0,01**	**0,62 ± 0,00**	**0,53 ± 0,00**	**0,45 ± 0,02**
Cafeoilo-glucósido[3]	**0,59 ± 0,00**	**1,09 ± 0,02**	**1,02 ± 0,03**	**0,93 ± 0,03**	**1,47 ± 0,02**	**0,85 ± 0,00**
Feruloilo-6'- *O*-glucósido[2]	0,10 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,16 ± 0,00
Vicenina II (Apigenina-6,8-di-*C*-glucósido)[4]	**0,18 ± 0,01**	**0,84 ± 0,01**	**0,42 ± 0,02**	**0,69 ± 0,02**	**0,61 ± 0,00**	**0,63 ± 0,00**
Naringenina- *O*-hexósido[5]	0,08 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,09 ± 0,00
Ácido dihidrofaseico-glucósido	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Ácido dihidrofaseico	nc	nc	nc	nc	nc	nc
Diosmetina-6,8-di-*C*-glucósido[6]	0,09 ± 0,00	0,20 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,12 ± 0,00
Derivado de Hidroxicinamoilo[7]	0,03 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,07 ± 0,00	0,09 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,05 ± 0,00
Derivado de Ácido feruloilquínico[2]	0,09 ± 0,00	0,14 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,09 ± 0,00
Derivado de Ácido feruloilquínico[2]	0,10 ± 0,00	0,24 ± 0,00	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,16 ± 0,00
Rutina (quercetina-3-*O*-rutinósido)[8]	**0,08 ± 0,00**	**0,22 ± 0,01**	**0,29 ± 0,01**	**0,36 ± 0,01**	**0,40 ± 0,01**	**0,20 ± 0,01**
Narirrutina/Naringina[5]	**0,41 ± 0,00**	**0,81 ± 0,00**	**0,72 ± 0,01**	**0,76 ± 0,01**	**0,77 ± 0,02**	**0,63 ± 0,01**
Herperidina/Neohesperidina[9]	**0,30 ± 0,00**	**0,59 ± 0,01**	**0,47 ± 0,01**	**0,54 ± 0,00**	**0,49 ± 0,01**	**0,39 ± 0,01**
Nomilina-glucósido[9]	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Kaempferol-*O*-desoxihexósido-hexósido[10]	0,15 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,00	0,33 ± 0,00	0,20 ± 0,00
Ácidos fenólicos Totales	**1,67 ± 0,01**a	**3,67 ± 0,01**b	**3,07 ± 0,03**a	**3,17 ± 0,04**b	**3,71 ± 0,02**b	**2,66 ± 0,01**a
Flavonoides Totales	**1,32 ± 0,03**a	**3,10 ± 0,00**b	**2,38 ± 0,06**a	**2,86 ± 0,05**b	**3,11 ± 0,05**b	**2,28 ± 0,02**a
Compuestos Fenólicos Totales	**3,00 ± 0,04**a	**6,78 ± 0,01**b	**5,45 ± 0,03**a	**6,03 ± 0,09**b	**6,82 ± 0,03**b	**4,94 ± 0,03**a

*nc: No cuantificado. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptico. Curvas de calibración usadas: 1- ácido sinápico (y=270.42x+62.29; R^2=0.999); 2- ácido ferúlico (y=525.36x+233.82; R^2=0.999); 3- ácido cafeico (y=359.01x+488.40; R^2=0.998); 4- apigenina-6-*C*-glucósido (y=179.52x+116.83; R^2=0.999); 5- naringenina (y=539.98x+161.46; R^2=0.995); 6- luteolina-6-*C*-glucósido (y=423.95x+91.13; R^2=0.999); 7- ácido cinámico y=1979x+787.15; R^2=0.994); 8-quercetina-3-*O*-rutinósido (y=280.87x+373.73; R^2=0.998); 9-hesperetina (y=792.22x-76.88; R^2=0.999); 10- kaempferol-3-*O*-rutinósido (y=182.94x+96.64; R^2=0.999). En cada fila, diferentes letras entre los dos estados de maduración para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

En general, dentro de la familia de ácidos fenólicos los principales compuestos identificados para todas las variedades estudiadas fueron el sinapoil-glucósido, ácido feruloil-glucárico y cafeoil-glucósido, los tres pertenecientes al grupo de los ácidos hidroxicinámicos. Por otro lado, las flavanonas narirutina/naringina y (neo) hesperidina fueron los principales compuestos identificados dentro de la familia de flavonoides para todas las variedades de clementinas estudiadas.

Las familias principales de compuestos fenólicos mencionadas anteriormente (**Figura 3.37**), ácidos fenólicos y flavonoides, se encontraron en proporciones similares, siendo ligeramente superiores los ácidos fenólicos frente a los flavonoides (hasta un 57 % en la variedad Clemenrubí, temporada 2012 y estado de maduración intermedio E1).

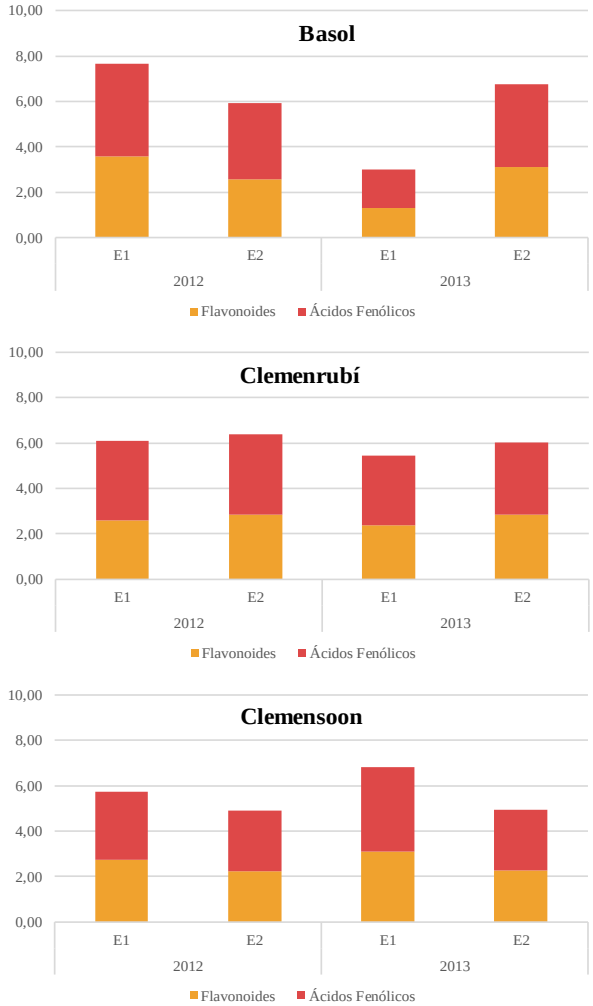


Figura 3.37. Principales familias de compuestos fenólicos (mg/100g de porción comestible) en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

El contenido de los compuestos que forman parte de dichas familias, se vio influenciado por el proceso de maduración, con tendencias diferentes entre variedades. Estudios publicados por otros investigadores indican que la concentración de compuestos fenólicos totales puede aumentar con el proceso de maduración de las frutas, debido principalmente a una mayor exposición a la luz solar (Rodríguez *et al*., 2004). Por su parte Agostini *et al*., (2004) publicaron que la mayoría de los flavonoides presentes en cítricos son susceptibles a los cambios químicos originados por la maduración de estas frutas, indicando que un mayor grado de madurez de las mismas provoca un aumento de la síntesis de flavonoides dado que la formación de estos compuestos puede contrarrestar otros efectos (radiación UV, plagas, insectos, estrés ambienta, etc.) a los cuales puede estar expuesta la fruta (Quiñonez *et al*., 2015).

Tal y como se observa en la **Figura 3.38**, el contenido de compuestos fenólicos totales se vio influenciado por el proceso de maduración, independientemente de la temporada, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre el estado de madurez intermedio y el estado de madurez organoléptico para las variedades Clemenrubí y Clemensoon. Esto significaría que el efecto del proceso de maduración tiene más peso que el efecto temporada. Sin embargo, esta tendencia no fue uniforme para todas las variedades, ya que en la variedad Basol no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) mostrando valores similares en ambos estados de maduración.

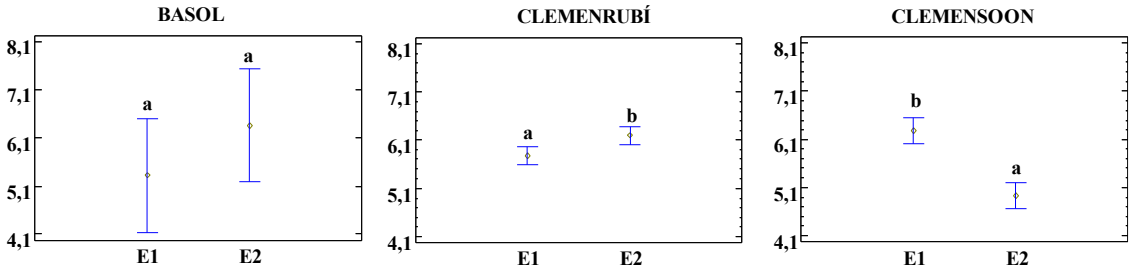


Figura 3.38. Test de Tukey sobre la influencia del estado de maduración en el contenido de compuestos fenólicos totales (mg/100g) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Continuando con el estudio de compuestos bioactivos presentes en clementinas, se llevó a cabo la determinación de la **vitamina E**, término utilizado para designar los compuestos liposolubles denominados tocoferoles y tocotrienoles, los cuales poseen capacidad

antioxidante, lo que conlleva importantes beneficios para la salud. En el presente estudio se ha llevado a cabo la determinación de **tocoferoles** en sus diferentes isoformas.

Se identificaron las cuatro isoformas de tocoferol (α, β, γ y δ – tocoferol) y fueron cuantificadas en las tres variedades de clementinas objeto del presente estudio. Cabe mencionar que en la temporada 2012 las isoformas identificadas fueron α, β y γ – tocoferol, mientras que para la temporada 2013 fueron α, γ y δ – tocoferol. La **Figura 3.39** muestra, a modo de ejemplo un perfil cromatográfico de tocoferoles correspondiente a la variedad Basol, en el cual se muestra los tocoferoles identificados en ambos estados de maduración.

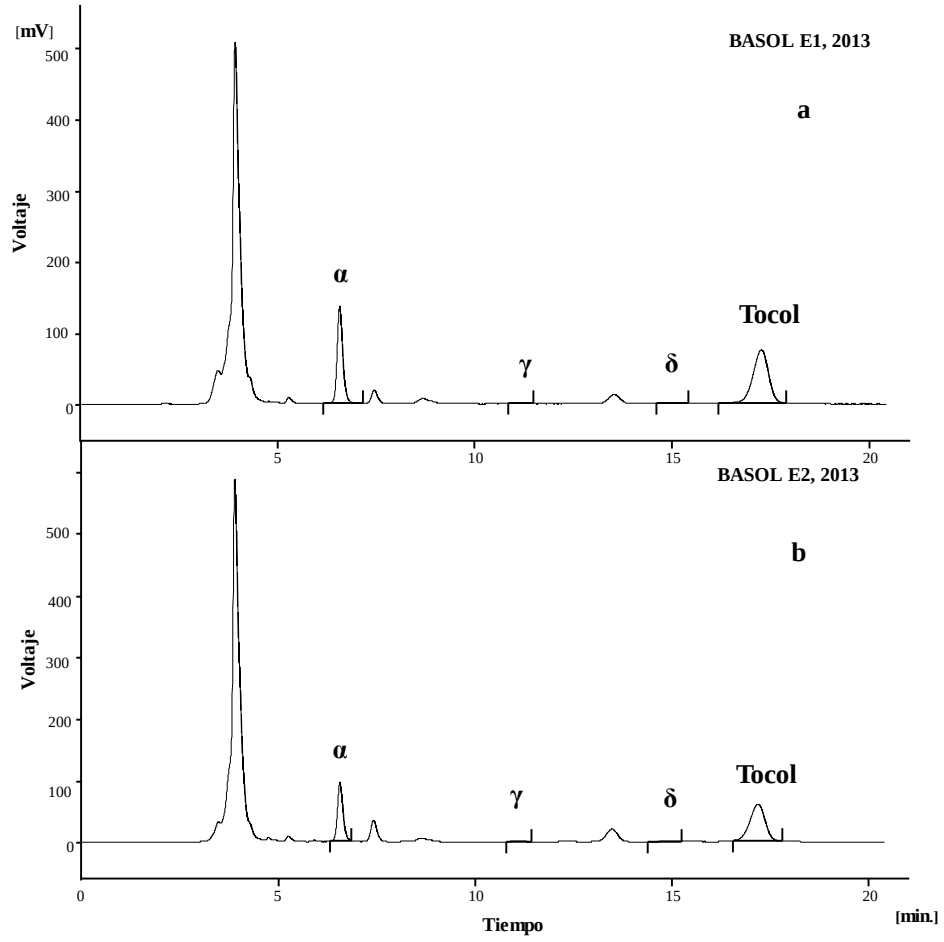


Figura 3.39. Comparación de dos perfiles cromatográficos HPLC-Fluorescencia de la variedad Basol en los que se muestran las diferentes isoformas identificadas en la temporada 2013 en dos estados de maduración E1 (a) y E2 (b)

En dicha figura se aprecia de manera muy visual la diferencia entre el pico correspondiente a la isoforma α – tocoferol y los picos correspondientes al resto de isoformas identificadas, inapreciables visualmente con contenidos mínimos tal y como muestra la **Tabla 3.13**.

Tabla 3.13. Composición de tocoferoles (mg/100g de porción comestible) de las variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración.

Variedad	Año	Estado Maduración	α-tocoferol	β-tocoferol	γ-tocoferol	δ-tocoferol	Total tocoferoles
Basol	2012	E1	0,138 ± 0,002a	0,004 ± 0,001a	0,004 ± 0,000a	nd	0,146 ± 0,002a
		E2	0,103 ± 0,002b	0,006 ± 0,002a	0,002 ± 0,001b	nd	0,111 ± 0,005b
	2013	E1	0,243 ± 0,021a	nd	0,006 ± 0,001a	0,007 ± 0,000a	0,257 ± 0,020a
		E2	0,232 ± 0,000a	nd	0,011 ± 0,000b	0,007 ± 0,001a	0,250 ± 0,001a
Clemenrubí	2012	E1	0,285 ± 0,014a	0,008 ± 0,002a	0,006 ± 0,001a	nd	0,300 ± 0,018a
		E2	0,122 ± 0,005b	0,009 ± 0,000a	0,004 ± 0,000b	nd	0,134 ± 0,005b
	2013	E1	0,244 ± 0,011a	nd	0,004 ± 0,000a	0,006 ± 0,001a	0,255 ± 0,011a
		E2	0,302 ± 0,013b	nd	0,017 ± 0,003b	0,008 ± 0,002a	0,331 ± 0,021b
Clemensoon	2012	E1	0,178 ± 0,012a	0,004 ± 0,001a	0,003 ± 0,000	nd	0,186 ± 0,011a
		E2	0,135 ± 0,002b	0,008 ± 0,000b	0,003 ± 0,000	nd	0,146 ± 0,002b
	2013	E1	0,216 ± 0,010a	nd	0,008 ± 0,001	0,014 ± 0,001a	0,238 ± 0,008a
		E2	0,192 ± 0,009b	nd	0,009 ± 0,000	0,006 ± 0,001b	0,207 ± 0,008b

nd: No detectado. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptica. En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Los tocoferoles (vitamina E) no están presentes en grandes cantidades en la pulpa de los cítricos y en particular de las clementinas objeto del presente estudio, no obstante, la isoforma mayoritaria en todas las variedades estudiadas fue el α – tocoferol con cantidades destacadas con respecto al resto de isoformas cuantificadas (entre 0,103 y 0,302 mg/100g de porción comestible), representando más del 90 % en todas las clementinas estudiadas con respecto al total. Dichos contenidos están presentes en cantidades similares para todas las clementinas y parecen verse influenciados por el proceso de maduración entre temporadas.

En cuanto al resto de isoformas identificadas y cuantificadas, el β – tocoferol, γ – tocoferol y δ – tocoferol aparecieron en proporciones similares en todas las clementinas analizadas, representando con respecto al total de tocoferoles un porcentaje mínimo de 6,85 %; 6,45 % y 6,05 % respectivamente.

Si bien, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes estados de maduración para una misma temporada, el análisis comparativo sobre la influencia del proceso de maduración con independencia de la temporada, mostró valores similares y homogéneos entre ambos estados de maduración para todas las clementinas estudiadas, por tanto, el proceso de maduración no influyó de manera directa en el contenido de tocoferoles. Obviando la diferencia entre temporadas, el estudio comparativo entre los diferentes estados de maduración no mostró diferencias. A diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio, otros investigadores como Beltrán *et al*., (2003) indicaron en su artículo que compuestos antioxidantes como los tocoferoles ven reducida su concentración a lo largo del proceso de maduración.

El estrés oxidativo acompaña a numerosas patologías del organismo como causa o consecuencia, por lo que puede resultar interesante la evaluación del estado de las defensas antioxidantes en ellas, de modo que en el presente trabajo también se procedió a la valoración de la **capacidad antioxidante** de las muestras objeto de estudio, para ello se aplicaron distintos métodos analíticos *in vitro* como: el ensayo del DPPH y poder reductor (PR), para evaluar la actividad antioxidante total, además de un método para evaluar la capacidad de inhibición de la peroxidación lipídica que fue el método de inhibición de la decoloración del β – caroteno.

Para estandarizar los resultados obtenidos en este tipo de ensayos, es habitual calcular el parámetro EC_{50}. A continuación, en la **Tabla 3.14** se muestran los resultados obtenidos

correspondientes a los diferentes métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* expresando el resultado en la EC_{50} en mg/mL de extracto metanólico.

Tabla 3.14. Actividad antioxidante en variedades extra precoces de clementinas estudiadas: Basol, Clemenrubí y Clemensoon en dos estados de maduración. EC_{50}: mg/mL extracto

Variedad	Año	Estado Maduración	DPPH	PR	Inhibición de la decoloración de β-caroteno
Basol	2012	E1	7,51 ± 0,20b	2,90 ± 0,02b	0,87 ± 0,01b
		E2	5,27 ± 0,37a	1,32 ± 0,00a	0,30 ± 0,01a
	2013	E1	5,22 ± 0,06a	2,34 ± 0,03a	4,03 ± 0,08b
		E2	13,19 ± 0,23b	2,46 ± 0,09a	0,82 ± 0,05a
Clemenrubí	2012	E1	9,39 ± 0,42b	2,59 ± 0,02a	0,84 ± 0,03b
		E2	5,73 ± 0,38a	3,98 ± 0,24b	0,40 ± 0,02a
	2013	E1	6,85 ± 0,08a	1,49 ± 0,01a	3,42 ± 0,22b
		E2	13,21 ± 0,42b	2,50 ± 0,05b	1,59 ± 0,07a
Clemensoon	2012	E1	5,78 ± 0,42b	5,07 ± 0,02b	1,27 ± 0,17b
		E2	3,36 ± 0,14a	1,52 ± 0,06a	0,36 ± 0,08a
	2013	E1	11,00 ± 0,27a	2,12 ± 0,06a	1,37 ± 0,07a
		E2	10,98 ± 0,55a	2,43 ± 0,01b	2,24 ± 0,05b

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo E1: estado de maduración intermedio; E2: estado de maduración organoléptica. En cada columna, entre temporadas para cada variedad, diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

En el ensayo del DPPH los valores en la EC_{50} (mg/mL) disminuyeron en la temporada 2012 en el estado de maduración organoléptico (E2), de modo que las clementinas más maduras mostraron mayor actividad antioxidante, destacando la variedad Clemensoon (EC_{50} de 3,36 mg/mL). Mientras que en la temporada 2013 la tendencia fue a la inversa, mostrando mayor actividad antioxidante las clementinas del estado de maduración intermedio (E1), destacando la variedad Basol (EC_{50} de 7,51 mg/mL). Además, podemos comprobar que para este ensayo (**Figura 3.41**) se observaron cinéticas de saturación a concentraciones inferiores a los 10 mg/mL de extracto metanólico, lo cual es muy interesante a la hora de considerar estas frutas cítricas con elevado potencial antioxidante.

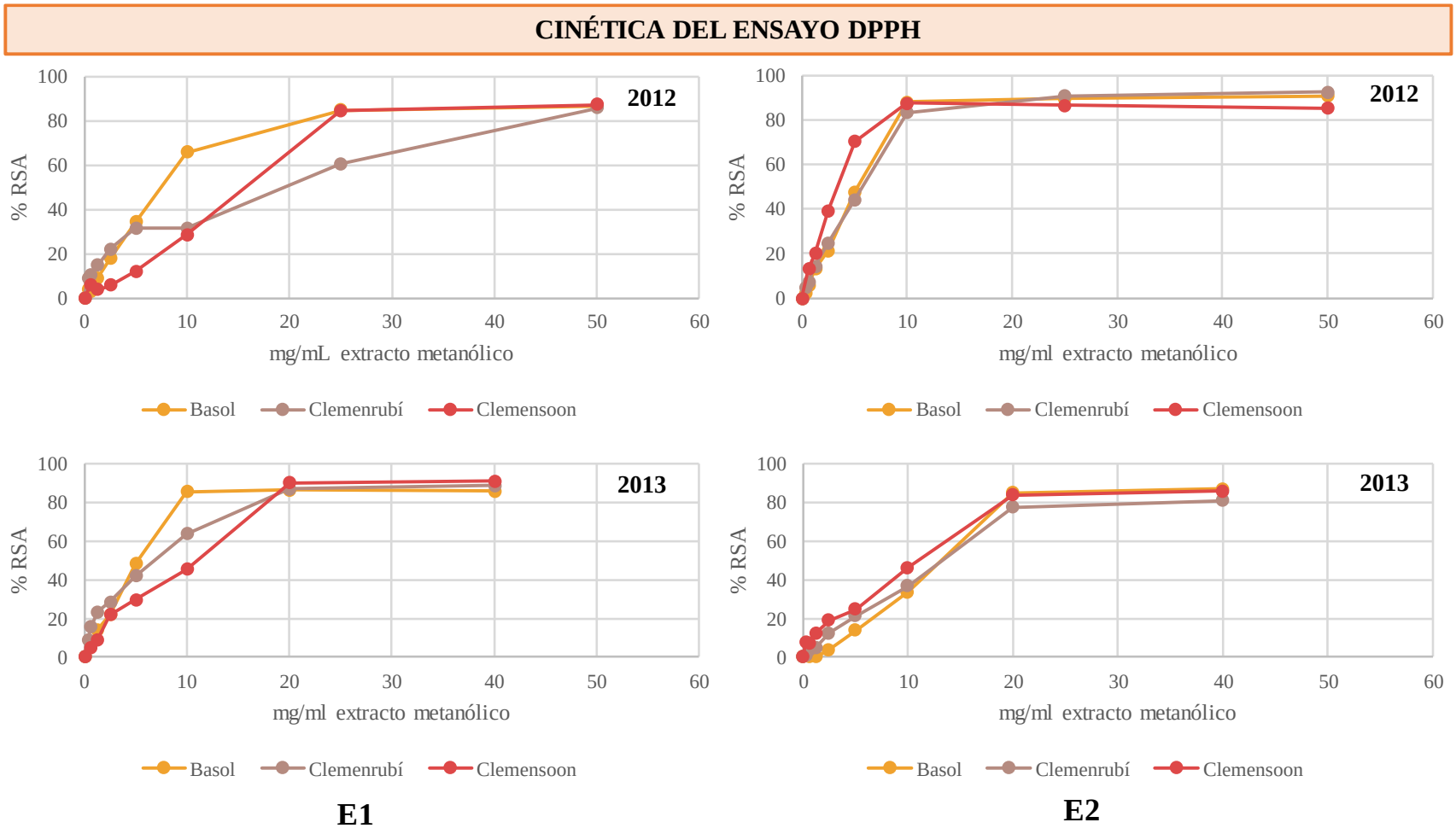


Figura 3.41. Cinéticas obtenidas a partir del ensayo de capacidad antioxidante DPPH, realizado en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

Las concenraciones de EC_{50} obtenidas mediante este ensayo DPPH, superaron el 80 % de capacidad inhibitoria, como ocurre en el caso de la variedad Clemensoon de la temporada 2013 (E2), obteniendo el 50 % de la capacidad inhibitoria con la concentración más baja (3,36 mg/mL de extracto metanólico, **Tabla 3.14**). En general, las muestras de la temporada 2013 fueron las que presentaron las concentraciones más altas (y por lo tanto peor actividad antioxidante) para todas las variedades analizadas, llegando hasta valores de EC_{50} de 13,21 mg/mL en la variedad Clemenrubí (E2).

Por otro lado, en el ensayo del poder reductor (PR) se observaron diferentes comportamientos en cuanto a la actividad antioxidante de las clementinas, dependiendo de la variedad y de la temporada de recolección. La variedad Basol en la temporada 2012, presentó mayor actividad antioxidante en el estado E2, mientras que en 2013 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes estados de maduración. Sin embargo, Clemenrubí mostró la mayor actividad antioxidante mediante este método del PR en el estado de maduración intermedio (E1) en ambas temporadas, presentando los valores más bajos de EC_{50}. Por último, Clemensoon en la temporada 2012, mostró la mayor actividad antioxidante en el mayor grado de madurez (E2) mientras que en la temporada 2013 la tendencia fue a la inversa. En general todas las variedades presentaron cinéticas de saturación inferiores a 10 mg/mL de extracto metanólico, a excepción de la variedad Clemenrubí de la temporada 2012 en el estado de maduración organoléptico E2 y la variedad Basol de la temporada 2013 (E1) que presentaron concentraciones cercanas a 20 mg/mL, y por tanto menor actividad antioxidante medida mediante este método del PR, tal y como se aprecia en la **Figura 3.42**.

Desde el punto de vista de la inhibición de la peroxidación lipídica, evaluada mediante en metodo de inhibición de la decoloración del β – caroteno, todas las clementinas estudiadas mostraron mejores resultados (menor EC_{50}) en el estado de maduración organoléptica (E2), que en el estado de maduración intermedio (E1), con la excepción de la variedad Clemensoon en la temporada 2013. La variedad Basol destaca por presentar en la temporada 2012 el valor más bajo de EC_{50} (0,30 mg/mL) para este ensayo. En general, todas las variedades, independientemente de las variables temporada y maduración, alcanzaron el 50 % de la capacidad inhibitoria a concentraciones inferiores a 2 mg/mL de extracto metanólico (**Figura 43**), a excepción de las variedades Basol y Clemenrubí, ambas de la temporada 2013 (E1).

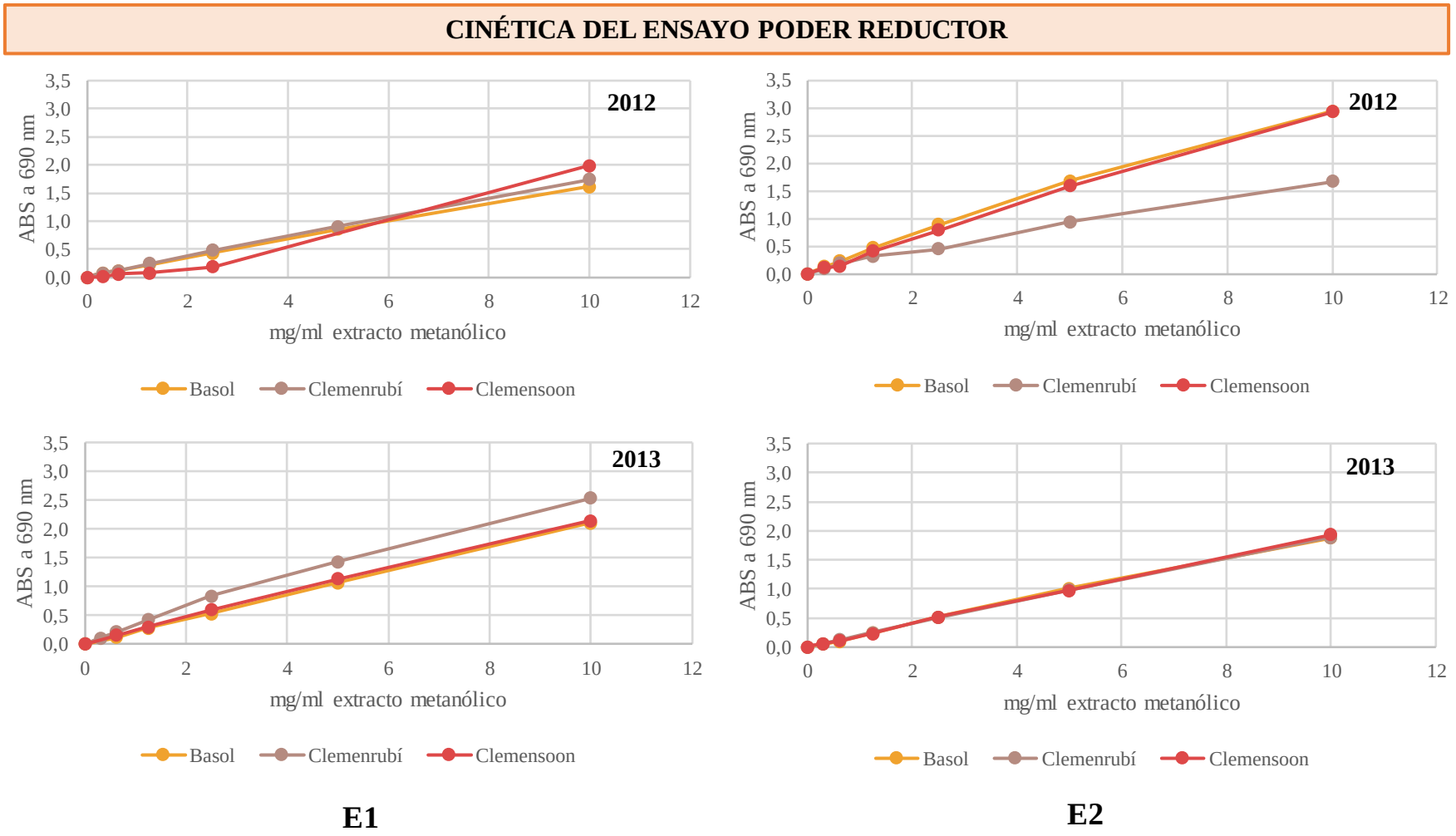


Figura 3.42. Cinéticas obtenidas para el ensayo de capacidad antioxidante poder reductor realizado en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

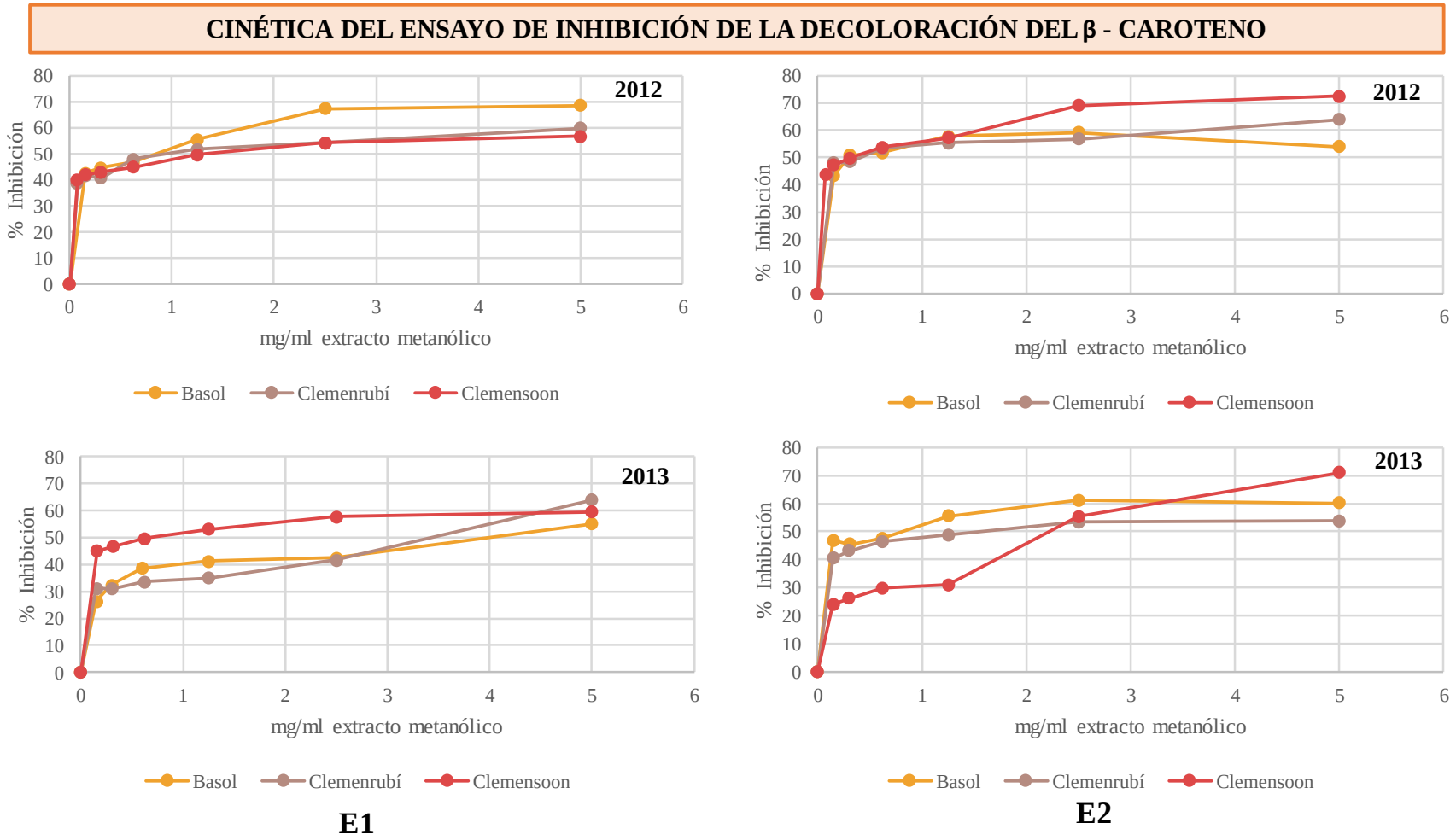


Figura 3.43. Cinéticas obtenidas para el ensayo de inhibición de la decoloración del β – caroteno realizado en las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon) por temporada y estado de maduración (E1 y E2).

En la **Figura 3.44** se observa claramente la influencia del proceso de maduración en la actividad antioxidante medida a través de los diferentes métodos empleados para cada variedad. Basol mostró los valores más bajos de EC_{50} en el estado de maduración intermedio para el método DPPH, sin embargo, para los dos métodos restantes (PR y la ID β - caroteno) fue en el estado de maduración organoléptico (E2), donde se observaron las concentraciones de EC_{50} más bajas, indicando por lo tanto una mayor actividad antioxidante. Clemenrubí mostró el mismo comportamiento tanto en el método DPPH como del PR, mostrando mayor actividad en el estado de maduración intermedio (E1), a diferencia de los resultados obtenidos a través del método de ID β – caroteno, donde fue en el estado de maduración organoléptico (E2) donde se observaron las concentraciones de EC_{50} más bajas.

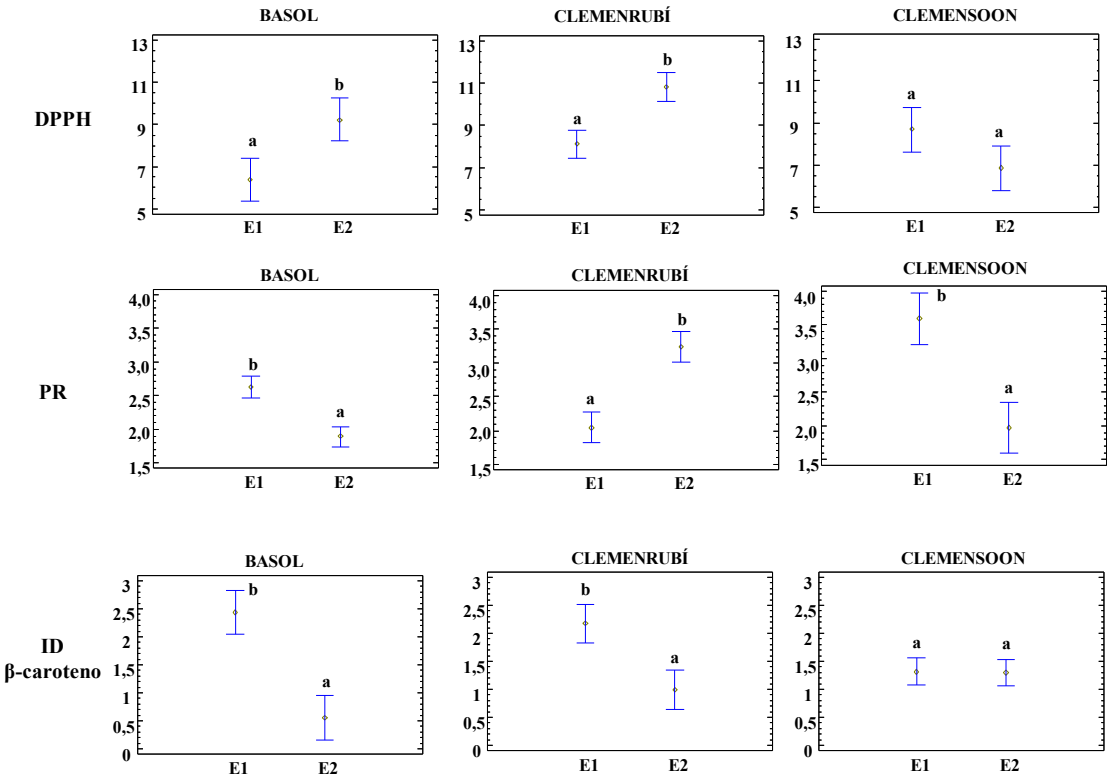


Figura 3.44. Test de Tukey sobre la influencia del estado de maduración en la capacidad antioxidante (EC_{50} mg/mL) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Clemensoon por su parte, mostró valores similares y homogéneos en ambos estados de maduración frente a los métodos de DPPH y ID β – caroteno mostrando la misma actividad

antioxidante, mientras que frente al ensayo del poder reductor se obtuvieron las concentraciones de EC_{50} inferiores en el estado de maduración organoléptico (E2) y, por lo tanto, mayor actividad antioxidante.

A la vista de estos resultados podemos concluir que la capacidad antioxidante de estas frutas presenta un comportamiento muy irregular frente a la influencia del grado de madurez de las mismas. Algunos investigadores aseguran que la actividad antioxidante de algunas frutas no muestra cambios notables con respecto al grado de madurez (Quiñonez., 2015). Lo cual explicaría las diferencias encontradas entre los diferentes estados de maduración debido a que son numerosos los compuestos bioactivos que presentan estas frutas. Por ejemplo, las clementinas que muestran mayor actividad antioxidante en el estado de maduración intermedio (E1), se le puede atribuir al elevado contenido de otros compuestos bioactivos, tales como vitamina C y ácido cítrico, los cuales contribuyen de manera notable a la capacidad antioxidante total.

De la misma forma, una menor concentración de azúcares reductores, influyen beneficiosamente en una menor glucosilación, y por ende en una mayor actividad antioxidante. Por ello, la correlación de la actividad antioxidante de estas frutas frente a la influencia de la maduración, no depende solamente de la concentración de los compuestos antioxidantes, sino también de sus interacciones, ya que pueden ejercer un efecto sinérgico o inhibitorio, lo cual justificaría la variación de la actividad antioxidante en los dos estados de maduración estudiados (Kulkskoski *et al*., 2005).

3.5. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE VARIEDADES EN ESTADO DE MADURACIÓN ORGANOLÉPTICO

Una vez evaluada la influencia del proceso de maduración sobre la composición de las clementinas estudiadas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon), se ha llevado a cabo el siguiente estudio, en el cual se han considerado todos los datos correspondientes al estado de maduración organoléptico (E2), obtenidos en las distintas temporadas (2011, 2012 y 2013) con el fin de que la muestra pueda reflejar el grado de variabilidad natural.

Tabla 3.15. Parámetros físico-químicos de las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico.

Variedad	Temporada	pH	AT*	°Brix	IM**
Basol	2011	3,16 ± 0,03b	15,63 ± 0,21c	14,13 ± 0,00b	14,10 ± 0,19a
	2012	3,07 ± 0,02a	11,63 ± 0,12a	11,90 ± 0,00a	16,08 ± 0,19b
	2013	3,03 ± 0,01a	12,95 ± 0,07b	14,80 ± 0,00c	17,85 ± 0,06c
	Rango de Variación	**3,02 – 3,19**	**11,51 – 15,84**	**11,90 – 14,80**	**13,91 – 17,91**
Clemenrubí	2011	3,22 ± 0,06b	19,40 ± 0,43c	12,70 ± 0,01a	10,23 ± 0,17a
	2012	3,03 ± 0,01a	11,76 ± 0,11b	13,20 ± 0,01b	15,44 ± 0,68b
	2013	3,30 ± 0,02c	11,93 ± 0,67a	14,83 ± 0,06c	19,47 ± 1,01c
	Rango de Variación	**3,02 – 3,32**	**11,26 – 19-83**	**12,69 – 14,89**	**10,06 – 20,48**
Clemensoon	2011	3,42 ± 0,01c	12,56 ± 0,29a	12,03 ± 0,01a	14,97 ± 0,18a
	2012	3,03 ± 0,02a	12,61 ± 0,20a	13,11 ± 0,00b	14,75 ± 0,23a
	2013	3,20 ± 0,01b	12,85 ± 0,33a	13,20 ± 0,00c	16,06 ± 0,41b
	Rango de Variación	**3,01 – 3,43**	**12,27 – 13,18**	**12,02 – 13,20**	**14,52 – 16,47**

*AT: Acidez titulable medida en mL de NaOH 0,1N; **IM: Índice de madurez. Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Tabla 3.16. Composición centesimal (g/100 g de porción comestible) y valor calórico (Kcal/100 g de porción comestible) de las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico

Variedad	Temporada	Humedad	Azúcares Solubles	Fibra Total	Proteínas	Grasa	Cenizas	Valor Calórico
Basol	2011	84,39 ± 0,02a	11,75 ± 0,30b	1,07 ± 0,03a	2,05 ± 0,02b	0,06 ± 0,00a	0,37 ± 0,01b	57,90 ± 1,38c
	2012	87,76 ± 0,29c	9,38 ± 0,03a	2,13 ± 0,05b	1,23 ± 0,01a	0,07 ± 0,01ab	0,34 ± 0,01b	47,23 ± 0,37a
	2013	84,92 ± 0,07b	10,71 ± 0,17b	3,45 ± 0,21c	1,23 ± 0,02a	0,08 ± 0,02b	0,25 ± 0,02a	55,35 ± 1,31b
	Rango de variación	**84,37 – 88,05**	**9,35 – 12,05**	**1,04 – 3,66**	**1,22 – 2,07**	**0,06 – 0,10**	**0,23 – 0,38**	**46,86 – 59,28**
Clemenrubí	2011	82,86 ± 0,40a	12,11 ± 0,07b	1,46 ± 0,03a	1,96 ± 0,08c	0,05 ± 0,00c	0,33 ± 0,02b	59,63 ± 0,69b
	2012	84,99 ± 0,08b	12,86 ± 0,04c	2,36 ± 0,22b	1,65 ± 0,07b	0,05 ± 0,00b	0,37 ± 0,00c	63,16 ± 0,92c
	2013	86,31 ± 0,15c	10,61 ± 0,01a	2,98 ± 0,26c	1,34 ± 0,02a	0,04 ± 0,00a	0,27 ± 0,00a	54,16 ± 0,69a
	Rango de variación	**82,46 – 86,46**	**10,60 – 12,90**	**1,43 – 3,24**	**1,32 – 2,02**	**0,04 – 0,05**	**0,27 – 0,37**	**53,47 – 64,08**
Clemensoon	2011	85,71 ± 0,15a	10,44 ± 0,26b	1,70 ± 0,03a	1,93 ± 0,00c	0,06 ± 0,00b	0,38 ± 0,01b	53,41 ± 1,16a
	2012	86,04 ± 0,33ab	10,47 ± 0,01c	2,18 ± 0,10b	1,60 ± 0,01b	0,04 ± 0,00a	0,31 ± 0,01a	52,97 ± 0,30a
	2013	86,38 ± 0,14b	13,47 ± 0,52a	2,71 ± 0,24c	1,24 ± 0,05a	0,04 ± 0,00a	0,31 ± 0,00a	64,58 ± 2,78b
	Rango de variación	**85,56 – 86,52**	**10,18 – 13,99**	**1,67 – 2,95**	**1,19 – 1,93**	**0,04 – 0,06**	**0,31 – 0,39**	**52,67 – 67,36**

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Todas las clementinas al estado maduro presentaron diferencias estadísticamente significativas entre temporadas para todos los parámetros físico químicos analizados (pH, AT, ºBrix e IM), a excepción de Clemensoon la cual presentó valores similares y homogéneos entre temporadas para la acidez titulable. Estas diferencias pueden deberse a las diferentes condiciones climáticas, destacando la temperatura y humedad, que pueden provocar variaciones en la calidad interna de las frutas, principalmente en la acidez de las mismas, el contenido de sólidos solubles y por consiguiente en el índice de madurez (Del Río *et al*., 2000; Pérez, 2004; Cercós *et al*., 2006)

Hay que recordar que el índice de madurez es el resultado de dos procesos metabólicos simultáneos, por un lado, el incremento de los hidratos de carbono totales y por otro, la disminución de la acidez, principalmente del ácido cítrico, lo cual conlleva una limitación intrínseca que con una misma relación de este parámetro pueden variar los contenidos de los compuestos químicos presentes en estas frutas. (Kimball, 1999; Pérez, 2004).

Considerando todas las temporadas de muestreo, las tres clementinas objeto del presente estudio mostraron valores similares y homogéneos para todos los parámetros físico-químicos analizados sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas, **Figura 3.44**.

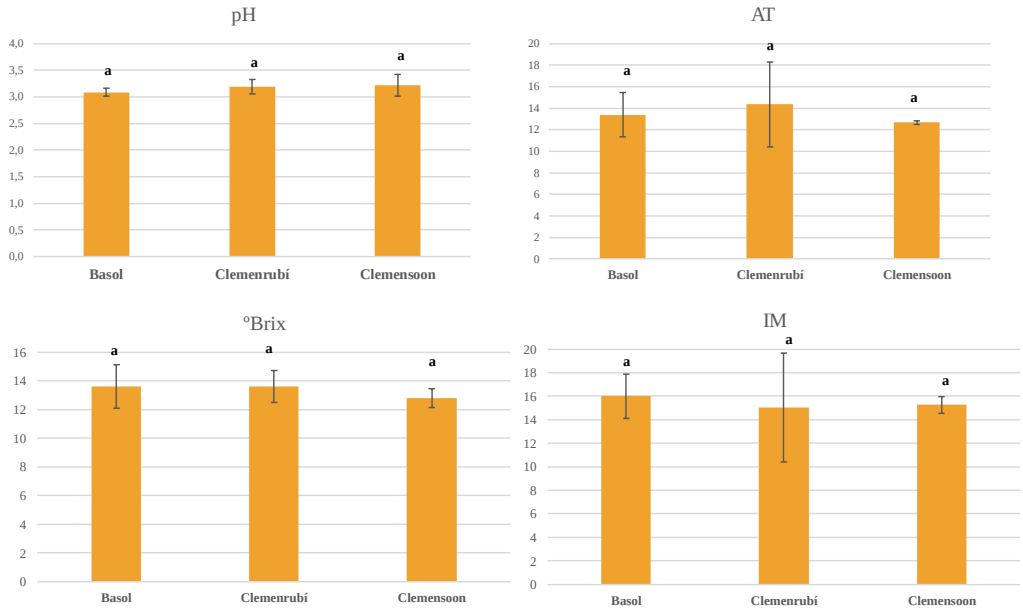


Figura 3.44. Contenido medio de pH, AT (mL NaOH 0,1 N), ºBrix e IM para las clementinas estudiadas, correspondiente a las temporadas 2011 a 2013. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

En el caso del **pH**, los resultados obtenidos en el presente estudio están en concordancia con los descritos por autores como Del Caro *et al*., (2004) que, en su estudio indicaron valores comprendidos entre 3,45 y 3,49 para un tipo de mandarina procedente de Italia denominada *Palazzelli*, mientras que otros autores como Legua *et al*., (2014) indicaron valores ligeramente superiores para mandarinas del tipo *Clemenules*, procedentes de España (3,82 – 6,61).

Los principales responsables de la **acidez titulable** (AT) son los **ácidos orgánicos**, y muy especialmente el ácido cítrico (AC), el cual fue el ácido orgánico mayoritario en todas las clementinas estudiadas (**Tabla 3.17**).

Tabla 3.17. Ácidos orgánicos cuantificados (mg/100g de porción comestible) en las clementinas analizadas en el estado de maduración organoléptico.

Variedad	Ácidos Orgánicos	2011	2012	2013	Rango de variación
Basol	Ác. Oxálico	52,48 ± 2,20c	41,04 ± 2,25b	28,71 ± 1,70a	**27,01 – 54,68**
	Ác. Quínico	92,52 ± 3,68c	45,19 ± 3,49a	71,69 ± 1,88b	**41,70 – 96,20**
	Ác. Málico	113,24 ± 1,21c	119,41 ± 3,47b	79,92 ± 6,86a	**73,03 – 122,88**
	Ác. Isocítrico	92,20 ± 3,12b	150,33 ± 5,06c	53,79 ± 2,74a	**51,05 – 155,39**
	Ác. Cítrico	515,72 ± 6,98b	482,81 ± 17,24a	664,79 ± 15,39c	**465,57 – 680,18**
	Ác. Fumárico	0,50 ± 0,01b	0,79 ± 0,04c	0,04 ± 0,00a	**0,04 – 0,83**
Clemenrubí	Ác. Oxálico	64,03 ± 3,35c	43,10 ± 1,80b	30,12 ± 1,36a	**28,76 – 67,38**
	Ác. Quínico	90,29 ± 3,37c	40,89 ± 3,07a	71,65 ± 6,24b	**37,82 – 93,66**
	Ác. Málico	93,76 ± 5,01a	137,12 ± 4,30c	115,49 ± 8,09b	**88,75 – 141,42**
	Ác. Isocítrico	63,21 ± 0,10b	73,34 ± 3,76c	49,56 ± 5,18a	**44,38 – 77,10**
	Ác. Cítrico	582,63 ± 41,86b	561,01 ± 8,80b	446,39 ± 3,20a	**449,59 – 623,86**
	Ác. Fumárico	0,60 ± 0,03 b	0,77 ± 0,03c	0,04 ± 0,01a	**0,05 – 0,80**
Clemensoon	Ác. Oxálico	50,13 ± 4,64c	40,84 ± 2,13b	30,70 ± 0,61a	**30,09 – 54,77**
	Ác. Quínico	73,53 ± 4,81b	38,82 ± 2,23a	73,44 ± 6,71b	**36,59 – 78,34**
	Ác. Málico	121,40 ± 9,72b	126,36 ± 3,63b	99,34 ± 1,95a	**97,39 – 129,99**
	Ác. Isocítrico	99,83 ± 5,73c	69,10 ± 3,20b	47,54 ± 2,76a	**44,78 – 105,56**
	Ác. Cítrico	349,83 ± 16,44a	548,34 ± 23,84b	639,37 ± 35,89c	**333,39 – 675,26**
	Ác. Fumárico	0,67 ± 0,04b	0,99 ± 0,07c	0,04 ± 0,00a	**0,04 – 1,06**

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). En cada fila, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

El contenido de AC osciló en un rango de 333,39 a 680,18 mg/100 g de porción comestible, presentando valores similares dentro de dicho rango de variación para todas las clementinas estudiadas, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas (**Figura 3.45**).

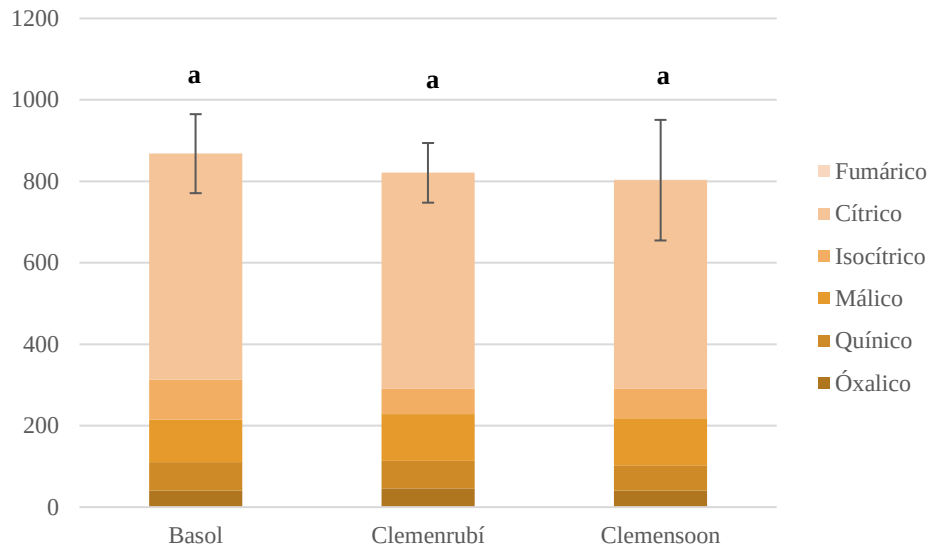


Figura 3.45. Contenido medio de ácidos orgánicos (mg/100g de porción comestible) en las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

El siguiente ácido mayoritario fue el ácido málico (73,03 – 141,42 mg/100 g de porción comestible), seguido del ácido isocítrico y quínico, con valores que oscilan en rangos similares (44,38 – 155,39 mg/100g de porción comestible y 36,59 – 96,20 mg/100 g de porción comestible, respectivamente). El siguiente ácido orgánico fue el ácido oxálico, el cual estuvo presente en todas las clementinas en un rango de variación que osciló entre 27,01 – 67,38 mg/100g de porción comestible. Por último, el ácido fumárico fue el ácido minoritario en todas las clementinas (0,04 – 0,83 mg /100 g de porción comestible).

Legua *et al*., (2014) en su estudio, publicaron datos de cantidades de ácido cítrico (en mandarina *Cleopatra*) muy superiores a los obtenidos en el presente estudio (1.260 mg/100 g de porción comestible), además en este mismo estudio se identificó la presencia del ácido tartárico en concentraciones bajas (181 mg/100 g de porción comestible). Por otro lado, Simón-grao *et al*., (2014), en su estudio sobre diferentes variedades de mandarinas, indicaron que el ácido cítrico y málico fueron los ácidos mayoritarios y principales responsables de la acidez de las frutas.

Otro de los parámetros más influyentes en la calidad de las clementinas objeto de estudio, fueron los **sólidos solubles**, los resultados obtenidos en el presente estudio son similares a los descritos por Simón Grao *et al*., (2014) los cuales indican valores de ºBrix de 14,4 y 13,9 para *Clementina Fina* y Clemenules, respectivamente. Del mismo modo, el índice de madurez entre las clementinas estudiadas, presenta valores similares a los descritos por Del Caro *et al*., (2004) para mandarina *Palazzelli* (14,30) y ligeramente inferiores a los indicados por Simón-Grao *et al*., (2014) en diferentes clementinas con un rango que oscila entre 20,4 y 29,5 y por Legua *et al*., (2014) en mandarina *Cleopatra* con un índice de madurez alrededor de 20,7.

En cuanto al estudio de la composición centesimal (**Tabla 3.16**), el **contenido acuoso** en todas las variedades estudiadas fue el componente mayoritario, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre temporadas., Sin embrago el estudio conjunto indica que el rango de variación de la humedad entre las variedades fue de 82,46 – 88,05 %, presentando todas ellas un contenido medio alrededor del 85 % (**Figura 3.46**) no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las clementinas estudiadas.

Dicho contenido acuoso está en concordancia con los descritos por otros autores como Del Caro *et al*., (2004) en mandarinas *Palazzelli*, y Simón-Grao *et al*., (2014) en clementinas procedentes de España como son *Clementina Fina*, *Clemenules* y *Hernandina*.

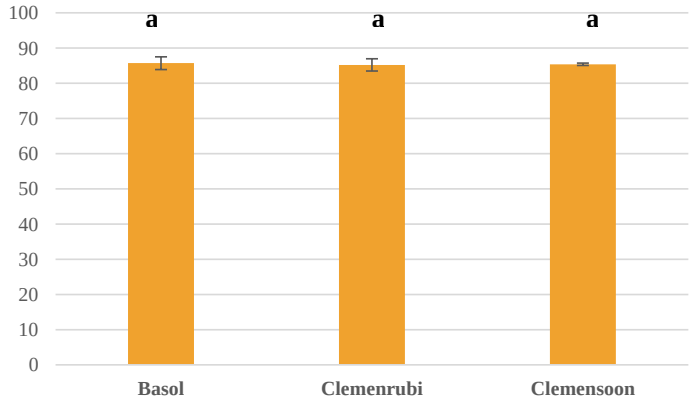


Figura 3.46. Contenido medio de humedad (%) para las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

En el caso de la siguiente fracción mayoritaria, el contenido total de **azúcares**, se observó mayor variabilidad entre las diferentes temporadas estudiadas, que llegó a superar el 22 %

en el caso de la variedad Clemensoon, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para todas ellas. Este hecho puede estar relacionado con las diferentes condiciones climáticas que se dieron en estos años, además de las diferencias en el propio proceso madurativo de las frutas, tal y como se ha estudiado en el apartado anterior sobre la influencia de la maduración. La **Tabla 3.18** muestra el contenido de **azúcares solubles** en las clementinas estudiadas junto con el rango de variación entre temporadas.

Tabla 3.18. Contenido de azúcares solubles (g/100 g de porción comestible) de las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico

Variedad	Año	Fructosa	Glucosa	Sacarosa	Azúcares Solubles
Basol	2011	2,86 ± 0,08b	2,65 ± 0,07b	6,24 ± 0,15c	11,75 ± 0,30b
	2012	2,36 ± 0,04a	2,27 ± 0,02a	4,75 ± 0,07a	9,38 ± 0,03a
	2013	2,88 ± 0,05b	2,90 ± 0,04c	4,93 ± 0,07b	10,71 ± 0,17b
	Rango de variación	**2,32 – 2,93**	**2,25 – 2,94**	**4,68 – 6,39**	**9,35 – 12,05**
Clemenrubí	2011	3,07 ± 0,02b	3,03 ± 0,01b	6,01 ± 0,04b	12,11 ± 0,07b
	2012	3,19 ± 0,06c	3,22 ± 0,05c	6,45 ± 0,11c	12,86 ± 0,04c
	2013	2,64 ± 0,01a	2,63 ± 0,02a	5,34 ± 0,02a	10,61 ± 0,01a
	Rango de variación	**2,63 – 3,25**	**2,61 – 3,27**	**5,32 – 6,56**	**10,60 - 12,90**
Clemensoon	2011	2,39 ± 0,05a	2,27 ± 0,07a	5,78 ± 0,14a	10,44 ± 0,26a
	2012	2,40 ± 0,00a	2,37 ± 0,02b	5,70 ± 0,01a	10,47 ± 0,01a
	2013	3,59 ± 0,13b	3,50 ± 0,13c	6,38 ± 0,24b	13,47 ± 0,52b
	Rango de variación	**2,34 – 3,72**	**2,20 – 3,63**	**5,69 – 6,62**	**10,18 - 13,99**

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

La sacarosa fue el azúcar soluble mayoritario (4,68 a 6,62 g/100g de porción comestible Basol y Clemensoon, respectivamente), representando hasta un 46 % del total de azúcares solubles. Por otro lado, la relación glucosa/fructosa fue próxima a 1 en todos los casos, estando presentes estos azúcares en aproximadamente la misma proporción para todas las clementinas estudiadas.

Considerando todas las temporadas, las clementinas estudiadas mostraron valores similares y homogéneos tanto en fructosa como en glucosa (**Figura 3.47**) no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas. Clemensoon destaca por

presentar el contenido significativamente más elevado de sacarosa llegando a alcanzar hasta 6,62 g/100 g de porción comestible, lo cual significaría que estamos ante la variedad más dulce estudiada, seguida de Clemenrubí y Basol.

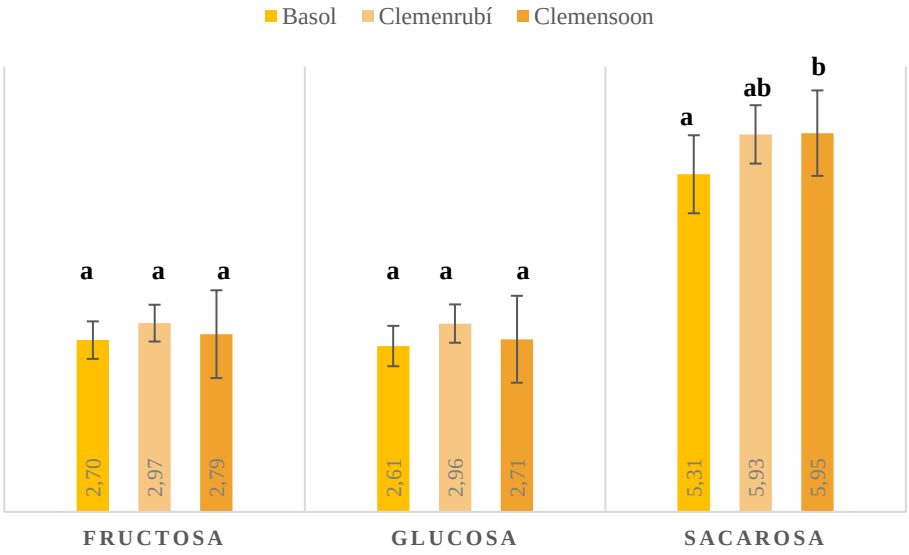


Figura 3.47. Contenido medio de azúcares solubles (g/100 g de porción comestible) para las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Dicho contenido de azúcares solubles obtenidos en el presente estudio, está en concordancia con el indicado por Simón Grao *et al*., (2014), los cuales indican valores en clementinas similares para fructosa (1,8 – 2,5 g/100 mL de zumo), ligeramente superiores a glucosa (1,8 – 2,0 g/100 mL de zumo) y ligeramente inferiores al contenido de sacarosa (6,8 – 7,9 g/100 mL de zumo). Del mismo modo, Souci *et al*., (2008) indican valores del contenido total de sólidos solubles en mandarinas, ligeramente inferiores a los obtenidos en el presente estudio (10,1 g/100g, principalmente en forma de sacarosa con 7,10 g/100g de porción comestible). Otros estudios publicados en relación al contenido de azúcares en otras variedades de cítricos, como la naranja dulce (*Citrus Sinensis* (L.) Osbeck), indican igualmente que los tres azúcares principales son la fructosa, glucosa y sacarosa, con una relación en contenido de 1:1:2, siendo la sacarosa el azúcar mayoritario (Kelebek y Selli, 2011).

En cuanto a la **fibra dietética**, se observó una clara influencia de la temporada en todas las clementinas estudiadas, presentando todas ellas diferencias estadísticamente significativas entre temporadas, destacando las variedades Basol y Clemenrubí por superar el 50% de dicha

variación. En general, las tres clementinas estudiadas presentaron elevados contenidos de fibra dietética (**Tabla 3.19**).

Tabla 3.19. Contenido de fibra dietética insoluble, soluble y total (g/100 g porción comestible) de las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico

Variedad	Año	Fibra Insoluble	Fibra Soluble	Fibra Total
Basol	2011	0,47 ± 0,04a	0,57 ± 0,10a	1,07 ± 0,03a
	2012	1,00 ± 0,05b	1,15 ± 0,03c	2,13 ± 0,05b
	2013	2,14 ± 0,11c	1,01 ± 0,09b	3,45 ± 0,21c
	Rango de variación	**0,43 – 2,25**	**0,47 – 1,18**	**1,04 – 3,66**
Clemenrubí	2011	0,74 ± 0,06a	0,69 ± 0,01a	1,46 ± 0,03a
	2012	1,20 ± 0,10c	1,08 ± 0,05b	2,36 ± 0,22b
	2013	0,96 ± 0,12b	1,75 ± 0,14c	2,98 ± 0,26c
	Rango de variación	**0,68 – 1,30**	**0,68 – 1,89**	**1,43 – 3,24**
Clemensoon	2011	1,14 ± 0,10a	0,55 ± 0,04a	1,70 ± 0,03a
	2012	1,11 ± 0,10a	1,07 ± 0,09b	2,18 ± 0,10b
	2013	1,66 ± 0,15b	1,06 ± 0,11b	2,71 ± 0,24c
	Rango de variación	**1,01 – 1,81**	**0,51 – 1,17**	**1,67 – 2,95**

Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). Siendo En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Destaca la variedad Basol por presentar los valores más elevados de fibra insoluble (2,14 mg/100 g de porción comestible) y Clemenrubí en la fracción soluble (1,75 g/10 g porción comestible).

El análisis estadístico entre variedades (**Figura 3.48**) no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre variedades, mostrando valores similares y homogéneos tanto para las dos fracciones, insoluble y soluble como para la fibra total.

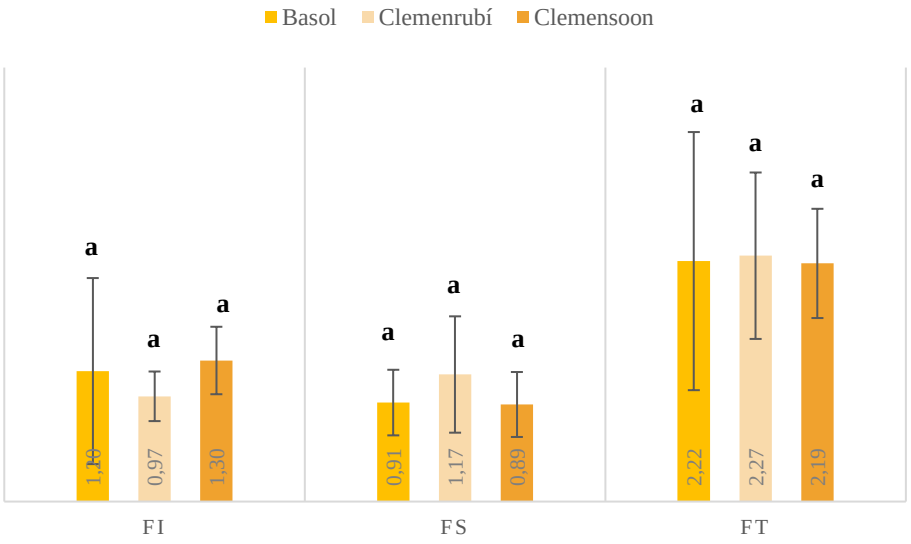


Figura 3.48. Contenido medio fibra dietética (g/100g de porción comestible) para las clementinas extra precoces estudiadas. Siendo FI: Fibra insoluble; FS: Fibra soluble y FT: Fibra Total. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Hasta el momento, no existen otros datos previos sobre la distribución de las diferentes fracciones de fibra (soluble e insoluble) en variedades de clementinas. Sin embargo, sí existen en la literatura datos para otras variedades de mandarina como *Citrus Nobilis Loureiro*, que indicaron valores de fibra soluble de 0,67 g/100g de porción comestible; y para la fibra insoluble de 1,03 g/100g de porción comestible, resultados que se encuentran en el rango de variabilidad de los obtenidos en el presente estudio. Otros cítricos como la naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), presentan valores inferiores para las fracciones soluble e insoluble (0,60 y 1,00g/100g de porción comestible, respectivamente) según Souci *et al*., (2008).

Si consideramos una ingesta diaria de 25 gramos de fibra dietética como valor dietético de referencia (VDR) dado por la Comisión Europea, junto con los valores de ingesta adecuada (IA) de fibra dietética para adultos mayores de 19 años (para hombres está establecida entre 31-38 gramos por día, mientras que para las mujeres se encuentra en un intervalo de 21-25 gramos por día) según Trumbo *et al*., (2002). En función de nuestros resultados podemos decir que el consumo de tres piezas diarias de clementinas (alrededor de 250g) cubriría más del 20 % de los VDR o IA establecida en 25 gramos como valor medio, tal y como se puede observar en la **Figura 3.49**.

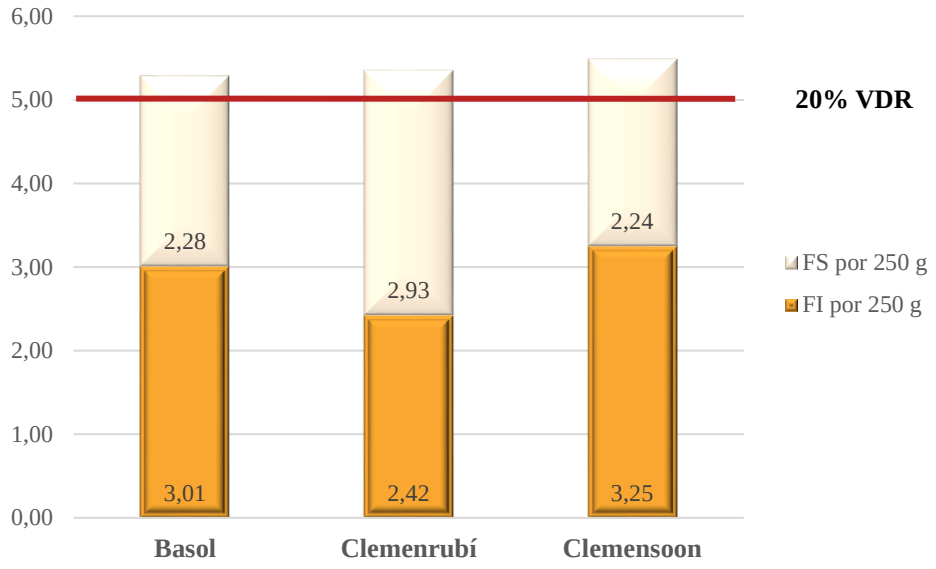


Figura 3.49. Contribución de las tres variedades de clementinas extra precoces estudiadas (porción comestible) a la ingesta recomendada (VDR) de fibra total, fibra soluble e insoluble (mg/250g) en las clementinas (Basol, Clemenrubí y Clemensoon). Siendo FS: fibra soluble; FI: fibra insoluble.

Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos decir que dichas variedades de clementinas pueden ser consideradas como aporte de fibra dietética en la dieta y se puede traducir en la recomendación de un consumo regular de dichas clementinas.

Respecto al **contenido proteico** de las clementinas, la variabilidad entre temporadas fue de alrededor del 30 %, destacando la variedad Basol con 2,05 g/100 g de porción comestible. En el conjunto de temporadas el rango de variación para todas las clementinas estudiadas, fue de 1,19 – 2,07 g/100g de porción comestible, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas. Comparando dichos resultados obtenidos para las clementinas con los datos referidos en la literatura para mandarinas, estos últimos son superiores oscilando en rangos de 0,5 − 0,8 g/100 g de porción comestible (Souci *et al.*, 2008)

La fracción minoritaria de la composición centesimal de las clementinas estudiadas fue la **grasa** (0,04 – 0,10 g/100g de porción comestible, **Figura 3.50**). La influencia de la temporada se observó mayoritariamente en la variedad Basol con un aumento del 40 % en la temporada 2013, con respecto a las otras dos temporadas estudiadas.

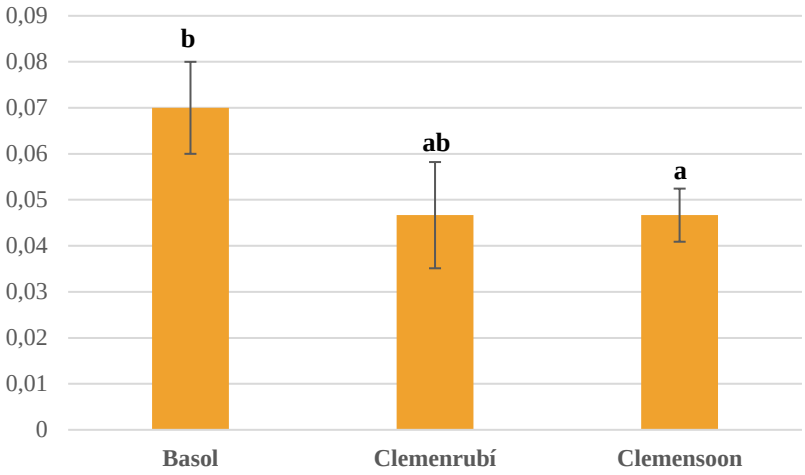


Figura 3.50. Contenido medio de grasa (g/100 g de porción comestible) para las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Destaca Clemensoon por presentar el menor contenido de grasa de entre todas las clementinas estudiadas, seguida de Clemenrubí y Basol que fue la que presentó el valor más alto, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas. Dichos valores, fueron muy inferiores a los recopilados en la literatura en mandarinas, situándose en torno a 0,3 g/100g de porción comestible (Souci *et al*., 2008).

Así mismo, en cuanto al contenido de **ácidos grasos** la **Tabla 3.20** refleja los rangos de variación obtenidos para las familias de ácidos grasos entre las diferentes temporadas de recolección estudiadas.

Tabla 3.20. Rango de variación entre temporadas de las familias de ácidos grasos analizados en las clementinas extra precoces.

Familia de ácidos grasos	Basol	Clemenrubí	Clemensoon
AGS	40,60 - 59,90	46,59 - 62,96	39,37 - 53,98
AGMI	10,60 - 16,78	11,99 - 15,21	8,18 - 15,38
AGPI	23,33 - 45,69	21,83 - 40,49	34,15 - 52,45

Resultados expresados como % de extracto graso

Todas las clementinas mostraron valores similares y homogéneos en el perfil lipídico, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Existen estudios

previos del perfil de ácidos grasos en cítricos como la naranja (*Citrus sinensis*), que indican una distribución similar a la obtenida en este estudio, donde los ácidos grasos mayoritarios son palmítico, palmitoleico, oleico, linoleico y linolénico (Izquierdo *et al*., 2003; Letaief, 2016).

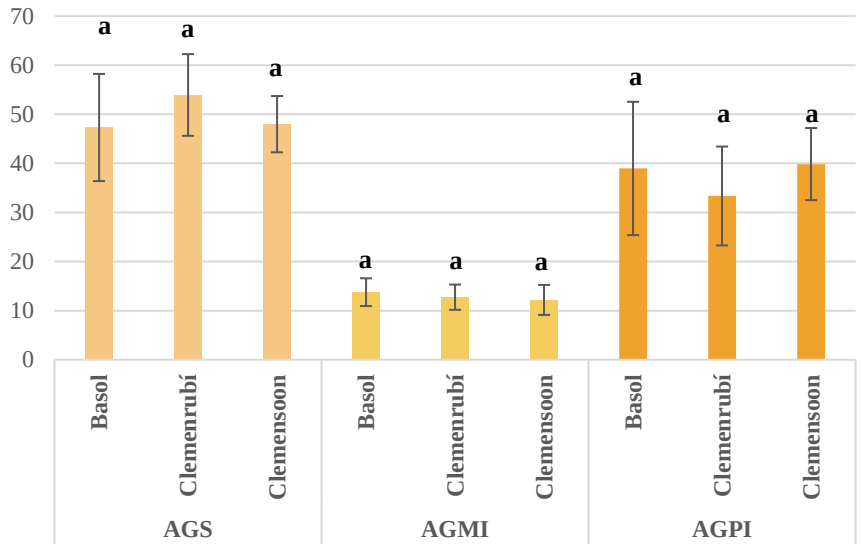


Figura 3.51. Contenido medio de las familias de ácidos grasos (% de extracto graso) para las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Otros estudios indican valores en mandarina (variedad *Elarbi*, procedente de Túnez), similares a los obtenidos en el presente estudio para AGS, con un porcentaje sobre el extracto graso de un 47,6 %, sin embargo, indican valores de AGMI (32,54 %) y AGPI (18,9 %) inferiores a los obtenidos para las clementinas estudiadas (Tounsi *et al*., 2011). Por su parte, Moufida *et al*., 2003, ponen de manifiesto que los principales ácidos encontrados en el perfil de estas clementinas (palmítico, oleico, linoleico y linolénico) representan aproximadamente el 75 % del total del extracto graso en cítricos, hecho que está en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio (Moufida *et al*., 2011).

Posteriormente se llevó a cabo la determinación del **contenido mineral** (**Tabla 3.21**) de las clementinas. En cuanto al contenido de **cenizas**, todas las clementinas estudiadas mostraron diferencias entre temporadas, siendo Clemensoon la variedad que mostró menor variabilidad entre temporadas (18 %).

Tabla 3.21. Contenido de elementos minerales (mg/100g de porción comestible) de las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico

Variedad	Año	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	Mg	K	Na
Basol	2011	0,05 ± 0,00a	0,45 ± 0,01b	0,12 ± 0,01c	0,12 ± 0,00a	20,01 ± 1,57b	12,03 ± 0,74b	140,98 ± 1,72c	4,79 ± 0,57a
	2012	0,18 ± 0,00c	0,23 ± 0,01a	0,02 ± 0,00b	0,26 ± 0,02c	24,05 ± 2,13b	11,27 ± 1,07b	99,96 ± 0,72b	7,10 ± 0,02b
	2013	0,07 ± 0,00b	0,46 ± 0,03b	0,01 ± 0,00a	0,15 ± 0,01b	11,64 ± 1,13a	6,96 ± 0,13a	68,48 ± 0,53a	16,81 ± 0,43c
	Rango de variación	**0,05 – 0,18**	**0,22 – 0,49**	**0,01 – 0,13**	**0,12 – 0,28**	**10,51 – 26,18**	**6,83 – 12,77**	**67,95 – 142,70**	**4,22 – 17,24**
Clemenrubí	2011	0,04 ± 0,00a	0,30 ± 0,05b	0,14 ± 0,00c	0,15 ± 0,01a	23,16 ± 0,77b	13,01 ± 1,18c	161,09 ± 8,26c	8,55 ± 0,62b
	2012	0,14 ± 0,02c	0,36 ± 0,01b	0,05 ± 0,01b	0,36 ± 0,03b	22,36 ± 1,24b	9,67 ± 0,66b	106,04 ± 3,92b	5,11 ± 0,43a
	2013	0,07 ± 0,01b	0,24 ± 0,02a	0,01 ± 0,00a	0,15 ± 0,00a	14,47 ± 1,58a	7,40 ± 0,62a	63,59 ± 1,45a	10,45 ± 0,44c
	Rango de variación	**0,04 – 0,6**	**0,22 – 0,37**	**0,01 – 0,14**	**0,14 – 0,39**	**12,89 – 23,93**	**6,78 – 14,19**	**62,14 – 169,35**	**4,68 – 10,95**
Clemensoon	2011	0,05 ± 0,00b	0,20 ± 0,02a	0,09 ± 0,01	0,07 ± 0,01a	15,42 ± 0,50a	9,45 ± 0,43a	122,52 ± 3,95c	8,22 ± 0,86a
	2012	0,02 ± 0,00a	0,21 ± 0,01a	nd	0,13 ± 0,06b	21,94 ± 1,86b	9,61 ± 0,72a	93,59 ± 1,50b	7,76 ± 0,01b
	2013	0,06 ± 0,01b	0,30 ± 0,02b	0,01 ± 0,00	0,11 ± 0,01b	21,45 ± 1,94b	9,17 ± 0,52a	68,90 ± 4,04a	9,01 ± 0,79c
	Rango de variación	**0,02 – 0,07**	**0,18 – 0,32**	**nd – 0,10**	**0,06 – 0,19**	**14,92 – 23,80**	**8,65 – 10,33**	**64,86 – 126,47**	**7,75 – 9,80**

*nd: No detectado; tr: trazas (<0,01) Resultados expresados como media ± desviación estándar, n-1 (n=9). En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

No encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las variedades de clementina estudiadas en la composición de las clementinas considerando las tres temporadas de recolección ($p < 0,05$, **Figura 3.52**).

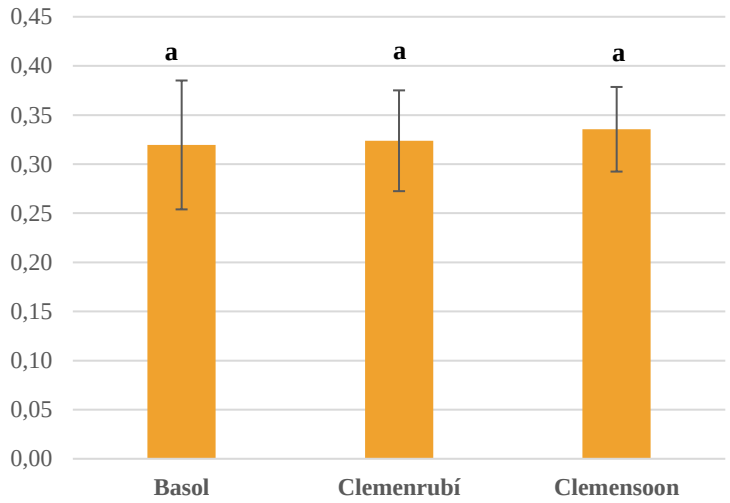


Figura 3.52. Contenido medio de cenizas (g/100g de porción comestible) para las clementinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Tal y como se comentó en el capítulo anterior, la determinación de la composición mineral se dividió en micro y macroelementos. El potasio (K) como macroelemento mineral mayoritario se vio fuertemente influenciado por la temporada en la cual se recolectaron estas clementinas, mostrando valores en un rango de 62,14 a 169,35 mg/100 g de porción comestible, mientras que el sodio (Na) fue el macroelemento minoritario en todas las clementinas estudiadas (4,22 – 17,24 mg/100 g de porción comestible).

Del mismo modo, el resto de macroelementos minerales analizados, calcio (Ca) y magnesio (Mg) se vieron fuertemente influenciados por la temporada de recolección, al igual que el K y el Na. En general, las clementinas objeto del presente estudio, mostraron valores similares y homogéneos para los principales macro elementos analizados, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ellas (**Figura 3.53**)

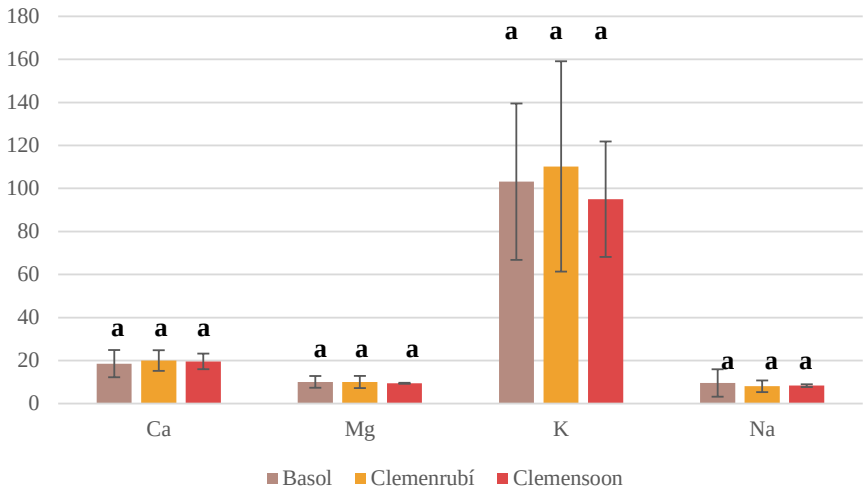


Figura 3.53. Contenido medio de macro elementos minerales (mg/100 g de porción comestible) para las clementinas estudiadas. Diferentes letras para cada mineral indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Por otro lado, destaca el hierro (Fe) por tratarse del microelemento mayoritario en todas las clementinas estudiadas (0,18 – 0,49 mg/100 g de porción comestible), seguido del zinc (Zn), manganeso (Mn) y cobre (Cu). En general, todas las clementinas estudiadas mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el contenido de Fe y Zn, mientras que para el Mn y Cu mostraron valores similares y homogéneos tal y como se puede observar en la **Figura 3.54**.

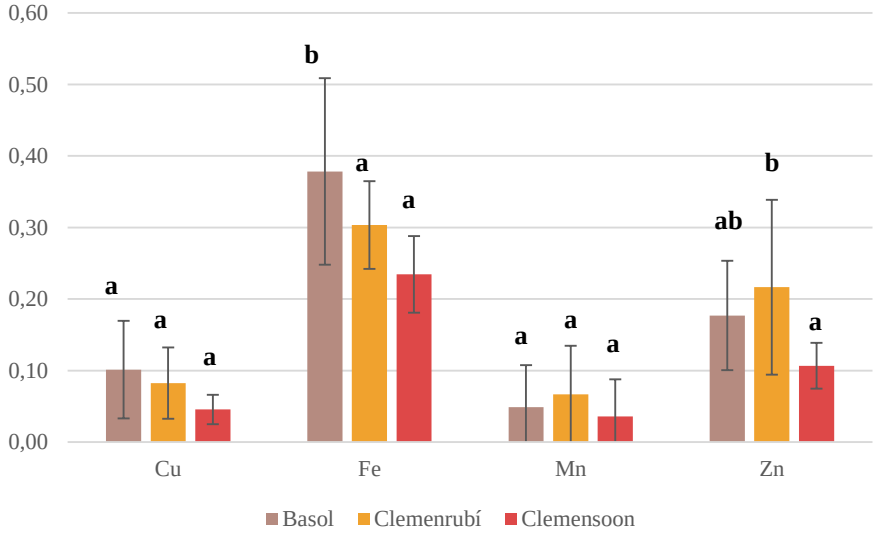


Figura 3.54. Contenido medio de micro elementos minerales (mg/100 g de porción comestible) para las clementinas estudiadas. Diferentes letras para cada mineral indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Existen varios estudios publicados en relación al contenido mineral en macro y microelementos sobre diferentes tipos de clementinas, como es el estudio de Simón-Grao *et al*., (2014) sobre clementinas procedentes de España como son la *Clementina Fina*, *Clemenules* y *Hernandina* en el cual indican que el K es el macroelemento mayoritario y el Na el minoritario, tal y como se muestra en el presente estudio. En cuanto al contenido de microelementos dichos autores muestran contenidos de Cu superiores a los contenidos de Zn, a diferencia de los resultados obtenidos en el presente estudio. Boudries *et al*., (2012) publicaron otro estudio en el que se analizaban seis variedades de clementinas procedentes del norte de Argelia, con un clima mediterráneo similar a España, e indicaron un perfil similar, con el K como macroelemento mayoritario, y el Fe como el microelemento mayoritario, mostrando valores similares para estos minerales a los obtenidos en las clementinas objeto del presente estudio. En dicho estudio se presentan valores de Na, muy superiores a los obtenidos en el presente trabajo, a diferencia de los encontrados en literatura, que indican contenidos de Na próximos a 1 – 2 mg/100g de porción comestible en mandarinas (Souci *et al*., 2008; Moreiras *et al*., 2013).

Una vez realizada la composición centesimal, la cual permite determinar el valor nutritivo de las clementinas objeto de estudio, se calculó el **valor energético** de las mismas en base a los resultados obtenidos para las diferentes fracciones. Dicho valor energético (entre 46,86 - 67,36 kcal/100 g porción comestible) fue similar en todas las clementinas estudiadas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) y parece estar condicionado por el contenido total de azúcares solubles, puesto que se trata del macro nutriente principal en estas frutas.

A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta que la ingesta de calorías recomendadas en una dieta saludable y equilibrada en adultos es de 2.200 – 2.900 Kcal/día para mujeres y hombres respectivamente, calculamos un aporte calórico medio correspondiente a cada variedad (**Figura 3.55**).

Si tenemos en cuenta que una pieza de esta fruta posee un peso aproximado de 85 g, dado que los resultados están expresados por 100 g de porción comestible, la ingesta de dos piezas de cualquiera de las clementinas estudiadas (alrededor de 170 g aproximadamente) supondría un aporte calórico a la dieta aproximado del 5 % en mujeres y de prácticamente el 4 % en hombres.

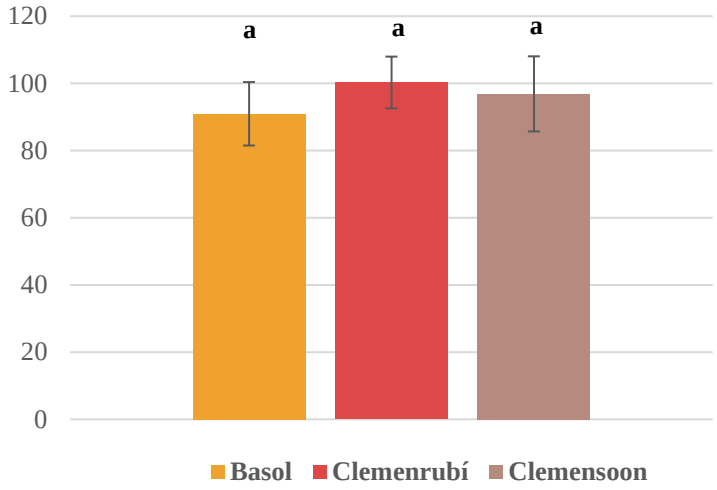


Figura 3.55. Valor energético medio en Kcal/170g de porción comestible de las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

En cuanto a los micronutrientes, uno de los compuestos de mayor importancia en las clementinas es la vitamina C. A continuación, se muestra la **Tabla 3.22** con los datos de vitamina C total junto con el contenido de AA y ADHA.

Tabla 3.22. Contenido de ácido ascórbico (AA), dehidroascórbico (ADHA) y vitamina C total (mg/100 g de porción comestible) de las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico.

Variedad	Año	AA	ADHA	Vit C total
Basol	2011	103,08 ± 3,40b	2,30 ± 0,36a	106,69 ± 3,96a
	2012	91,48 ± 3,43a	9,86 ± 0,22c	101,01 ± 2,95a
	2013	116,24 ± 3,24c	5,85 ± 0,65b	118,30 ± 8,95a
	Rango de variación	**88,05 – 119,48**	**1,94 – 10,08**	**98,06 – 110,65**
Clemenrubí	2011	120,04 ± 3,32b	7,04 ± 0,06b	127,12 ± 4,92b
	2012	91,26 ± 2,95a	5,36 ± 0,94a	94,70 ± 1,37a
	2013	94,61 ± 5,81a	5,04 ± 0,00a	100,05 ± 8,15a
	Rango de variación	**88,31 – 123,36**	**5,04 – 7,10**	**93,33 – 132,04**
Clemensoon	2011	90,86 ± 11,45a	10,19 ± 0,18b	99,28 ± 5,91a
	2012	96,20 ± 4,18a	4,55 ± 0,83a	93,79 ± 4,83a
	2013	100,60 ± 9,52a	4,61 ± 0,80a	105,21 ± 0,79a
	Rango de variación	**79,41 – 110,12**	**3,72 – 10,37**	**88,96 – 106,00**

Resultados expresados como Media ± Desviación estándar, n-1 (n=9). En cada columna diferentes letras entre temporadas indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

El rango de variación para la vitamina C en todas las clementinas estudiadas estuvo comprendido entre 88,96 y 132,04 mg/100 g de porción comestible, principalmente en forma de ácido ascórbico, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las variedades estudiadas ($p < 0,05$).

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, los contenidos de vitamina C total encontrados en todas las clementinas analizadas son superiores a los indicados por Moreiras *et al*., 2013 y Souci *et al*., 2008, quienes establecieron valores comprendidos entre 30 − 35 mg/100g en muestras de mandarina. De la misma manera Bermejo y Cano (2012) publicaron valores para los contenidos de vitamina C inferiores a los obtenidos en el presente estudio para otras variedades de clementinas *Fina*, *Loretina* y *Arrufatina* (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) procedentes de España (48,10; 44,99; 54,80 mg/100 mL de zumo respectivamente). Por su parte, Abeysinghe *et al*., (2007) publicaron un estudio en el cual analizaron dos variedades de mandarinas (*Citrus unshiu* y *Citrus reticulata*) procedentes de China, indicando valores de vitamina C total, comprendidos entre 25,4 y 45,3 mg/100g de porción comestible respectivamente.

Al igual que con la fibra, El Comité Científico Europeo sobre Alimentación Humana (Scientific Committee on Food-EU, SFC) estableció recomendaciones dietéticas en cuanto a su ingesta diaria, en el caso de la vitamina C dicho Comité, definió en 1992 la Ingesta de Referencia para la Población (IRP) para determinados micronutrientes y vitaminas, basadas en la suficiente evidencia encontrada en la literatura. Dicha ingesta de referencia IRP es de 45 mg/día de vitamina C tanto en hombres como en mujeres (**Figura 3.56**). Según estos datos de referencia, una única pieza de mandarina con un peso aproximado de 85 g, cubriría el 100 % de la IRP.

Por otro lado, el contenido de vitamina C por cada 100 g de cada una de las clementinas analizadas se encuentra en el rango de las Ingestas Diarias Recomendadas (IDR) para adultos mayores de 19 años (90 mg/día) (Trumbo *et al*., 2002). En este sentido, una pieza de cualquiera de las clementinas analizadas (85 g) cubriría como mínimo el 93 % de las IDR. Entre todas las clementinas analizadas, destacan Basol y Clemenrubí que llegarían a cubrir el 100 % de las IDR con una sola pieza de fruta. Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos decir que estas variedades de clementinas pueden ser consideradas una muy buena **fuente de vitamina C** en la dieta.

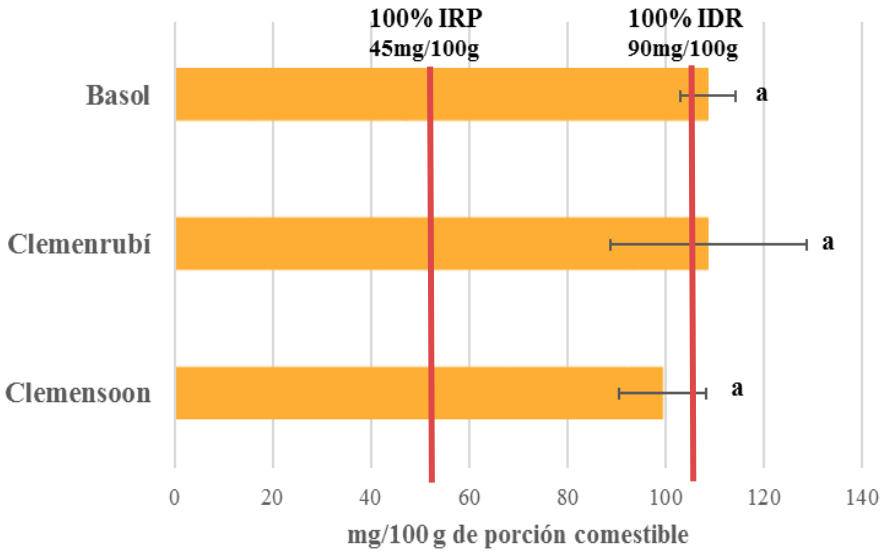


Figura 3.56. Contenido medio de vitamina C total (mg/100g de porción comestible) en las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico. IRP: Ingesta de referencia para la población (Unión Europea); IDR: Ingesta diaria de referencia (E.E.U.U.). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Respecto al contenido en vitamina E, dentro de los tocoferoles identificados y cuantificados, el α – tocoferol fue el mayoritario (0,101 – 0,315 mg/100 g de porción comestible) en todas las clementinas, siendo Clemenrubí la variedad que mostró el contenido más alto, llegando a alcanzar 0,315 mg/ 100 g de porción comestible, seguida de Basol y Clemensoon **Tabla 3.23** y (**Figura 3.57**).

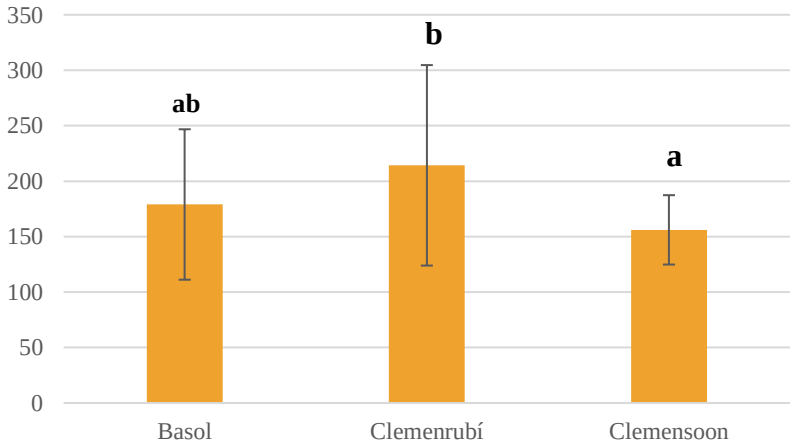


Figura 3.57. Contenido medio de α-tocoferol (mg/100 g de porción comestible) en las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Tabla 3.23. Composición de tocoferoles (mg/100 g porción comestible de las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico

Variedad	Año	α-tocoferol	β-tocoferol	γ-tocoferol	δ-tocoferol	Total tocoferoles
Basol	2011	0,202 ± 0,027a	0,006 ± 0,000	0,003 ± 0,000a	nd	0,211 ± 0,006b
	2012	0,103 ± 0,002b	0,006 ± 0,002	0,002 ± 0,001a	nd	0,111 ± 0,005a
	2013	0,232 ± 0,004a	nd	0,011 ± 0,000b	0,007 ± 0,001	0,250 ± 0,001c
	Rango de variación	**0,101 - 0,236**	**nd – 0,008**	**0,001 - 0,011**	**nd – 0,008**	**0,106 - 0,251**
Clemenrubí	2011	0,219 ± 0,005b	0,006 ± 0,000	0,003 ± 0,000a	nd	0,228 ± 0,005b
	2012	0,122 ± 0,005a	0,009 ± 0,000	0,004 ± 0,000b	nd	0,134 ± 0,005a
	2013	0,302 ± 0,013c	nd	0,017 ± 0,003c	0,008 ± 0,002	0,331 ± 0,021c
	Rango de variación	**0,117 - 0,315**	**nd – 0,009**	**0,003 - 0,020**	**nd – 0,010**	**0,129 - 0,351**
Clemensoon	2011	0,142 ± 0,003b	0,003 ± 0,000	0,004 ± 0,000b	nd	0,149 ± 0,003a
	2012	0,135 ± 0,002a	0,008 ± 0,000	0,003 ± 0,000a	nd	0,146 ± 0,002a
	2013	0,192 ± 0,009c	nd	0,009 ± 0,000c	0,006 ± 0,001	0,207 ± 0,008b
	Rango de variación	**0,133 - 0,201**	**nd – 0,008**	**0,003 - 0,009**	**nd – 0,007**	**0,144 - 0,215**

nd: No detectado. Resultados expresados como Media ± Desviación estándar, n-1 (n=9). En cada columna diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Los resultados obtenidos del contenido de α – tocoferol en las clementinas, son similares a los previamente descritos por otros autores en diferentes variedades de cítricos como la naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (Cardeñosa *et al*., 2015). Hoy en día existe poca información sobre el perfil y contenido de tocoferoles en cítricos, y en particular en clementinas.

La literatura muestra el contenido de α – tocoferol para mandarinas y naranjas es de 0,32 mg/100 g de porción comestible (Souci *et al*., 2008), contenidos ligeramente superiores a los obtenidos en el presente estudio.

Tabla 3.24. Composición de tocoferoles (mg/100 g porción comestible) en las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico.

Variedad	Año	Flavonoides	Ácidos Fenólicos	Compuestos Fenólicos totales
Basol	2011	4,87 ± 0,01c	3,55 ± 0,17a	8,42 ± 0,18c
	2012	2,58 ± 0,02a	3,36 ± 0,02a	5,94 ± 0,01a
	2013	3,10 ± 0,00b	3,67 ± 0,01a	6,78 ± 0,01b
	Rango de variación	**2,58 – 4,87**	**3,36 – 3,55**	**5,94 – 8,42**
Clemenrubí	2011	3,48 ± 0,01b	3,37 ± 0,09b	6,86 ± 0,09c
	2012	2,84 ± 0,02a	3,53 ± 0,01c	6,37 ± 0,01b
	2013	2,86 ± 0,05a	3,17 ± 0,04a	6,03 ± 0,09a
	Rango de variación	**2,84 – 3,48**	**3,17 – 3,53**	**6,03 – 6,86**
Clemensoon	2011	4,07 ± 0,00b	3,85 ± 0,02b	7,92 ± 0,02b
	2012	2,24 ± 0,02a	2,66 ± 0,01a	4,91 ± 0,01a
	2013	2,28 ± 0,02a	2,66 ± 0,01a	4,94 ± 0,03a
	Rango de variación	**2,24 – 4,07**	**2,66 – 3,85**	**4,91 – 7,92**

Resultados expresados como Media ± Desviación estándar, n-1 (n=9). En cada columna diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

Además, en un estudio realizado en Singapore en el que se analizaron numerosos tipos de frutas consumidas comúnmente en este país, se encontraba una variedad de mandarina procedente de China (*Citrus reticulata* Blanco) mostraba contenidos de α – tocoferol (0,192 mg/100 g de porción comestible) muy similares a los obtenidos en la presente tesis doctoral, pero no detectaron el resto de isoformas analizadas (Isabelle *et al*., 2010).

Dentro de los compuestos bioactivos, el contenido de las familias fenólicas (flavonoides y ácidos fenólicos) y, por consiguiente, el total de compuestos fenólicos, se vio influenciado de manera significativa por las diferentes temporadas de recolección (**Tabla 3.24**).

Sin embargo, al considerar las tres temporadas de recolección en conjunto, los valores de ácidos fenólicos y flavonoides, se encontraron en proporciones similares, entre las clementinas estudiadas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ellas (**Figura 3.58**). Los resultados obtenidos en el presente estudio para compuestos fenólicos están en concordancia con los resultados publicados por otros autores como Legua *et al* (2014), los cuales indicaron valores en clementinas de compuestos fenólicos totales en un rango entre 3,5 – 5,9 mg/100 g de porción comestible.

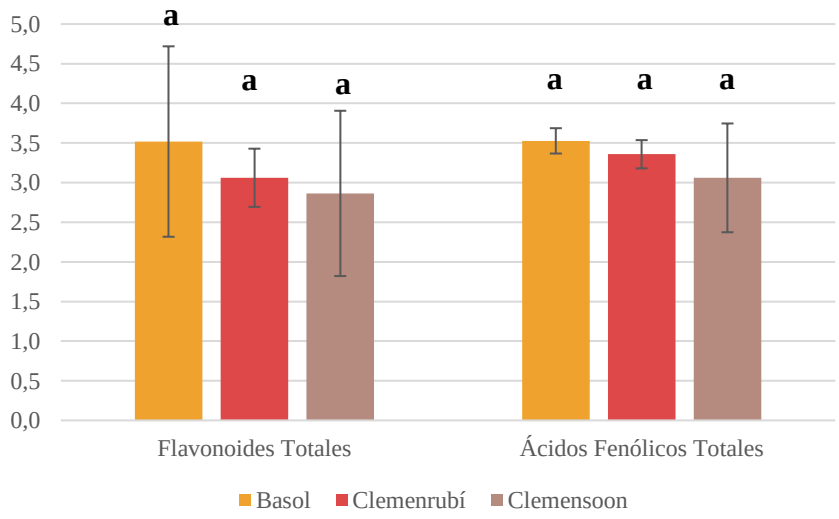


Figura 3.58. Contenido medio de flavonoides y ácidos fenólicos totales (mg/100 g de porción comestible) en las clementinas extra precoces estudiadas en su estado de maduración organoléptico. Diferentes letras para cada parámetro indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Por último, en relación a la actividad biológica, los rangos de variabilidad de la capacidad antioxidante de las clementinas estudiadas se muestran en la **Tabla 3.25**.

Tabla 3.25. Capacidad antioxidante de las tres variedades de Clementinas extra precoces estudiadas en el estado de maduración organoléptico.

Variedad	Año	DPPH	Poder Reductor	Inhibición de la decoloración de β-caroteno
Basol	2011	6,06 ± 0,01b	1,52 ± 0,01b	0,21 ± 0,01a
	2012	5,27 ± 0,37a	1,32 ± 0,00a	0,30 ± 0,01b
	2013	13,19 ± 0,23c	2,46 ± 0,09c	0,82 ± 0,05c
	Rango de variación	**5,27 – 13,19**	**1,32 – 2,46**	**0,21 – 0,82**
Clemenrubí	2011	6,22 ± 0,02b	2,93 ± 0,01b	1,72 ± 0,01c
	2012	5,73 ± 0,38a	3,98 ± 0,24c	0,40 ± 0,02a
	2013	13,21 ± 0,42c	2,50 ± 0,05a	1,59 ± 0,07b
	Rango de variación	**5,73 – 13,21**	**2,50 – 3,98**	**0,40 – 1,72**
Clemensoon	2011	7,12 ± 0,07b	3,61 ± 0,05c	0,21 ± 0,01a
	2012	3,36 ± 0,14a	1,52 ± 0,06a	0,36 ± 0,08b
	2013	10,98 ± 0,55c	2,43 ± 0,01b	2,24 ± 0,05c
	Rango de variación	**3,36 – 10,98**	**1,52 – 3,61**	**0,21 – 2,24**

EC_{50}: mg/mL extracto metanólico. Resultados expresados como Media ± Desviación estándar, n-1 (n=9). En cada columna, diferentes letras entre temporadas para cada variedad indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

De nuevo la influencia de la temporada también se hizo visible en los diferentes métodos empleados para medir la capacidad antioxidante de las clementinas objeto de estudio. Mediante el método DPPH, la variedad que mostró una EC_{50} menor y, por tanto, mayor actividad antioxidante fue Clemensoon (3,36 – 10,98 mg/mL) lo cual significa el potencial que presenta esta variedad como protector frente al estrés oxidativo.

En cuanto al método del poder reductor (PR), destacó Basol como la variedad que presentó una mayor actividad antioxidante medido por este método, mostrando los valores de EC_{50} más bajas (1,32 – 2,46 mg/mL) así como para el último método empleado que mide la inhibición de la decoloración del β – caroteno (fase lipídica) pues fue esta misma variedad la que destacó de nuevo con las concentraciones más bajas de EC_{50} (0,21 – 0,82 mg/mL), y por consiguiente con una actividad antioxidante mayor, por lo tanto, estos resultados pueden ser indicativos no sólo de su potencial frente al estrés oxidativo sino también del potencial que presenta dicha variedad frente a la inhibición de la peroxidación lipídica, lo cual estaría relacionado con una mayor actividad antioxidante en fase lipófila.

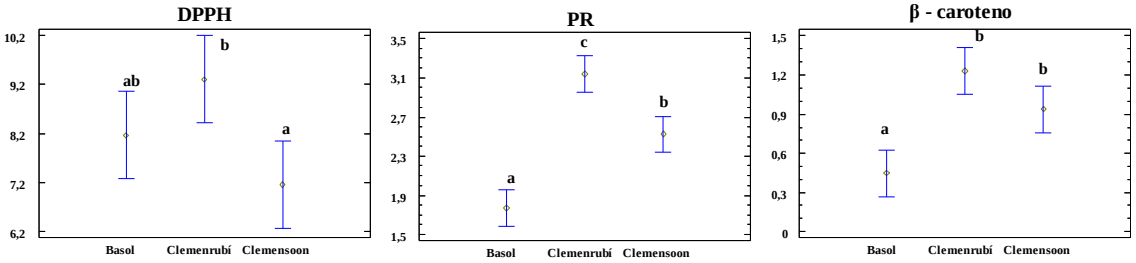


Figura 3.59. Test de Tukey para EC_{50} (mg/mL de extracto metanólico) en las clementinas estudiadas. Diferentes letras para cada método indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Estas diferencias encontradas entre variedades, pueden deberse a que los distintos compuestos bioactivos presentes en las clementinas ejercen su acción antioxidante por diversos mecanismos, mediante la inhibición de enzimas, impidiendo la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs), quelando elementos involucrados en la producción de radicales libres, protegiendo las defensas antioxidantes, etc. En este sentido, los métodos utilizados en el presente estudio cubrirían algunos de estos mecanismos antioxidantes, por ello es necesario el empleo de varios métodos (Cho *et al*., 2005).

Además, la actividad antioxidante no viene dada únicamente por la suma de las actividades antioxidantes de los diferentes compuestos bioactivos en las clementinas, sino que también depende del microambiente en el que se encuentran estos compuestos (concentración de los mismos, composición lipídica, presencia de otros antioxidantes como la vitamina C entre otros, componentes habituales de las clementinas como pueden ser, agua, proteínas, azúcares, etc) y de la interacción de los mismos ejerciendo efectos sinérgicos o inhibitorios de esta actividad antioxidante (Kulskoski *et al*., 2005).

Comparando nuestros resultados con los publicados por otros autores, podemos afirmar que las muestras analizadas en el presente estudio presentan valores que pueden considerarse similares a otros frutos cítricos como la naranja dulce (*Citrus sinensis* L. Osbeck) (Guimarães *et al*., 2010), el pomelo (*Citrus grandis* Osbeck.) (Xi *et al*., 2014) o la guayaba (Zhang *et al*., 2016). En un estudio realizado en naranjas maduras (*Cirus sinensis* L. Osbeck) se mostraron resultados similares a los encontrados para los métodos DPPH, PR y ID β-caroteno (8,0; 2,1 y 0,4 mg/mL respectivamente; Cardeñosa *et al*., 2016). Por otro lado, Sdiri *et al*. (2012), realizaron un estudio sobre otras variedades de mandarina (*Safor, Garbí* y *Fortune*) indicando concentraciones inferiores a las obtenidas en este estudio (EC_{50} de 0,19 – 0,25 mg/mL).

Para valorar qué compuestos presentes en las clementinas son realmente responsables de su actividad biológica, se ha realizado un **análisis de correlaciones** el cual permite establecer similitudes de comportamiento de las variables consideradas en las muestras objeto de estudio, y constituye la base del análisis multivariable de los datos (estudio de los componentes principales) que pretende encontrar combinaciones de variables fuertemente relacionadas entre sí.

Para este estudio, se han considerado como variables los principales compuestos bioactivos analizados y los métodos empleados para la determinación de capacidad antioxidante en las clementinas. La matriz de correlaciones obtenida para las clementinas estudiadas (**Tabla 3.26**), muestra el coeficiente de correlación obtenido entre cada par de variables.

En relación a los ensayos de actividad antioxidante realizados, en el caso de los que evalúan la actividad antioxidante total (DPPH y PR), se observaron correlaciones positivas entre el EC50 obtenido por el método de DPPH con compuestos antioxidantes hidrófilos como son la vitamina C, ácidos fenólicos y flavonoides, así como con los AGPI, probablemente debido al efecto protector que ejercen estos compuestos frente a su oxidación y correlaciones negativas con el resto de familias de ácidos grasos (AGS y AGMI).

Tabla 3.26. Matriz de correlaciones para los diferentes métodos empleados de capacidad antioxidante en la variedad Basol.

	Vit C	AC	α-toco	Flav	AF	AGS	AGMI	AGPI	DPPH	PR	IDβ-carot	FI	FS	Fr	Gl	Sc	Fe	K
Vit C	1,0000																	
	0,0000																	
AC	0,4016	1,0000																
	0,0378	**0,0000**																
α-toco	0,4120	0,1580	1,0000															
	0,0327	0,4312	**0,0000**															
Flav	0,2607	-0,2774	0,1312	1,0000														
	0,1891	0,1612	0,5140	**0,0000**														
AF	0,2234	-0,2581	0,0816	0,9921	1,0000								N=27					
	0,2627	0,1937	0,6858	**0,0000**	**0,0000**													
AGS	0,2220	0,3988	0,7213	-0,3459	-0,3549	1,0000												
	0,2657	**0,0393**	**0,0000**	0,0772	0,0693	**0,0000**												
AGMI	0,0556	0,4702	0,2760	-0,5248	-0,4835	0,6110	1,0000											
	0,7830	**0,0133**	0,1635	**0,0050**	0,**0106**	0,**0007**	**0,0000**											
AGPI	-0,1971	-0,4483	-0,6646	0,4186	0,4155	-0,9795	-0,7580	1,0000										
	0,3244	**0,0190**	**0,0002**	0,**0298**	0,**0311**	0,**0000**	0,**0000**	**0,0000**										
DPPH	0,4032	-0,2874	-0,0216	0,7188	0,6647	-0,4614	-0,4799	0,5023	1,0000									
	0,0370	0,1461	0,9148	0,**0000**	0,**0002**	0,**0154**	0,**0113**	0,**0076**	**0,0000**									
PR	-0,1045	0,2322	-0,3909	-0,0169	-0,0025	-0,1932	0,1799	0,1134	0,2846	1,0000								
	0,6041	0,2439	0,**0438**	0,9333	0,9901	0,3342	0,3693	0,5733	0,1502	**0,0000**								
ID β-carot	0,5132	-0,1520	0,1399	0,5279	0,4943	-0,1047	-0,3540	0,1763	0,5409	0,1096	1,0000							
	0,0062	0,4491	0,4864	0,**0047**	0,**0088**	0,6034	0,0701	0,3789	0,**0036**	0,5864	**0,0000**							
FI	0,0115	-0,2928	0,2868	0,5650	0,4915	-0,2124	-0,4292	0,2843	0,5521	0,0060	0,3844	1,0000						
	0,9547	0,1383	0,1469	0,**0021**	0,**0092**	0,2875	0,**0255**	0,1506	0,**0028**	0,9763	0,**0477**	**0,0000**						
FS	0,8372	0,2033	0,6128	0,4369	0,3740	0,3167	-0,1587	-0,2205	0,4589	-0,2282	0,5708	0,2449	1,0000					
	0,0000	0,3091	0,**0007**	0,**0227**	0,0546	0,1075	0,4291	0,2690	0,**0160**	0,2523	0,**0019**	0,2183	**0,0000**					
Fr	-0,3219	-0,8677	-0,0802	0,3407	0,3360	-0,3362	-0,5417	0,4149	0,2505	-0,2192	0,2051	0,2553	-0,0805	1,0000				
	0,1015	0,**0000**	0,6908	0,0820	0,0866	0,0865	0,**0035**	0,**0314**	0,2077	0,2719	0,3047	0,1986	0,6899	**0,0000**				
Gl	-0,2623	-0,8202	0,0451	0,3790	0,3622	-0,2638	-0,5483	0,3570	0,2862	-0,2378	0,2029	0,3356	0,0227	0,9848	1,0000			
	0,1862	0,**0000**	0,8231	0,0512	0,0634	0,1836	0,**0031**	0,0676	0,1479	0,2323	0,3100	0,0871	0,9104	0,**0000**	**0,0000**			
Sc	-0,5631	-0,6824	-0,2485	-0,2388	-0,2233	-0,1316	-0,1899	0,1567	-0,3185	-0,2896	-0,2974	-0,3053	-0,4218	0,6432	0,5813	1,0000		
	0,0022	0,**0001**	0,2114	0,2303	0,2629	0,5130	0,3428	0,4350	0,1054	0,1428	0,1320	0,1214	0,**0284**	0,**0003**	0,**0015**	**0,0000**		
Fe	-0,2115	-0,4735	-0,0401	0,2830	0,3056	-0,3412	-0,2073	0,3340	0,1813	-0,4231	-0,2470	0,1836	-0,1947	0,4723	0,4522	0,1563	1,0000	
	0,2895	**0,0126**	0,8426	0,1527	0,1211	0,0815	0,2995	0,0887	0,3656	0,**0279**	0,2142	0,3594	0,3304	0,**0129**	0,**0179**	0,4363	**0,0000**	
K	-0,5170	0,1877	-0,3116	-0,6891	-0,6037	0,2061	0,5712	-0,3152	-0,7530	0,1653	-0,6645	-0,7632	-0,6845	-0,1477	-0,2194	0,4053	-0,0852	1,0000
	0,0058	0,3486	0,1136	0,**0001**	0,**0009**	0,3025	0,**0019**	0,1093	0,**0000**	0,4099	0,**0002**	0,**0000**	0,**0001**	0,4622	0,2716	**0,0360**	0,6725	**0,0000**

Vit C: vitamina C; α-toco: α-tocoferol; AF: ácidos fenólicos totales; Flav: flavonoides totales; AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; Fr: fructosa; Gl: glucosa; Sc: sacarosa; Fe: hierro; K: potasio; FI: fibra insoluble; FS: fibra soluble; DPPH: método de ensayo capacidad antioxidante; PR: método ensayo del poder reductor; ID β-carot: Inhibición de la decoloración del β-caroteno

Así pues, podría decirse que estos compuestos son los responsables de la capacidad antioxidante de las clementinas que mide el método. Sin embargo, en cuanto al ensayo del poder reductor, el valor de EC_{50} únicamente está correlacionado y de forma negativa con el α-tocoferol y como es lógico con el contenido de Fe presente en las clementinas.

Del mismo modo, la vitamina C, flavonoides y ácidos fenólicos están fuertemente correlacionados con el método de inhibición de la peroxidación lipídica, ensayo de inhibición de la decoloración de β-caroteno, existiendo correlaciones positivas entre el valor de EC_{50} con dichos compuestos de carácter antioxidante, lo cual es indicativo de que estos compuestos son muy activos frente al proceso de peroxidación lipídica.

Además, podemos observar que la vitamina C está fuertemente correlacionada con el α – tocoferol, lo cual sería indicativo del efecto protector que la vitamina C (ácido ascórbico) ejerce frente a la oxidación de radicales libres sobre estos compuestos y que, a su vez el α – tocoferol está correlacionado fuertemente y de forma negativa con los AGPI, evitando así su peroxidación lipídica y preservando su contenido, este comportamiento favorecería el resultado obtenido frente a los métodos de capacidad antioxidante empleados en las clementinas objeto de estudio.

Respecto a la posible correlación de los distintos métodos de actividad antioxidante entre sí, el ensayo de DPPH está fuertemente correlacionado y de forma positiva con el ensayo de inhibición de la decoloración del β – caroteno, podríamos indicar que se trata de los dos métodos que aportan información más relevante en este tipo de frutas cítricas.

Por último, para caracterizar globalmente las variedades de clementinas consideradas en este estudio, se ha realizado un análisis de **componentes principales (PCA)** considerando como variables a los distintos parámetros evaluados, y como componentes a unas nuevas variables linealmente independientes entre sí, de manera que unas pocas variables (componentes principales) permitirán caracterizar dichas clementinas, ya que cada componente está basada en la combinación de distintas variables correlacionadas entre sí.

La aplicación del análisis de componentes principales, permitió reducir la estructura tridimensional de los datos a un mapa en el plano que explica el 100 % del total de la varianza (55,43 % del primer componente, 44,56 % del segundo componente). De forma que para una correcta interpretación de la variabilidad de los datos se requiere la consideración de los dos primeros componentes principales, tal y como se muestra en la **Tabla 3.27**.

Tabla 3.27. Porcentaje de la variación total explicada por cada componente principal – Análisis global

Componente	Autovalor	Varianza	% Acumulado
1	9,97821	55,435	55,435
2	8,02179	44,565	**100,000**

En la **Tabla 3.28** se recoge la participación de cada variable a cada una de las componentes principales, indicándose en negrita aquellos valores más significativos.

Tabla 3.28. Participación de cada parámetro estudiado en los componentes principales.

Parámetros	Componente 1	Componente 2
Vit C	0,252481	-0,212994
AC	0,140928	**-0,316158**
α-toco	**0,312771**	0,054557
Flav	0,097480	**-0,335918**
AF	0,103005	**-0,333860**
AGS	0,275056	0,174795
AGMI	0,263205	-0,196184
AGPI	**-0,301038**	-0,109246
DPPH	**0,296080**	-0,124968
PR	-0,164190	**0,301873**
ID β-carot	**-0,306815**	-0,086983
Fructosa	0,195400	0,277790
Glucosa	0,208834	0,265353
Sacarosa	-0,019663	**0,352391**
Fibra Insoluble	**-0,296380**	-0,124079
Fibra Soluble	**0,295716**	0,126035
Fe	0,156548	**-0,306881**
K	0,268635	0,186803

Vit C: vitamina C; α-toco: α-tocoferol; AF: ácidos fenólicos totales; Flav: flavonoides totales; AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; Fr: fructosa; Gl: glucosa; Sc: sacarosa; Fe: hierro; K: potasio; FI: fibra insoluble; FS: fibra soluble; DPPH: método de ensayo capacidad antioxidante; PR: método ensayo del poder reductor; ID β-carot: Inhibición de la decoloración del β-caroteno

Como se puede observar el primer componente principal está definido, es decir se encuentra fuertemente correlacionado, por las variables: α – tocoferol y fibra soluble, así como por el

ensayo de actividad antioxidante DPPH en correlación positiva y negativamente con AGPI, fibra insoluble y el método inhibición de la decoloración del β – caroteno.

De la misma forma el segundo componente está caracterizado por las variables de azúcares solubles, principalmente la sacarosa, así como el ensayo del poder reductor (PR) de forma positiva; y con las variables ácido cítrico (AC) y compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) así como con el Fe en correlación negativa.

Por su parte, la **Tabla 3.29** indica la participación de cada una de las componentes principales en las variedades de clementinas estudiadas.

Tabla 3.29. Participación de los componentes principales por cada clementina estudiada

Variedad	Componente 1	Componente 2
Basol	0,1202	-3,2686
Clemenrubí	3,0970	1,7277
Clemensoon	-3,2172	1,5410

Ambos componentes se hallan representados en la **Figura 3.58** donde se observa que la variedad **Basol** está caracterizada principalmente por el alto contenido en compuestos fenólicos, tanto flavonoides como ácidos fenólicos, Fe y AC, así como por presentar mayor actividad antioxidante medida por el método del poder reductor y el de inhibición de la decoloración del β – caroteno, mientras que **Clemenrubí** se caracteriza fundamentalmente por el elevado contenido de fibra soluble y el compuesto antioxidante α – tocoferol. Por su parte, **Clemensoon**, se caracteriza a diferencia del resto de clementinas estudiadas, por su elevado contenido de fibra insoluble y ácidos grasos poliinsaturados, así como presentar la mayor actividad antioxidante medida por el método DPPH.

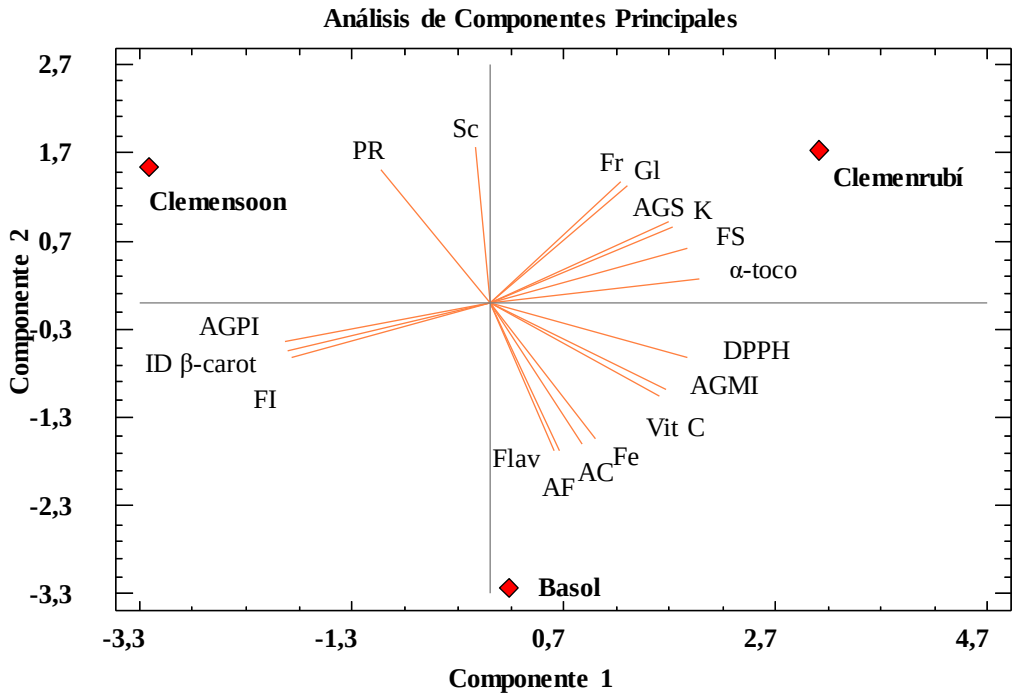


Figura 3.58. Gráfica de pesos de las variables y diagrama de dispersión de las variedades. Vit C: vitamina C; α-toco: α-tocoferol; AF: ácidos fenólicos totales; Flav: flavonoides totales; AGS: ácidos grasos saturados; AGMI: ácidos grasos monoinsaturados; AGPI: ácidos grasos poliinsaturados; Fr: fructosa; Gl: glucosa; Sc: sacarosa; Fe: hierro; K: potasio; FI: fibra insoluble; FS: fibra soluble; DPPH: método de ensayo capacidad antioxidante; PR: método ensayo del poder reductor; ID β-carot: Inhibición de la decoloración del β-caroteno.

3.6. CONCLUSIONES PARCIALES

Influencia del **proceso de maduración**:

1. Los resultados correspondientes al estudio de la influencia del **proceso de maduración** en las clementinas, mediante la comparación del estado de maduración intermedio (E1) y el estado de maduración organoléptico/comercial (E2) para una misma variedad, teniendo en cuenta dos temporadas de recolección correspondientes a los años 2012 y 2013, indican que existen variaciones estadísticamente significativas en los siguientes parámetros: disminución de la vitamina C (ácido ascórbico) y del contenido de ácido cítrico acompañado de un aumento de los azúcares solubles, debido sobre todo a la acumulación de sacarosa. También se encontraron variaciones significativas en los contenidos de compuestos fenólicos en general.

Los principales aspectos a destacar de la **composición centesimal** de las variedades de clementinas (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) estudiadas son los siguientes:

2. Los valores correspondientes a los parámetros físico - químicos (pH, AT, ºBrix e IM) presentaron, en todas las clementinas estudiadas, diferencias estadísticamente significativas entre temporadas. Estas diferencias pueden ser principalmente debidas a las diferentes condiciones climáticas, temperatura y humedad, que pueden provocar variaciones en la calidad interna de las frutas, principalmente en la acidez de las mismas, el contenido de sólidos solubles y por consiguiente en el índice de madurez.
3. Como corresponde a estas frutas el componente mayoritario es el agua siendo el contenido medio de humedad del 85 % para todas las clementinas estudiadas.
4. El total de azúcares solubles cuantificados (glucosa, fructosa y sacarosa) osciló entre 8,49 y 13,99 g/100g de porción comestible, siendo la sacarosa el azúcar mayoritario (4,43 - 6,62 g/100g de porción comestible), representando hasta un 46 % del total de azúcares solubles y siendo la relación glucosa/fructosa próxima a 1 en todos los casos. En este sentido, destaca la variedad Clemensoon por presentar un contenido de sacarosa significativamente más alto que el resto de las clementinas estudiadas.
5. El contenido de fibra total osciló entre 1,04 - 3,65 g/100g de porción comestible, con proporciones de fibra soluble e insoluble próximas a 1. Según los resultados

obtenidos y de acuerdo con los valores dietéticos de referencia (VDR) establecidos por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) podemos decir que el consumo de tres piezas diarias de clementinas (alrededor de 250 g) cubriría más del 20 % de dichos VDR establecidos en 25 gramos.

6. El rango de variación del contenido en proteínas fue de 1,19 – 2,07 g/100 g de porción comestible, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre las variedades estudiadas.
7. El contenido de cenizas osciló entre 0,25 y 0,42 g/100g de porción comestible destacando el potasio (K) como macroelemento mayoritario (63,59 − 114,20 mg/100g de porción comestible) representando hasta un 38 % con respecto al total del contenido mineral y dentro de los microelementos, el Fe fue el mayoritario (0,18 – 0,49 mg/100g de porción comestible) destacando la variedad Basol por presentar los valores significativamente más elevados.
8. El contenido graso osciló entre 0,04 y 0,10 g/100g de porción comestible, siendo los ácidos grasos mayoritarios el ácido palmítico (AP, C16:0) seguido de α – linolénico (ALA, C18:3n3) y ácido linoleico (AL, C18:2n6) en todos los casos.

En relación a la caracterizacón de **compuestos bioactivos**:

9. Las clementinas objeto de estudio destacaron por sus elevados contenidos de vitamina C en forma de ácido ascórbico (62,74 y 132,04 mg/100g de porción comestible). Según el Reglamento 1169/2011 sobre la información facilitada al consumidor, en el caso de las variedades Basol y Clemenrubí con una sola pieza de estas frutas (85 gramos) se cubriría el 100 % del Valor de Referencia de Nutriente (VRNs) establecido en 80 mg/100 g de porción comestible, pudiéndose promocionar estas frutas como **fuente natural de vitamina C**, al superar el 15 % establecido.
10. Los ácidos orgánicos identificados y cuantificados han sido: ácido oxálico, quínico, málico, isocítrico, cítrico y fumárico. El ácido cítrico fue el ácido orgánico mayoritario en todas las variedades de clementinas estudiadas, alcanzando valores de hasta 800 mg/100g de porción comestible, tal y como ocurrió en Basol y Clemensoon, llegando a representar hasta un 79 % del total de ácidos orgánicos.
11. En el presente estudio, se han detectado diecisiete compuestos fenólicos diferentes. Dentro de los flavonoides, la mayoría de ellos *C* y *O*-glucósidos, el grupo principal fueron las flavanonas (narirutina/naringina y (neo) hesperidina) seguido de flavonas,

polimetoxiflavonas, y flavonoles. Dentro de los ácidos fenólicos la fracción mayoritaria correspondió a los ácidos hidroxicinámicos (sinapoil-glucósido, ácido feruloil-glucárico y cafeoil-glucósido) seguidos de los ácidos hidroxibenzoicos.

12. En las clementinas estudiadas se identificaron las cuatro isoformas de tocoferol (α, β, γ y δ – tocoferol) siendo la isoforma α – tocoferol la mayoritaria (entre 0,103 y 0,302 mg/100g de porción comestible), representando más del 90 % en todas las clementinas estudiadas con respecto al total.
13. Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos, podríamos decir que las clementinas son unas frutas muy interesantes por su bajo valor energético (entre 46,86 - 67,36 kcal/100 g porción comestible) principalmente debido al contenido total de azúcares solubles. Considerando una ingesta calórica de 2.200 – 2.900 Kcal/día para mujeres y hombres respectivamente, y teniendo en cuenta que una pieza de esta fruta posee un peso aproximado de 85 g, la ingesta de dos piezas de cualquiera de las clementinas estudiadas (alrededor de 170 g aproximadamente) supondría una contribución al aporte calórico a la dieta únicamente del 5 % en mujeres y de prácticamente el 4 % en hombres.

Respecto a **la actividad biológica (actividad antioxidante)** de las clementinas estudiadas:

14. La variedad Basol fue la que presentó mayor actividad antioxidante medida mediante el ensayo del poder reductor frente al estrés oxidativo, mostrando los valores de EC_{50} más bajos (1,32 – 2,46 mg/mL) así como mediante el ensayo de inhibición de la decoloración del β-caroteno (inhibición de la peroxidación lipídica; 0,21 – 0,82 mg/mL), mientras que Clemensoon presentó mayor actividad antioxidante medida a través del ensayo del DPPH, evitando así, la formación y/o interacción de las substancias oxidantes en fase hidrofílica (3,36 – 10,98 mg/mL).
15. El estudio de correlaciones mostró que la actividad antioxidante de las clementinas, medida mediante el ensayo del DPPH y de la inhibición de la decoloración del β – caroteno, fue debida a la presencia de los siguientes compuestos bioactivos: la vitamina C y compuestos fenólicos, tanto flavonoides como ácidos fenólicos. Ambos métodos están fuertemente correlacionados entre sí, por lo que se concluye que dichos métodos son una buena elección a la hora de medir la capacidad antioxidante en estas frutas.

PARTIAL CONCLUSIONS

The influence of the **ripening process**:

1. The influence of the **ripening process** in clementines, by comparing the intermediate ripening stage (E1) and the organoleptic/commercial ripening stage (E2) for the same variety, was assessed for two picking seasons for the years 2012 and 2013. Results indicate that there are statistically significant differences in the following parameters: reduction of vitamin C (ascorbic acid) and in the citric acid content, accompanied by an increase in soluble sugars, due particularly to the accumulation of sucrose. There were also significant differences in the phenolic compounds content.

The main aspects of the **centesimal composition** of clementines varieties (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan.) are as follows:

2. The values corresponding to the physical and chemical parameters (pH, TA, ºBrix and IM) in all the clementines studies showed statistically significant differences between seasons. These differences, mainly due to the different climatic conditions, temperature and humidity, can promote changes in the internal fruit quality, mainly in their acidity, soluble solids content and consequently in their maturity index.
3. As expected of these fruit, the major component was water, with a mean moisture content of 85 % in all the clementines studied.
4. The total soluble sugars measured (glucose, fructose and sucrose) varied between 8.49 and 13.99 g/100 g of edible portion, with sucrose as the predominant sugar (4.43 - 6.62 g/100 g), representing up to 46 % of the total soluble sugars, being the glucose/fructose ration close to 1 in all cases. In this sense, the Clemensoon variety presented a significantly higher sucrose content comparing with the other studied clementines.
5. The dietary fibre content varied between 1.04 - 3.65 g/100g of edible portion, with the soluble/insoluble fibre ratio close to 1. Based on our results and in accordance with Dietary Reference Value (DRVs) established by the European Food Safety Agency (EFSA) we can claim that the consumption of three clementines pieces per day (around 250 g) could cover over 20 % of these DRVs set at 25 grams.
6. The range of variation of the protein content was 1.19 - 2.07 g/100g of edible portion, with no statistically significant differences between varieties.

7. The ash content varied between 0.25 and 0.42 g/100g of edible portion, being potassium (K) the predominant macroelement (63.59 - 114.20 mg/100g), representing up to 38 % of total mineral content. Iron (Fe) was the predominant microelement (0.18 - 0.49 mg /100g), being Basol the clementine variety with the significantly highest content.
8. The fat content varied between 0.04 and 0.10 g/100g of edible portion, being palmitic acid (PA, C16:0) followed by α–linolenic acid (ALA, C18:3n3) and linoleic acid (LA, C18:2n6) the predominant fatty acids in all cases.

In relation to the characterization of **bioactive compounds**:

9. The studied clementines had a significantly high vitamin C content, mainly as ascorbic acid (62.74 - 132.04 mg/100g of edible portion). In accordance with Regulation 1169/2011, in the case of the Basol and Clemenrubí varieties, a single piece of these fruit (85 grams) could cover the 100 % of the Nutrient Reference Value (NRVs), set at 90 mg/100g of edible portion, being able to promote these fruits as a **natural source of vitamin C**, exceeding the established 15 %.
10. The organic acids identified and quantified in all studied clementines were: oxalic acid, quinic acid, malic acid, isocitric acid, citric acid and fumaric acid. Citric acid was the main organic acid in all varieties, reaching values up to 800 mg/100g of edible portion, as in the case of Basol and Clemensoon, representing up to 79 % of the total organic acid.
11. Seventeen different phenolic compounds were characterized, within the flavonoids, much of them was *C* and *O*-glucosides, the main group were flavanones (narirutin/naringin and hesperidin (neo)) followed by flavones, polymethoxyflavones and flavonols. Regarding the phenolic acids, the main fraction was the hydroxycinnamic acids (sinapoyl-glucoside, feruloyl-glucaric acid and caffeoyl-glucoside) followed by the hydroxybenzoic acids.
12. In the studied clementines, the four tocopherol isoforms were identified (α, β, γ and δ–tocopherol), being α-tocopherol the predominant one (between 0.103 and 0.302 mg/100g of edible portion), representing over 90 % of the total tocopherol content in all the studied clementines.
13. Considering the obtained results, we can conclude that clementines are very interesting fruit due to their low energy value (between 46.86 - 67.36 kcal/100 edible

portion). Considering that the energy ingestion was 2200 - 2900 kcal/day for men and women respectively, and considering that one fruit piece weight approximately 85 g, ingestion of two pieces of any of the studied clementines (approximately 170 g) could provide only 5 % of the dietary calorie intake for women and around 4 % for men.

With respect to the **biological activity (antioxidant activity)**:

14. Basol clementine showed higher antioxidant activity, measured by the reducing power assay (oxidative stress), with the lowest EC_{50} values (1.32 - 2.46 mg/mL), as well as by the β-carotene assay bleaching inhibition (lipid peroxidation inhibition; 0.21 - 0.82 mg/mL). While Clemensoon showed higher antioxidant activity, measured by the DPPH assay (3,36 - 10,98 mg/mL) preventing antioxidants hydrophilic interaction.
15. The correlation study showed that the antioxidant activity of clementines varieties, measured by the DPPH assay and β-carotene bleaching inhibition was due to the presence of the following bioactive compounds: vitamin C and phenolic compounds, both flavonoids and phenolic acids. Both methods were strongly inter-correlated, so it is concluded that these assays are a good choice for measuring the antioxidant capacity in these fruits.

4. ESTUDIO DE NARANJAS PIGMENTADAS

4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Sanguinello y Tarocco (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) son las variedades de naranjas pigmentadas más comunes y ampliamente difundidas en el Mediterráneo, principalmente en el sur de Italia y España, y recientemente en los Estados Unidos de América, concretamente en California. Estas variedades se consumen en todo el mundo, como productos frescos o procesados (Kelebek *et al*., 2008), y su interés entre los consumidores se debe a diferentes factores, incluyendo sus propiedades organolépticas (color y sabor), así como los beneficios para la salud derivados de su consumo (Kafkas *et al*, 2009).

Con estas consideraciones, los objetivos específicos de este estudio han sido:

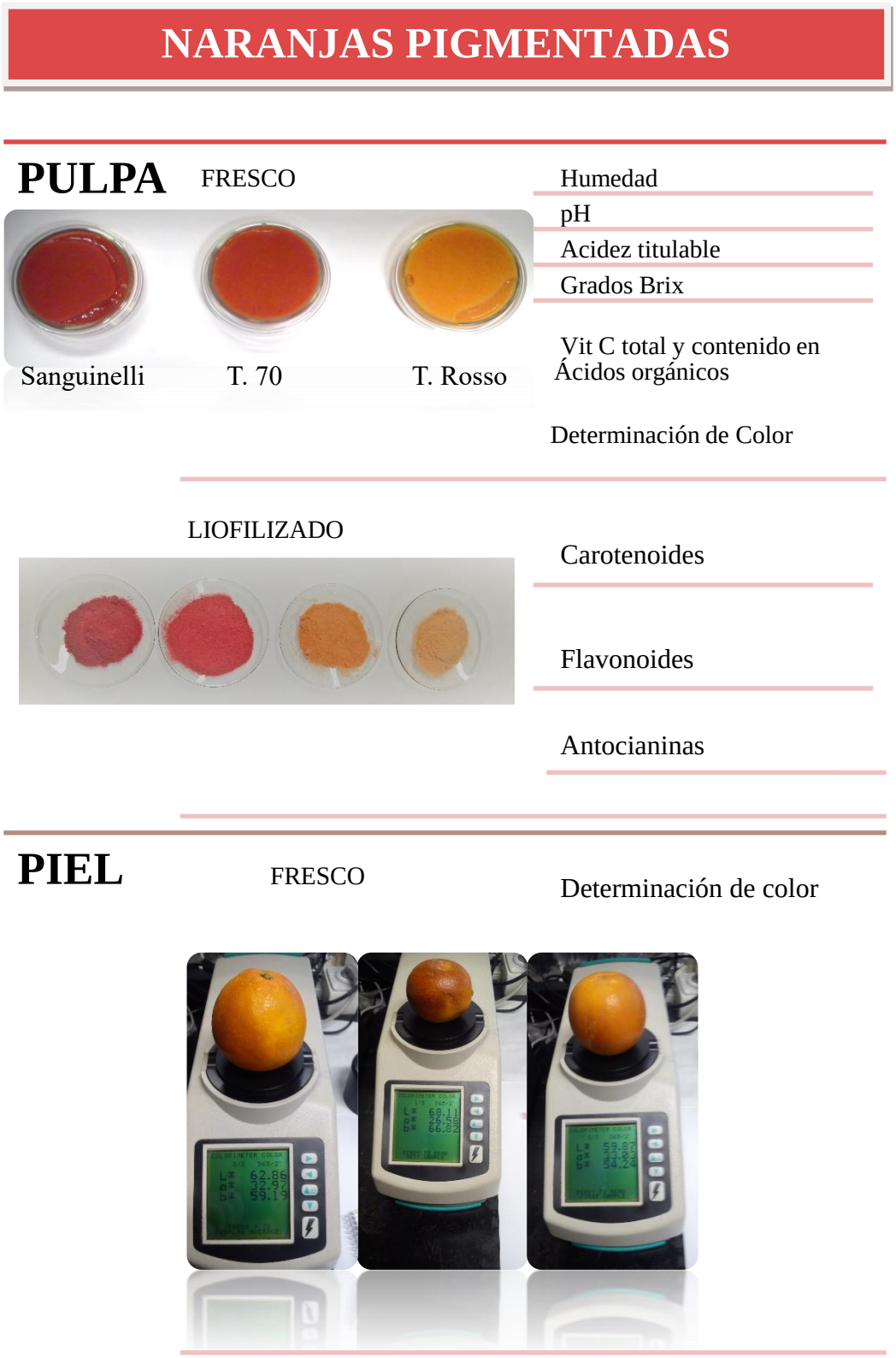
1. Identificar y cuantificar el contenido en compuestos bioactivos de tales como vitamina C (ácido ascórbico y dehidroascórbico), ácidos orgánicos, carotenoides y compuestos fenólicos (flavonoides y antocianinas), en distintas variedades de naranja pigmentada (Tarocco y Sanguinelli).

2. Valorar las cualidades organolépticas, referentes al color de la pulpa y piel, de las variedades de naranjas pigmentadas analizadas.

Este trabajo forma parte del proyecto de investigación OTRI UCM-ANECOOP S. Coop – (Referencia 25/2015) y se ha llevado a cabo en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Parte del trabajo realizado en este estudio, como la determinación de flavonoides se llevó a cabo en el Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia (España), así como la determinación de antocianinas en el Laboratorio de Química y Bioquímica Aplicada, perteneciente al Departamento de Biología y Biotecnología (DBB) del Centro de Investigación de Montaña (CIMO), Escola Superior Agrária de Bagança (Portugal).

A continuación, se muestra a modo de resumen el planteamiento del trabajo realizado, indicando las determinaciones llevadas a cabo en las naranjas pigmentadas objeto de estudio.



Esquema 4.1. Esquema de las determinaciones realizadas en Naranjas Pigmentadas.

4.2. MATERIALES

NARANJAS PIGMENTADAS **(***Citrus sinensis* (L.) Obsbeck)

Las variedades de naranja pigmentada, pueden dividirse en dos grandes grupos en función de la intensad de su pigmentación, Tarocco (poco pigmentada) y Sanguinelli (muy pigmentada) (MAPAMA, 2017e; IVIA, 2017). A continuación, se describen las variedades que han sido objeto de estudio en el presente capítulo.

Variedad Sanguinelli (*Citrus sinensis* L. cv. Sanguinelli)

Procede de la variedad de naranja sanguina *Doble Fina (C. sinensis* L. cv. Double Fine), por mutación espontánea, detectada por primera vez en España en 1929 en un huerto de Almenara (Castellón). Esta variedad, de entre las del grupo sanguina o pigmentadas ha llegado a ser la más cultivada en España (Anecoop.S.Coop.; IVIA, 2017). El árbol (**Figura 4.1**) es de tamaño mediano, buen vigor y con hojas de color verde claro. Se trata de un grupo muy productivo y sus frutos, son de forma ovalada, de tamaño mediano a pequeño y con pocas semillas, de corteza fina y brillante, con zonas de color rojo intenso.



Figura 4.1. Izquierda: Fruto *Sanguinelli*. Derecha: Árbol Sanguinelli

La pulpa es jugosa, roja amoratada, con buen contenido en zumo de color rojo intenso, aromático y agradable. Puede recolectarse a partir de enero, presenta una mayor adherencia al pedúnculo que otras variedades del grupo, por lo que se puede conservar bien en árbol

durante meses. También, presenta buen comportamiento en cámara de refrigeración (Anecoop. S. Coop.).

Tarocco Rosso (*Citrus sinensis* L. cv. Tarocco) ***y sus homólogos T. 70 y T. 100***

La variedad ***Tarocco*** deriva de la naranja sanguina siciliana *Sanguigno*, muy antigua y poco cultivada en la actualidad. El árbol de **Tarocco Rosso, T. 70 y T. 100** (**Figuras 4.2 y 4.3**) es de tamaño medio, forma irregular y moderadamente productiva, se trata de un árbol vigoroso, con mayor desarrollo que la variedad *Sanguinelli* y con alguna espina en las ramas. Sus frutos son de tamaño medio a grande, con una forma muy característica, es redondo y tiene un cuello ligeramente pronunciado, de modo que resulta parecido al tarocco del Francofonte (*Citrus sinensis* L. cv. Tarocco) y al tangelo (*Citrus tangelo*) Minneola. La corteza presenta un color rojizo muy llamativo a diferencia de su homólogo el tarocco Francofonte que posee un buen color naranja una vez madura, pero no adquiere dicho color rojizo (Anecoop. S. Coop.).



Figura 4.2. Izquierda: Árbol Tarocco Rosso. Derecha: Fruto Tarocco Rosso

La coloración del fruto se acentúa con temperaturas bajas en el periodo de maduración, siendo mayor con suelos sueltos y poco compactos. La piel es ligeramente rugosa, moderadamente gruesa, no está muy adherida y resulta fácil de pelar, desprendiendo apenas

aceite esencial. Las membranas de los gajos son tiernas y la pulpa, ligeramente coloreada, es blanda y de textura tierna. La naranja es de mayor tamaño que Sanguinelli, si bien la coloración externa es menor y en el periodo de recolección la consistencia del fruto también es menor (Anecoop. S. Coop.).



Figura 4.3. Izquierda: Árbol Tarocco T. 70. Derecha: Frutos Tarocco T. 70 analizada

Estas naranjas pigmentadas alcanzan su punto óptimo de recolección (**Figura 4.4**) a finales de enero, una vez está totalmente madura su sabor es bueno y aromático, con un perfecto equilibrio entre azúcar y acidez, lo que las convierte en una de las mejores naranjas del Mediterráneo. Apenas presentan semillas y se conservan bien, aunque pueden perder condiciones comerciales si permanecen en el árbol demasiado tiempo.

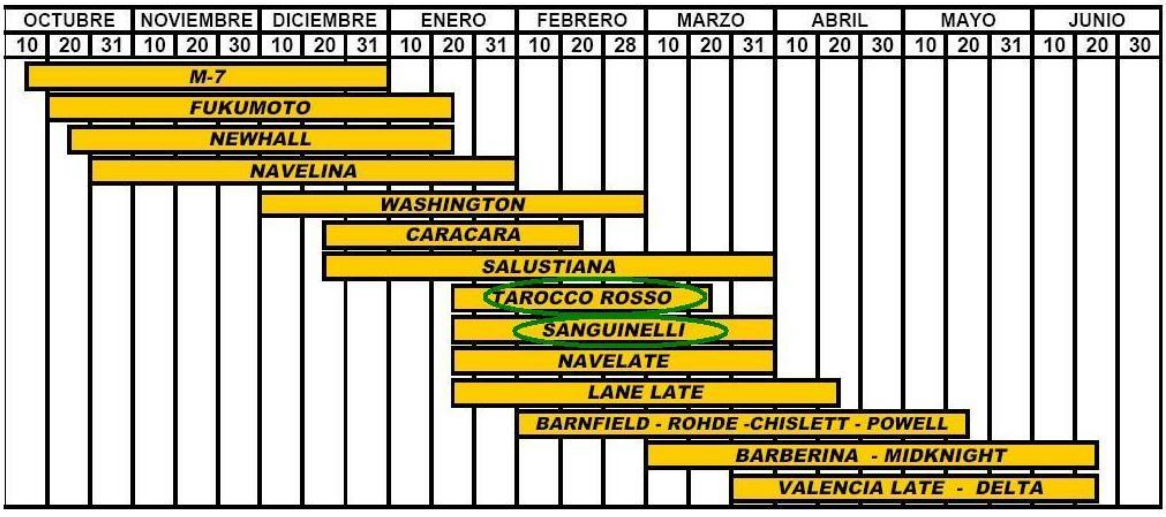


Figura 4.4. Periodos de recolección de naranjas. (IVIA, 2017). Adaptación de Pardo *et al*., 2016.

En el presente estudio se han seleccionado cuatro muestras de naranja pigmentada: **Sanguinelli, Tarocco Rosso, Tarocco T. 70 y Tarocco T. 100**, recolectadas durante la campaña de invierno de 2015. Las muestras se recolectaron en tres momentos diferentes (lotes) para una mejor caracterización de las mismas, a excepción del Tarocco T. 100 que se analizó un único lote, tal y como se muestra en la **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Muestreo realizado en naranjas sanguinas.

Naranja Sanguina	Lote A	Lote B	Lote C
T-Sanguinelli	28/01/2015	04/03/2015	10/03/2015
T. Rosso	28/01/2015	04/03/2015	10/03/2015
T. 70	28/01/2015	04/03/2015	10/03/2015
T. 100	16/04/2015	-	-

La selección y recolección de las muestras fue realizada por técnicos de ANECOOP. Las muestras, recién recolectadas fueron transportadas al laboratorio de la Universidad Complutense de Madrid en un plazo de tiempo inferior a 24 h, manteniendo en todo momento la cadena de frío para asegurar la correcta conservación de las mismas.

4.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

Una vez recibidas las naranjas en el laboratorio, se procedió a la preparación de las muestras para su posterior análisis. Para ello, se separó la piel de la pulpa, ambas fracciones se trituraron y homogeneizaron (Ultraturrax®) por separado en estado fresco. Una parte del producto fresco homogeneizado se empleó para las determinaciones físico-químicas (humedad, pH y acidez titulable, ºBrix), la determinación de vitamina C en sus dos formas activas (ácido ascórbico y ácido dehidroascórbico), ácidos orgánicos y la medida de color de la pulpa.

Otra parte del producto fresco homogeneizado se sometió a congelación y posterior liofilización, protegido de la luz para asegurar su conservación durante el periodo de tiempo necesario para completar todos los análisis. Las muestras liofilizadas se trituraron y homogeneizaron (Ultraturrax®), guardándose en recipientes herméticos, en oscuridad y a temperatura controlada (-20 °C) para evitar la alteración del producto.

Las determinaciones realizadas en las diferentes naranjas pigmentadas estudiadas, se muestran en el siguiente esquema (**Esquema 4.1**). Los métodos analíticos empleados han sido los mismos que en el capítulo 3.3 correspondiente al estudio de clementinas con excepción de la determinación de flavonoides, antocianinas, carotenoides y color, que se describen a continuación.

4.3.1. Pigmentos carotenoides: β-caroteno y licopeno

Estos carotenoides se determinaron por espectrofotometría, según la metodología descrita por Fernández-Ruiz *et al*., (2010). Para ello, la muestra liofilizada fue extraída con 50 mL de una mezcla compuesta por hexano/acetona/etanol (50:25:25, v/v/v). La solución se llevó a agitación en baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Posteriormente, se le añadieron 5 mL de agua destilada y se dejó reposar 1 hora en oscuridad para permitir la separación de las fases. A continuación, se tomó una alícuota de 10 mL de la capa superior (hexano) del extracto anterior para su posterior lectura frente a un blanco de reactivos. El equipo instrumental empleado para la determinación de los carotenoides en las muestras analizadas fue un espectrofotómetro UV-visible, Lambda EZ 210.

La cuantificación se llevó a cabo utilizando patrones de trans-licopeno y β-caroteno (Sigma-Aldrich) que fueron disueltos en las mismas condiciones que las muestras en un intervalo de 0,1 - 0,5 μg/mL. Los resultados se expresaron como mg/100 g de porción comestible.

El perfil de absorción de estos patrones se puede observar en la siguiente figura (**Figura 4.5**).

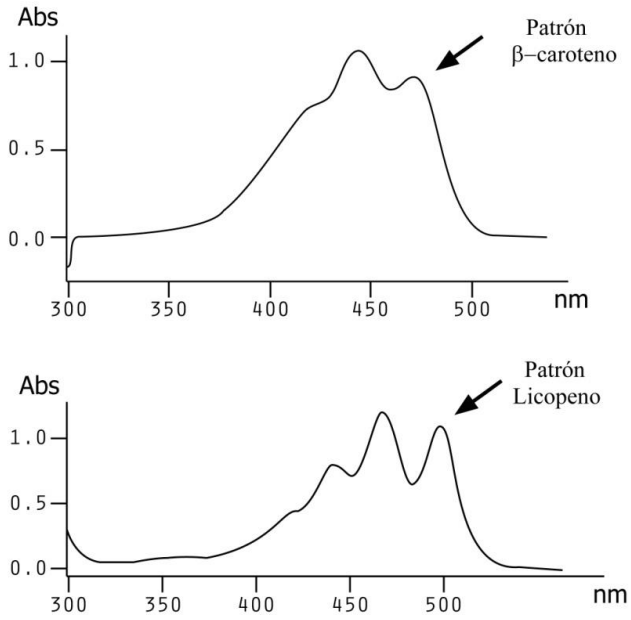


Figura 4.5. Espectro de absorción de los patrones de carotenoides utilizados en el estudio.

4.3.2. Compuestos fenólicos: Flavonoides

La determinación de los flavonoides se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector de UV-visible (Peiró, 2007; Igual *et al*., 2011). La extracción de los flavonoides se llevó a cabo después del procedimiento propuesto por Tomás-Barberán *et al*. (2001). Consistió en homogeneizar las muestras liofilizadas objeto de análisis (T25 Janke y Kunkel Turrax®) durante 5 min con 40 mL de metanol, 10 mL de agua bidestilada y NaF, para inactivar las enzimas polifenol oxidasas y prevenir la degradación fenólica. El resultado de este homogeneizado llevado a cabo con un Ultraturrax® (T25 Janke y kunkel) durante 15 minutos se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 ºC (Selecta

Medifriger-BL) para obtener el sobrenadante que se filtró a través de un filtro de membrana 0,45 μm.

El equipo HPLC (Jasco, Italia) estaba formado por una bomba ternaria (Jasco PU- 1580 bomba de HPLC), un generador de gradiente (ternario LG-1580-02 Unidad de gradiente), columna Ultrabase-C18 (5 m, 4,6 x 250 mm) y un detector UV-visible (MD-1510) con un rango de medida de longitud de onda de 190 a 650 nm.

La fase móvil estaba compuesta de metanol (A) y agua (B), se utilizó un gradiente lineal de elución comenzando en 30:70 hasta llegar a 100:0 durante 70 minutos, el volumen de inyección fue de 25 μL y el caudal de 1 mL/min. Los cromatogramas se registraron a 286, 284 y 254 nm.

Para la identificación y cuantificación de los flavonoides en naranjas pigmentadas (**Figura 4.6**) se utilizaron curvas de calibración de flavonoides de referencia o estándar, como fueron la narirutina (NAT), naringina (NAR), hesperidina (HES), neohesperidina (NEOH), didimina (DID), poncirina (PON), naringenina (NAG) y la quercetina (QUER), además como patrón interno se utilizó el naftaleno (NAF) (Peiró, 2007).

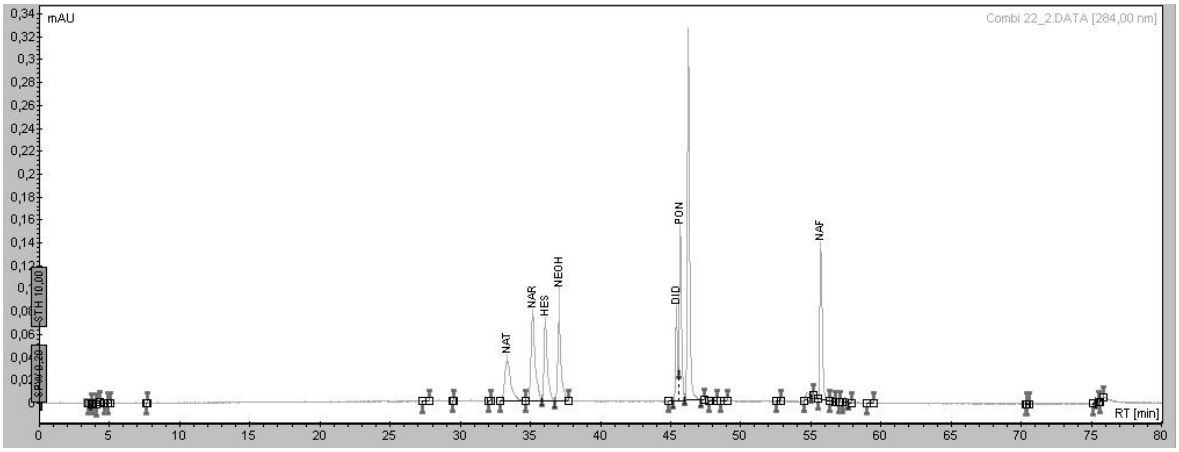


Figura 4.6. Cromatograma combinado empleado para la identificación y cuantificación de flavonoides a una λ = 284 nm. NAT (narirutina), NAR (naringina), HES (hesperidina), NEOH (neohesperidina), DID (didimina), PON (poncirina) y NAF (naftaleno).

4.3.3. Compuestos fenólicos: Antocianinas

La determinación de antocianinas se realizó según el método descrito por Bastos *et al*., (2015), por HPLC-MS. Las muestras se extrajeron y purificaron de manera muy similar a la extracción descrita en el apartado 3.3.4. (capítulo anterior de clementinas). En este caso, la mezcla fue de metanol a 25 °C, el cual contenía 0,5 % de ácido trifluoroacético (TFA) para la extracción. Una vez purificados los compuestos, las antocianinas fueron re-disueltas en 5 mL de metanol con 0,1 % de TFA. El extracto resultante de esta purificación se concentró a vacío, se volvió a disolver en 2 mL de metanol acuoso, MeOH:H_2O (20:80, v/v), y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm para su posterior análisis en HPLC.

El contenido en antocianinas se determinó utilizando el equipo de HPLC-MS descrito en el apartado 3.3.4. en el capítulo de clementinas para la determinación de compuestos fenólicos. Los disolventes utilizados fueron: (A) 0,1 % de TFA en agua, y (B) 100 % de acetonitrilo, usando un gradiente de elución: 10 % de B durante 3 min, de 10 a 15 % de B durante 12 min, 15 % de B durante 5 min (isocrático), de 15 a 18 % de B durante 5 min, de 18 a 30 % de B durante 20 min y de 30 a 35 % de B durante 5 min, a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. Los datos espectrales para todos los picos se registraron a 520 nm, como longitud de onda preferida. Las condiciones del espectrofotómetro de masas (EM) fueron: gas nebulizador, 40 psi; gas turbo, 600 °C y 50 psi; cortina de nitrógeno, 100 psi; gas de alta colisión. Los cuadrupolos fueron fijados en unidad de resolución. El voltaje de pulverización iónica se ajustó a 5000 V en el modo positivo. El detector del espectrómetro de masas (MS) se programó para grabar en dos modos consecutivos: EM mejorado (EMS, empleada para mostrar espectros de barrido completo) y el aumento de iones producto (EPI, patrón de fragmentación del ión o iones). La configuración de EMS y EPI fue: des-agrupación del potencial -41 V; Potencial de entrada de -7,5 V; energía de colisión -10 V. Los espectros se registraron en el modo de ión positivo entre m/z 100 y 1.000.

Las antocianinas fueron tentativamente identificadas mediante la comparación de sus tiempos de retención UV-VIS y MS (espectrofotómetro de masas) con los obtenidos a partir de los patrones y de los datos bibliográficos disponibles (biblioteca de compuestos y los datos encontrados en la literatura). Para el análisis cuantitativo, se utilizó una curva de

calibración para cada compuesto estándar disponible, en base a la señal de UV: cianidina-3-*O*-glucósido (y = 630,276x - 153,83; R^2 = 0,999) y Delfinidina-3-*O*-glucósido (y = 557,274x + 126.24; R^2 = 0,999). Los resultados se expresaron en mg por 100 g de porción comestible.

4.3.4. Color

La medida objetiva del color se ha realizado por el método de colorimetría triestímulo, basado en la iluminación de la muestra con dos rayos, de modo que el rayo reflejado pasa por unos filtros que imitan el ojo humano. Este método fue establecido por Kostyla y Clydesdale en 1978. El equipo utilizado ha sido un Colorímetro Hunter Color Flex, con las siguientes especificaciones: CIE iluminante C, 2º y geometría 45/0º. La lectura de la muestra se ha realizado en cubetas cilíndricas de vidrio de 5 cm de diámetro y 1,3 cm de altura.

El espacio CIELAB es un sistema coordenado cartesiano definido por tres coordenadas rectangulares colorimétricas que definen el color en el Hunter L*, a* y b* como magnitudes adimensionales. Los valores de L* (luminosidad / claridad) o índice fotométrico van de negro a blanco (0-100), y los parámetros a* y b*, o índices cromáticos oscilan entre rojo-verde (a*) y amarillo-azul (b*), que varían entre -100 y +100, y que permiten localizar el color en un plano (a,b) perpendicular al eje L, como se puede apreciar en la **Figura 4.7.** La coordenada a* define la desviación del punto acromático, correspondiente a la luminosidad, hacia el rojo si a* > 0, y hacia el verde si a* < 0. Análogamente la coordenada b* define la desviación hacia el amarillo si b* > 0 y hacia el azul si b* < 0 (Fernández-Ruiz *et al*., 2010).

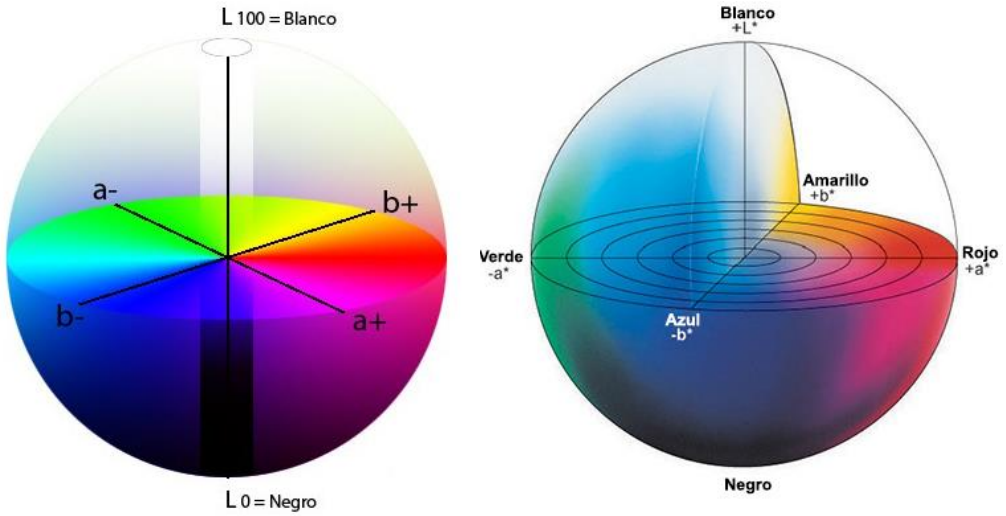


Figura 4.7. Gráfico de las coordenadas básicas de color (CIE, Commission internationale de l'éclairage)

A partir de las coordenadas a* y b* se definen dos magnitudes colorimétricas nuevas, *croma* o índice de saturación C* y *tono* (h; hue), mediante las siguientes expresiones:

Ecuación 4.1. C^*_{ab} = índice de saturación $(a^{*2}+b^{*2})^{½}$

Ecuación 4.2. $h_{ab}=\arctan(b^*/a^*)$

El croma, C^*_{ab} es el atributo de la percepción visual conforme al que un área parece saturada respecto a un determinado color o tonalidad. Tiene valor 0 para estímulos acromáticos, y, por lo general, no pasa de 150 aunque puede superar ese valor para determinados estímulos monocromáticos.

El tono, h_{ab}, es el color básico de un objeto (azul, amarillo, etc.) definido por su posición angular en un espacio de color cilíndrico. Los valores, por tanto, varían de 0º a 360º, y para estímulos acromáticos (a*=0, b=0) se trata de una magnitud no definida (**Figura 4.8**).

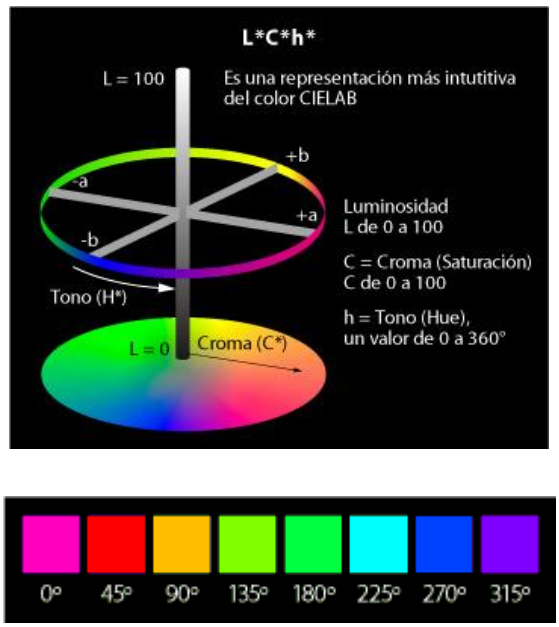


Figura 4.8. Gráfico de las coordenadas de color con los parámetros calculados C^*_{ab} y h_{ab}. Escala de colores aproximada para la definición de los ángulos del tono.

En las variedades de naranjas pigmentadas estudiadas, se llevó a cabo la determinación de color tanto de la pulpa tomando tres medidas consecutivas, como de la superficie de la piel en tres zonas perfectamente diferenciadas, la parte más oscura, la más clara y la base de la pieza de fruta fresca, con el objeto de tener un resultado más homogéneo.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE NARANJAS PIGMENTADAS

Parámetros físico-químicos

Los resultados correspondientes a la caracterización de las muestras objeto de estudio en cuanto a humedad, °Brix, acidez titulable, pH e índice de madurez, se muestran en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2. Parámetros físico-químicos evaluados en naranjas pigmentadas

Variedad	Lote	Humedad (g/100g)	pH	AT*	ºBrix	IM**
Sanguinelli	A	82,21 ± 0,75a	3,05 ± 0,01a	14,69 ± 0,23b	13,33 ± 0,15a	14,53 ± 0,65a
	B	87,49 ± 0,08c	3,52 ± 0,04c	13,65 ± 0,47a	14,33 ± 0,06b	16,42 ± 0,52b
	C	85,70 ± 0,06b	3,27 ± 0,01b	13,59 ± 0,52a	14,63 ± 0,06c	16,84 ± 0,62b
	Rango de Variación	**81,46 – 87,57**	**3,04 – 3,56**	**13,07 – 14,92**	**13,18 – 14,69**	**13,88 – 17,46**
T. Rosso	A	79,96 ± 0,22a	2,95 ± 0,01a	16,36 ± 0,06b	13,53 ± 0,21a	13,10 ± 0,48a
	B	85,76 ± 0,01b	3,52 ± 0,01c	13,73 ± 0,20a	13,77 ± 0,12a	15,48 ± 0,49b
	C	85,59 ± 0,17b	3,35 ± 0,01b	13,42 ± 0,34a	15,20 ± 0,10b	17,70 ± 0,34c
	Rango de Variación	**79,74 – 85,77**	**2,94 – 3,53**	**13,08 – 16,42**	**13,32 – 15,30**	**12,62 – 18,04**
T. 70	A	81,12 ± 0,27a	3,07 ± 0,02a	12,78 ± 0,23b	14,13 ± 0,06b	17,28 ± 0,27a
	B	87,46 ± 0,04c	3,75 ± 0,01c	11,27 ± 0,09a	12,63 ± 0,06a	18,91 ± 0,16b
	C	85,45 ± 0,11b	3,67 ± 0,02b	11,65 ± 0,29a	14,73 ± 0,12c	19,76 ± 0,68c
	Rango de Variación	**80,85 – 87,50**	**3,05 – 3,76**	**11,18 – 13,01**	**12,57 – 14,85**	**17,01 – 20,44**
T. 100	Único	89,29 ± 0,07	3,20 ± 0,01	13,88 ± 0,18	11,90 ± 0,10	13,49 ± 0,09

*AT: acidez titulable (mL NaOH 0,1 N/100 g); **IM (índice de madurez: ºBrix/Acidez titulable expresada en g/L de ácido cítrico). Resultados expresados como Media ± Desviación estándar n-1 (n=9) sobre 100 gramos de porción comestible

Los contenidos medios de **humedad** para las cuatro muestras de naranjas pigmentadas analizadas durante la temporada 2015, oscilan entre 79,74 a 87,57 g/100g de porción comestible. La variedad T. 100 mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al resto de variedades estudiadas, destacando por su elevado contenido de agua cercano al 90 %. Si bien, la humedad es un parámetro físico-químico que puede estar condicionado por las variaciones meteorológicas, periodos de sequía y de lluvia, calidad del suelo, a las que se ve sometido el cultivo de cítricos, los resultados obtenidos son esperables en este tipo de muestras expuestas a diferentes factores ambientales.

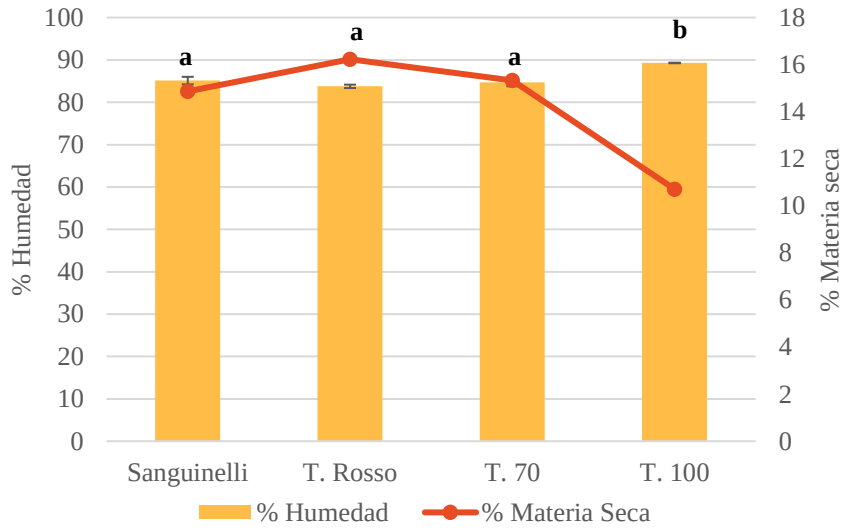


Figura 4.9. Contenido medio de humedad y materia seca (%) en las variedades de naranjas sanguinas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

El control del **pH y** la **acidez titulable (AT)** como parámetros de calidad, es importante ya que estos parámetros están relacionados con la estabilidad de los compuestos bioactivos presentes en las frutas (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006). (**Figura 4.10**). El rango de valores de pH en las muestras de naranjas pigmentadas estudiadas, está comprendido entre 2,95 y 3,67 (Tarocco Rosso y Tarocco T. 70, respectivamente; **Tabla 4.2**) destacando la variedad T. 70 por mostrar el valor más elevado para dicho parámetro.

Comparando estos resultados con los encontrados en la literatura, se observa que son similares a otras variedades naranjas pigmentadas como son la variedad Moro y T. Messina (3,44 y 3,70, respectivamente) ambas procedentes de Italia (Rapisarda *et al.*, 2008) y

variedades Moro y Sanguinello procedentes de Turquía (valores de pH 3,05 y 3,35, respectivamente; Kelebek *et al*., 2008).

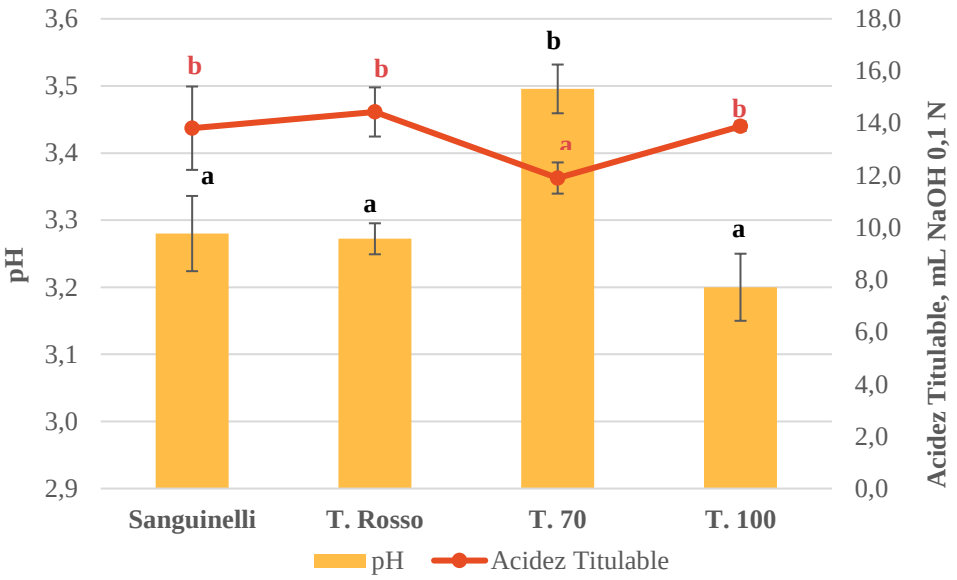


Figura 4.10. Valores medios de pH y acidez titulable en las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

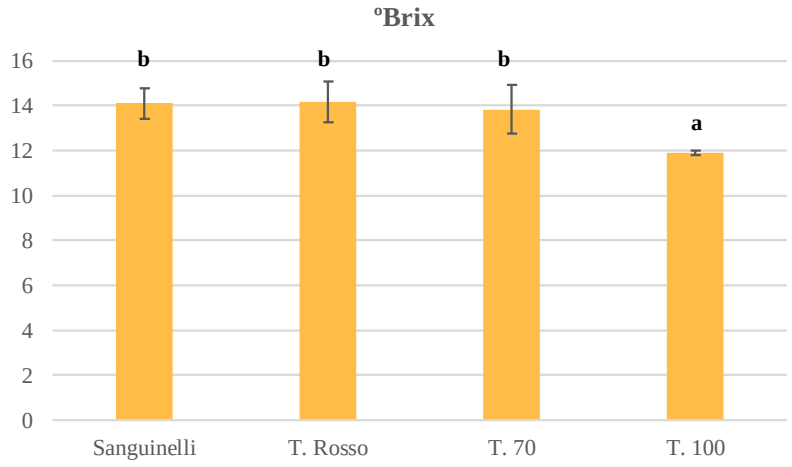


Figura 4.11. Valores medios de ºBrix en las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Como se observa en las **Figura 4.10** y **Figura 4.11**, destaca la variedad Tarocco T. 70 por presentar el valor más bajo de acidez y más alto de pH. En general, en el último momento

de recolección (lote C) se encontró el mayor contenido de **sólidos solubles** para todas las naranjas pigmentadas. Sin embargo, Sanguinelli, T. Rosso y Tarocco T. 70 mostraron valores similares y homogéneos en cuanto al contenido de sólidos solubles, a diferencia del Tarocco T. 100 que mostró el valor más bajo.

Estos datos son ligeramente superiores a los indicados por otros autores como Kelebek, (2008) para variedades similares a las estudiadas en el presente trabajo, como son Taroco Moro (12,0 ºBrix) y Sanguinello (12,6 ºBrix). Estas diferencias podrían deberse a que el contenido en sólidos solubles está íntimamente relacionado con el momento de recolección (estado de madurez) de las frutas, que a su vez depende en gran medida de las condiciones de cultivo y condiciones ambientales.

Por último y como cabría esperar, los valores del índice de madurez **(IM)**, calculado como °Brix/AT expresada en g de ácido cítrico por 100 mL, se ve incrementado entre los diferentes lotes analizados, en general y como cabría esperar, las muestras correspondientes al último momento de recolección (lote C) fueron las que mayores valores presentaron para este parámetro.

La **Figura 4.12** muestra los valores medios del índice de madurez para las cuatro muestras, destacando Tarocco T. 70 por presentar el más alto, a diferencia de Tarocco T. 100 que mostró el valor más bajo encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre estas variedades.

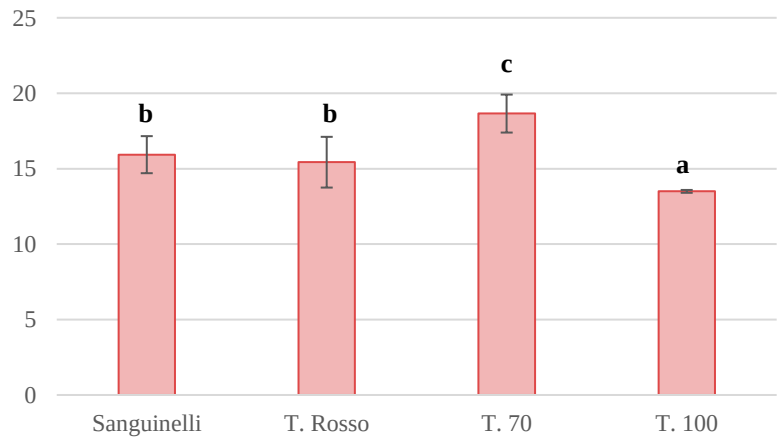


Figura 4.12. Índice de madurez en las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05), n=9

Vitamina C y Ácidos Orgánicos

Para la valoración del contenido de **Vitamina C** en las variedades de naranjas pigmentadas estudiadas, se determinó el contenido del ácido ascórbico y dehidroascórbico, si bien, las cantidades de ácido dehidroascórbico encontradas en las muestras fueron insignificantes (trazas) por lo que en la siguiente tabla (**Tabla 4.3**) se muestran únicamente los resultados correspondientes al ácido ascórbico.

En general en el lote C (muestras más maduras), se observaron las concentraciones más elevadas para todas las naranjas estudiadas, destacando la variedad Sanguinelli y Tarocco Rosso (66,70 mg/100g y 66,42 mg/100g, respectivamente).

Tabla 4.3. Contenido de Vitamina C (ácido ascórbico) presente en naranjas pigmentadas

MUESTRA	LOTES	Vitamina C
Sanguinelli	A	54,94 ± 0,08a
	B	56,05 ± 0,91a
	C	66,70 ± 0,56b
	Rango de Variación	**54,86 – 67,26**
Tarocco Rosso	A	59,11 ± 0,66a
	B	65,49 ± 0,35b
	C	66,42 ± 0,54b
	Rango de Variación	**58,45 – 66,96**
T. 70	A	57,32 ± 0,29b
	B	55,06 ± 0,34a
	C	59,17 ± 0,47c
	Rango de Variación	**54,72– 59,64**
T. 100	Único	55,24 ± 0,54

Resultados expresados como Media ± Desviación estándar (n-1), n=9 en mg/100g de porción comestible. En cada columna, las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre lotes para cada variedad

Las cuatro variedades de naranjas pigmentadas estudiadas presentaron un contenido en vitamina C en forma de ácido ascórbico similar al descrito por otros autores en este tipo de naranjas pigmentadas procedentes de Italia como son las variedades Tarocco y Moro, con valores comprendidos entre 53,3 y 66,9 mg/100 mL de zumo, respectivamente (Arena, *et al*., 2001) y T. Messina y T. Meli (55,37 − 64.77 mg/100 mL de zumo, respectivamente) resultados publicados por Rapisarda *et al*., (2008).

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio fueron muy superiores a los indicados por otros autores para otro tipo de naranja pigmentada como son Cara Cara y Moro Blood (34,24 − 31,83 mg/100g, respectivamente; Kafkas *et al*., 2009). Además, diversos estudios han descrito las propiedades de estos frutos, señalando la presencia en cantidad significativa de vitamina C (Rapisarda e Intelisano, 1996; Rapisarda *et al*., 1998; Rapisarda, *et al*., 2001).

En Estaos Unidos, la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) de vitamina C para adultos mayores de 19 años es de 90 mg/día (Trumbo *et al*., 2002). En este sentido, una pieza de cualquiera de las naranjas estudiadas (150 g) cubriría como mínimo el 90 % de estas IDR. Por otro lado, según el Comité Científico de Alimentación (SCF, UE), la Ingesta de Referencia para la Población (IRP) para el contenido de vitamina C es de 45 mg/día tanto en hombres como en mujeres, de modo que, según estos datos de referencia.

Si tenemos en cuenta los valores medios de vitamina C obtenidos para cada variedad y que una ración de naranja pigmentada corresponde aroximadamente a 150 g de porción comestible, una única pieza de cualquiera de las naranjas pigmentadas estudiadas, con un peso aproximado de 150 g, cubriría más del 100% de la IRP (**Figura 4.13**). En este sentido, T. Rosso destaca por presentar el contenido de vitamina C ligeramente superior al resto ($p <$ 0,05).

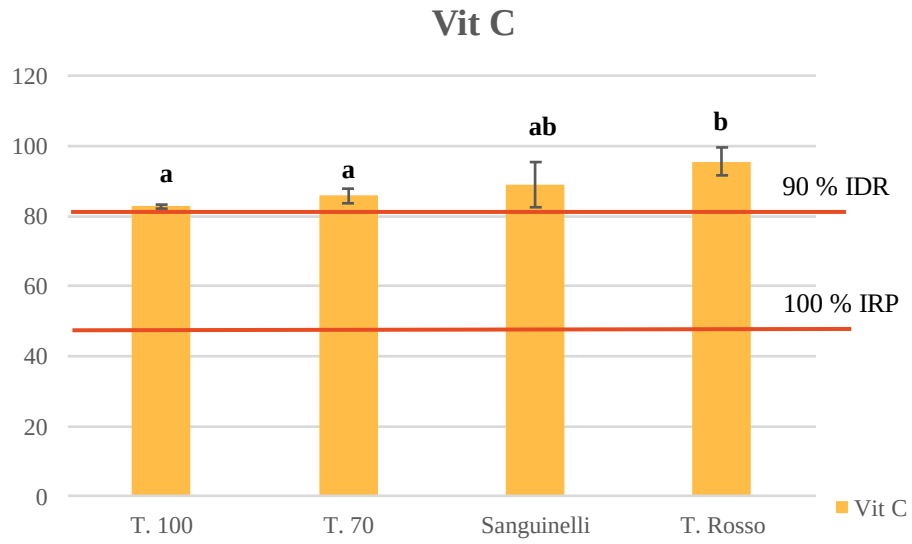


Figura 4.13. Contenido medio de vitamina C (mg/150g de porción comestible) en las naranjas pigmentadas estudiadas. IRP, Ingesta de referencia para la población (Unión Europea); IDR: Ingesta diaria de referencia (E.E.U.U.). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

De acuerdo con el Reglamento 1169/2011 de información al consumidor en relación al etiquetado de los alimentos, en el que se indica un valor de referencia de nutriente (VRN) de vitamina C de 80 mg/día, podemos afirmar que el consumo de 100 g de la porción comestible de estas naranjas sanguinas cubriría al menos 68 % de dichas recomendaciones, pudiendo en todos los casos promocionarse estas naranjas como **fuente natural de vitamina C**, al cubrir más del 15 % de dichas recomendaciones.

En relación a los **ácidos orgánicos,** compuestos imprescindibles para el normal funcionamiento del metabolismo en frutas, en las muestras objeto de estudio se identificaron los ácidos oxálico, tartárico, málico, ascórbico, cítrico y fumárico (**Tabla 4.4**).

Las naranjas pigmentadas destacaron por su elevado contenido en **ácido cítrico,** siendo éste el ácido orgánico mayoritario, con valores que oscilan entre 864,99 a 1.622,70 mg/100g, en T. 70 y Sanguinelli, respectivamente **(Tabla 4.4 y Figura 4.14),** observándose las mayores concentraciones especialmente en el momento de recolección más tardío, para todas las variedades estudiadas (1.037 y 1.622 mg/100g de porción comestible, variedades T. 100 y Sanguinelli, respectivamente), siendo la variedad T. Rosso la que mayor contenido medio presentó.

Tabla 4.4. Contenido de ácidos orgánicos en naranjas sanguinas (mg/100g sobre sustancia fresca)

Variedad	LOTES	Oxálico	Tartárico	Málico	Cítrico	Fumárico
Sanguinelli	**A**	6,28 ± 0,62a	48,96 ± 4,61a	137,84 ± 1,25a	1020,33 ± 7,03a	0,71± 0,03b
	B	21,29 ± 4,88b	72,67 ± 2,43b	132,25 ± 9,62a	1138,41 ± 49,07b	0,23 ± 0,02a
	C	8,50 ± 2,48a	92,44 ± 2,10c	126,28 ± 11,31a	1622,70 ± 83,09c	0,20 ± 0,03a
	Rango de variación	**5,66 – 26,17**	**44,35 – 94,54**	**114,97 – 139,09**	**1013.30 – 1705,79**	**0,17 – 0,74**
Tarocco Rosso	**A**	8,61 ± 0,84a	44,75 ± 3,47a	159,32 ± 2,94b	1236,82 ± 29,14a	0,52 ± 0,07
	B	10,57 ± 2,05a	68,95 ± 5,35b	78,92 ± 2,33a	1169,64 ± 56,29a	tr
	C	7,56 ± 0,34a	86,75 ± 6,81c	163,07 ± 8,28b	1592,82 ± 25,05b	0,17 ± 0,01
	Rango de variación	**7,22 – 12,62**	**41,28 – 93,56**	**76,59 – 171,35**	**1113,35 – 1617,87**	**tr – 0,59**
T. 70	**A**	17,38 ± 1,77a	35,88 ± 1,23a	122,89 ± 6,55a	979,38 ± 7,14b	0,64 ± 0,13b
	B	18,01 ± 7,81a	64,95 ± 2,45b	116,35 ± 15,83a	864,99 ± 10,17a	0,18 ± 0,11a
	C	15,45 ± 3,37a	89,01 ± 4,93c	241,52 ± 10,12b	1236,31 ± 26,26c	0,29 ± 0,05a
	Rango de variación	**12,08 – 25,82**	**34,65 – 93,94**	**100,52 – 251,64**	**854,82 – 1262,57**	**0,07 – 0,77**
T. 100	**Único**	6,46 ± 0,02	79,76 ± 1,57	171,25 ± 0,20	1037,34 ± 10,68	1,70 ± 0,09

tr: trazas (< 0,01 mg/100g ssf). Resultados expresados como Media ± Desviación estándar n-1 (n=9). En cada columna, las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre lotes para cada variedad

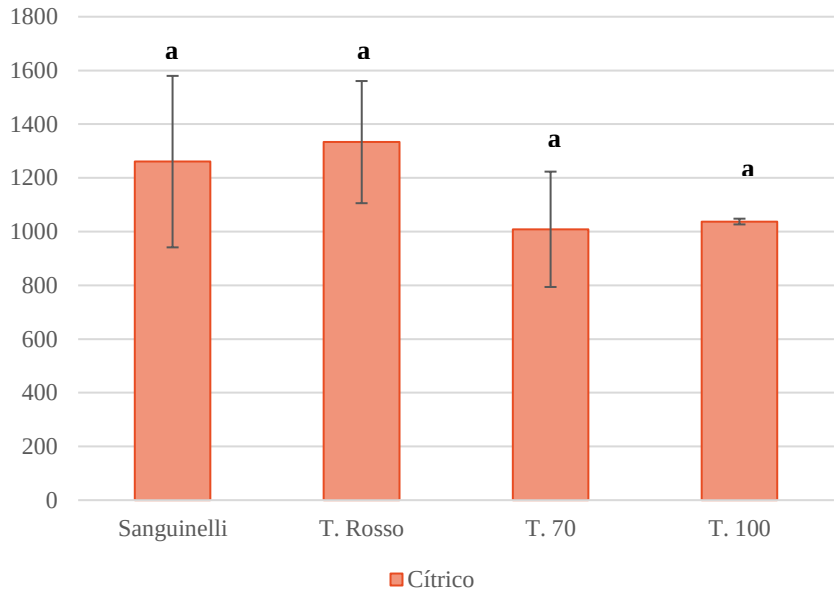


Figura 4.14. Contenido medio de ácido cítrico (mg/100g porción comestible) en las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

El ácido cítrico es el mayor responsable de la acidez de estas frutas, aportando alrededor del 80% a la acidez total (Ting *et al*., 1980). Lee *et al*., (1990) analizaron dos tipos de naranjas pigmentadas procedentes de E.E.U.U. (variedades *California* y *Florida*) en las cuales el porcentaje de ácido cítrico fue del 87 % y 76 % respectivamente, con respecto al total de ácidos orgánicos analizados. Otros autores, analizaron el contenido de ácido cítrico en variedades similares de naranjas pigmentadas, obteniendo valores de 1.130 y 1.340 mg/100 mL de zumo para Tarocco Moro y Sanguinello, respectivamente (Kelebek, 2008), datos que están en concordancia con los obtenidos en el presente estudio. Así mismo, dichos valores para el contenido de este ácido orgánico fueron muy superiores a otras variedades de naranjas pigmentadas analizadas por otros autores, como son las variedades Cara Cara y Moro Blood (421 − 561 mg/100 mL de zumo, respectivamente; Kafkas *et al*., 2009).

El siguiente ácido orgánico mayoritario fue el ácido málico, no observándose grandes diferencias entre variedades y siendo la variedad T. 70 la que mayores concentraciones presentó, con un rango de variación de 100,52 – 251,64 mg/100g. Le sigue el ácido tartárico con un rango de variación en las naranjas estudiadas de 34,6 – 94,5 mg/100g, en general no se observaron grandes diferencias entre variedades para este ácido orgánico, mostrando los mayores valores en el último momento de recolección (lote C).

Si bien el ácido cítrico es el ácido orgánico mayoritario, otros investigadores publicaron que, los ácidos málico y tartárico son los siguientes ácidos orgánicos mayoritarios en este tipo de frutas (Braverman., 1933; Vandercook, 1977). En este sentido, destacan los valores de ácido málico obtenidos en el presente estudio por ser superiores a los descritos por otros autores en otras naranjas pigmentadas como Cara Cara o naranja dulce W. Navel (72 − 82 mg de ácido málico / 100 mL de zumo respectivamente; Kafkas *et al*., 2011; Roussos, 2011), y más parecidos a otras naranjas pigmentadas como las mencionadas anteriormente *California* y *Florida* con valores que se encuentran entre 48 − 250 mg / 100 mL de zumo (Vandercook 1977; Lee *et al*., 1990).

En relación al resto de ácidos orgánicos, el ácido oxálico (**Tabla 4.4**) mostró valores bastante bajos, siendo la variedad T. 70 la que mayor concentración presentó (rango de variación: 12,08 – 25,82 mg/100g de porción comestible). Por último, el ácido fumárico fue el ácido orgánico minoritario en todas las naranjas pigmentadas. En este sentido, otros autores publicaron que los valores de ácido fumárico encontrados en este tipo de frutas cítricas también fueron muy bajos e incluso imposibles de cuantificar (Lee *et al*., 1990).

Contenido en carotenoides

El color de la pulpa de estas naranjas va desde el amarillo anaranjado hasta los rojizos más o menos intensos. Su coloración se debe mayoritariamente a su contenido en pigmentos carotenoides, y a la presencia de otros pigmentos hidrosolubles de naturaleza antociánica.

Tradicionalmente se ha considerado que los carotenoides mayoritarios en naranjas son violaxantina, anteraxantina, luteína, α − criptoxantina, β − criptoxantina, α − caroteno y β − caroteno, sin embargo, estudios más recientes han puesto de manifiesto que algunos de ellos no están presentes en él, sino que fueron erróneamente identificados (Meléndez-Martínez *et al*., 2005; 2008).

Aunque cada variedad tiene su perfil de carotenoides característico, éste se ve influenciado por una serie de factores como el proceso de maduración, el clima, la localización, etc. (Casas y Mallent, 1988). En el presente trabajo se han analizado dos de los principales carotenoides presentes en las naranjas pigmentadas, debido a sus efectos beneficiosos para la salud humana como son el β − caroteno y el licopeno (Cámara *et al*., 2006).

La siguiente **Figura 4.15** muestra el perfil de las cuatro muestras de naranjas pigmentadas estudiadas. En ella se observa una ausencia de pico a 502 nm (ausencia de licopeno) en estas naranjas pigmentadas analizadas en este estudio.

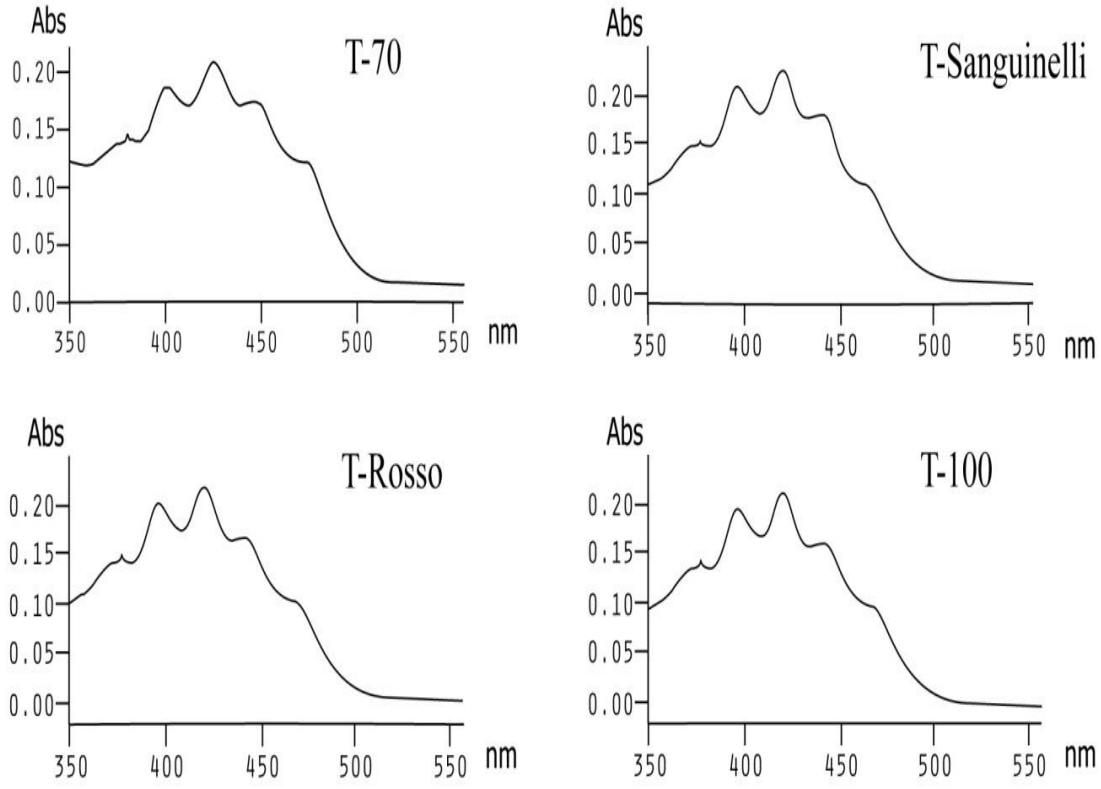


Figura 4.15. Espectros de Absorbancia UV-Visible del perfil de carotenoides identificados en las naranjas pigmentadas estudiadas

Trabajos realizados en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) de Valencia y en el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por Alquézar *et al*, 2009, indican la ausencia general del carotenoide licopeno en cítricos, tal y como se ha observado en el presente estudio. Sin embargo, la excepcional acumulación de licopeno en algunos cítricos se ha evidenciado en mutantes de naranja y pomelo, tal y como ocurre en la variedad Cara Cara, mutante de la naranja Navel (*Citrus Sinensis* L. Osbeck) (Alquézar *et al*., 2008) y la variedad Hong Anliu, mutante de Anliu (*Citrus Sinensis* L. Osbeck) (Liu *et al*., 2006), este último, derivado de los trabajos realizados por el Laboratorio Nacional de mejora genética de Cultivos, de la Universidad Agrícola de Huazhong y el Instituto de investigación de Cítricos, R.P. China.

Esta acumulación de licopeno también se da en diferentes variedades de pomelo (*Citrus Grandis* Osbeck; Alquézar *et al*., 2009; Lee, 2001; Xu *et al*., 2006).

Los resultados obtenidos en la cuantificación de β − caroteno se muestran en la **Tabla 4.5**. El contenido en β − caroteno es muy similar entre los diferentes lotes analizados para cada muestra estudiada, mostrando valores similares y homogéneos.

Tabla 4.5. Contenido de β − caroteno a una longitud de onda específica (λ 446 nm) de las naranjas pigmentadas estudiadas (mg/100g de porción comestible).

MUESTRA	Lote	β-caroteno (mg/100g)
Sanguinelli	A	0,418 ± 0,086a
	B	0,366 ± 0,022a
	C	0,381 ± 0,015a
	Rango de variación	**0,366 – 0,418**
Tarocco Rosso	A	0,295 ± 0,023a
	B	0,261 ± 0,082a
	C	0,386 ± 0,077a
	Rango de variación	**0,261 – 0,386**
T. 70	A	0,588 ± 0,055a
	B	0,487 ± 0,050a
	C	0,550 ± 0,035a
	Rango de variación	**0,487 – 0,588**
T. 100	**Único**	**0,248 ± 0,009**

Resultados expresados como Media ± Desviación estándar. En cada columna, las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre lotes para cada variedad.

De entre las naranjas estudiadas, destaca T. 70 (**Figura 4.16**) por presentar el valor medio más elevado (0,542 mg/100g), mientras que la variedad T. 100, fue la que menor contenido de β − caroteno presentó (0,248 mg/100g) encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre variedades.

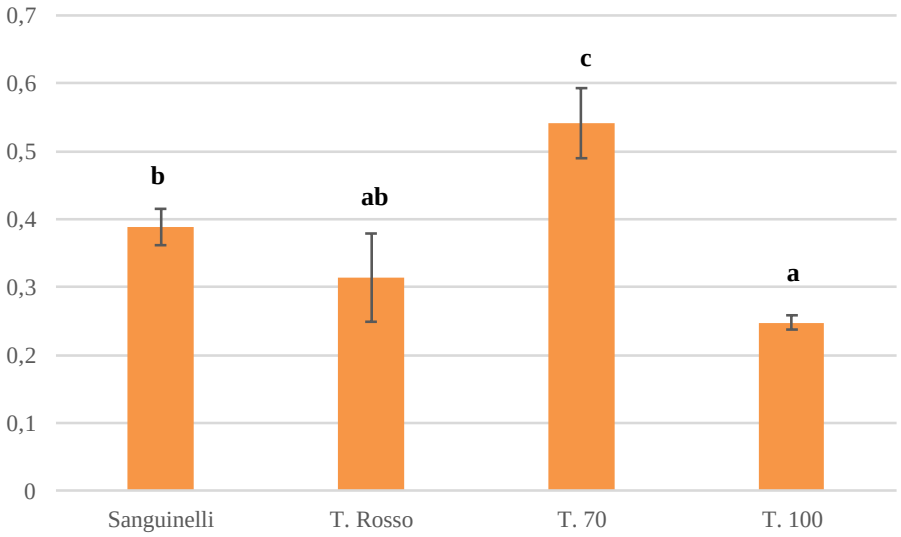


Figura 4.16. Contenido de medio de β-caroteno de las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p < 005), n=9.

La **Tabla 4.6** muestra los valores que aparecen en la literatura de dichos pigmentos carotenoides en diferentes frutos cítricos. Los valores de β − caroteno obtenido en el presente estudio son ligeramente superiores a los descritos por algunos autores como Xu *et al*. (2006) en naranjas sanguinas Cara Cara (mutante de Navel, *Citrus Sinensis* L. Osbeck) y superiores también a otros cítricos como Star Ruby (*Citrus Paradisi*) (Alquézar *et al*., 2009).

Las recomendaciones de consumo de Vitamina A varían mucho en función del país en el cual se informa de dichas recomendaciones. En E.E.U.U. se determina que la cantidad diaria recomendada (CDR) en 900 µg/día para hombres y 700 µg/día para mujeres (Trumbo *et al*., 2002). En España, se toman las Ingestas Recomendadas (IR) establecida en un valor de 1000 µg/día en hombres y 800 µg/día en mujeres (Moreiras *et al*, 2013). Por otro lado, el SCF (Unión Europea) determina una Ingesta de referencia para población de vitamina A (IRP) para hombres de 700 µg/día y para mujeres de 600 µg/día, mientras que según el Reglamento 1169/2011 (UE) establece un VRN en 800 µg/día para hombres y mujeres indistintamente.

La actividad de vitamina A se mide mediante Equivalentes de Retinol (ER), o más frecuentemente hoy en día como Equivalentes de Actividad Retinol (EAR), siendo 1 µg EAR = 1 µg de Retinol, equivalente a 12 µg de β-caroteno (Mahan *et al*., 2013).

Tabla 4.6. Contenido de β − caroteno y licopeno en literatura expresado en mg /100g de porción comestible.

Variedad Cítrico	β-caroteno mg/100 g ssf	Licopeno mg/100 g ssf	Referencia
Cara Cara (mutante *Citrus Sinensis*)	0,31 ± 0,01	2,19 ± 0,18	Xu *et al*., 2006
Hong Anliu (mutante *Citrus Sinensis*)	0,025 ± 0,001	2,28 ± 0,10	Liu *et al*., 2007
Red Navel (*Citrus Sinensis*)	0,10 ± 0,03	0,39 ± 0,10	Lee, 2001
Sanguinelli (*Citrus Sinensis*)	**0,036 ± 0,003**	**nd**	**Dhuique-Mayer *et al*., 2005**
Star Ruby (*Citrus Paradisi*)	0,24 ± 0,04	0,61 ± 0,09	Alquézar *et al*, 2009

nd: no detectado. Resultados expresados como Media ± Desviación estándar

En la **Figura 4.17** se muestra el porcentaje de aportación de vitamina A, teniendo en cuenta la actividad de vitamina A calculada tal y como se ha mencionado en el párrafo anterior y el Valor de Referencia de Nutriente (VRN) establecido por la Unión Europea en 800 μg/día. En dicha figura, se muestra el aporte de Vitamina A de las cuatro naranjas pigmentadas analizadas por porción comestible de 150 g, peso aproximado de una pieza de estas frutas, destacando la variedad T. 70 que cubre casi el 9 % de este VRN.

Dado que la cantidad de vitamina A presente en 150 g de estas muestras es inferior al 15 % del VRN, de acuerdo con el Reglamento (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor las muestras consideradas en este estudio **no pueden** ser publicitadas como "**fuente de vitamina A**".

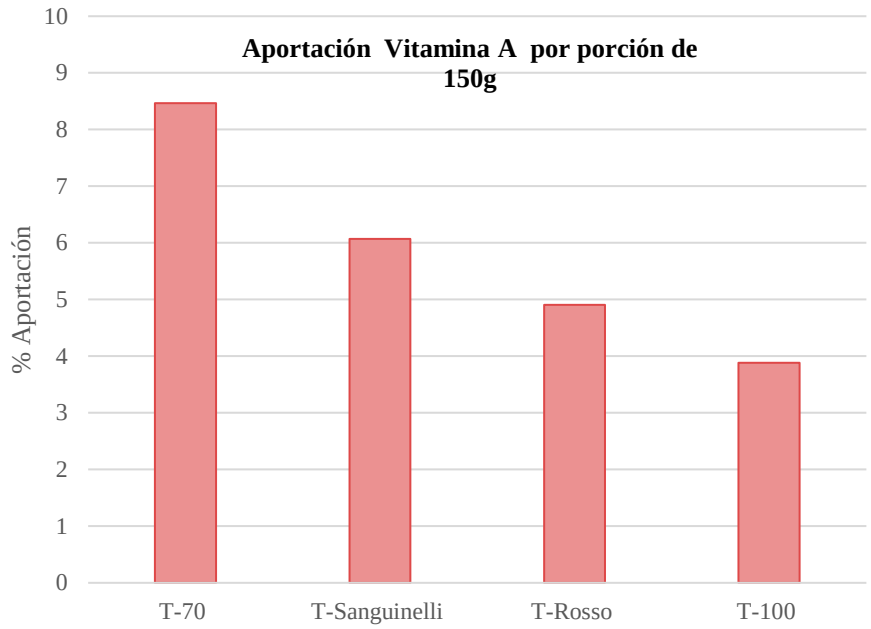


Figura 4.17. Aportación de Vitamina A por porción comestible de 150 g de las naranjas pigmentadas estudiadas. Valores de VRN de 800 µg/día.

Contenido en compuestos fenólicos: Flavonoides

Diversos estudios han descrito la composición de compuestos bioactivos de este tipo de naranjas entre los que se incluyen, ácidos hidroxicinámicos, hesperidina, narirutina y didimina (Rapisarda *et al*., 1999; Kelebek *et al*., 2008; Berhow *et al*., 1998) que confieren a estas variedades pigmentadas propiedades funcionales y biológicas muy interesantes (Rapisarda *et al*., 1999; Buscemi *et al*., 2012; Grosso *et al*., 2013; Barreca *et al*., 2014).

Los flavonoides identificados en las muestras objeto de estudio han sido: narirutina, hesperidina, naringina, didimina, quercetina y naringenina. En la **Figura 4.18** vemos un ejemplo de un perfil cromatográfico correspondiente a la muestra T. 70 donde podemos identificar los flavonoides presentes en esta naranja.

En la **Tabla 4.7** se muestran los resultados para los principales flavonoides identificados y cuantificados a partir de las diferentes curvas patrón empleadas. El flavonoide mayoritario en las naranjas estudiadas fue la hesperidina (con valores de 78 a 143 mg/100g, en T. Rosso y Sanguinelli, respectivamente), siendo las variedades Tarocco T. 70 y Sanguinelli las que mayor contenido presentaron (con rangos de variación de 99,9 a 119,0 mg/100g y 92,9 a 143

mg/100g, respectivamente). El siguiente flavonoide mayoritario fue la narirutina (37,0 – 93,0 mg/100g de porción comestible), destacando la variedad Tarocco T. 70 por presentar el contenido más elevado con respecto al resto de naranjas analizadas, presentando un rango de variación de 60,9 a 93,0 mg/100g. Otros autores para esta fruta (Botía *et al*., 1996; Peterson *et al*., 2006; Tripoli *et al*., 2007; Gattuso *et al*., 2007).

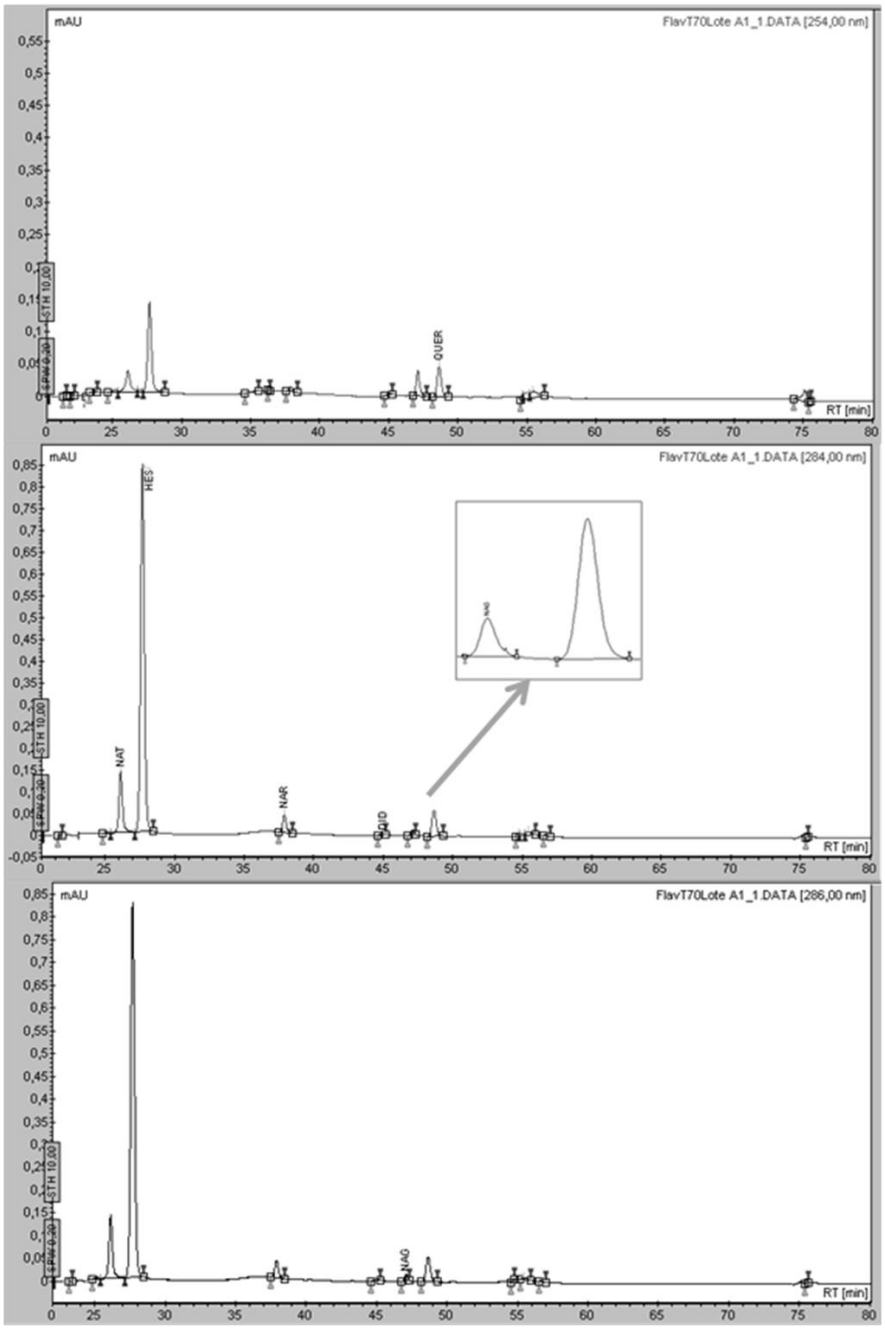


Figura 4.18. Ejemplo de un perfil cromatográfico para la variedad de naranja pigmentada T. 70, a diferentes longitudes de onda (λ= 254, 284 y 286 nm). NAT (narirutina), NAR (naringina), HES (hesperidina), DID (didimina), NAG (naringenina) y QUER (quercetina)

Tabla 4.7. Contenido de flavonoides mayoritarios presentes en naranjas pigmentadas (mg/100g por porción comestible).

Variedad	Lote	Narirutina (mg/100g)	Hesperidina (mg/100g)	Naringenina (mg/100g)	Quercetina (mg/100g)	Total flavonoides (mg/100g)
Sanguinelli	A	57,4 ± 1,0b	97,0 ± 4,1a	1,04 ± 0,0c	37,9 ± 1,4b	193,0 ± 6,0b
	B	60,4 ± 1,2c	140,0 ± 3,0c	0,94 ± 0,0b	40,0 ± 2,0b	241,0 ± 7,0c
	C	41,1 ± 4,1a	111,0 ± 2,0b	0,48 ± 0,1a	29,4 ± 1,3a	182,0 ± 1,0a
	Rango de variación	**37,0 – 65,6**	**92,9 – 143,0**	**0,47 – 1,04**	**28,1 – 42,0**	**181,0 – 248,0**
Tarocco Rosso	A	53,1 ± 2.0c	96,0 ± 2,1b	1,00 ± 0,4a	31,8 ± 0,4a	181,0 ± 0,0a
	B	41,0 ± 3,0a	100,0 ± 6,1b	1,42 ± 0,0b	36,0 ± 3,0b	178,0 ± 12,0a
	C	46,9 ± 0,7b	84,0 ± 6,0a	nd	35,9 ± 1,0b	166,0 ± 5,1a
	Rango de variación	**37,0 – 55,1**	**78,0 – 106,1**	**nd – 1,42**	**31,4 – 39,0**	**160,9 – 181,0**
T. 70	A	62,0 ± 1,1a	104,0 ± 4,1a	2,4 ± 0,3b	38,0 ± 3,0a	209,0 ± 9,0a
	B	91,0 ± 2,0c	116,0 ± 3,0b	1,08 ± 0,1a	38,8 ± 0,7a	258,0 ± 7,0b
	C	68,2 ± 0,4b	106,4 ± 0,5a	1,07 ± 0,1a	39,7 ± 0,5a	216,0 ± 1,0a
	Rango de variación	**60,9 – 93,0**	**99,9 – 119,0**	**1,06 – 2,07**	**35,0 –40,2**	**200,0 – 265,0**
T. 100	**Único**	77,0 ± 3,0	83,8 ± 0,8	0,605 ± 0,0	40,3 ± 1,4	201,0 ± 1,1

nd: No detectado. Resultados expresados como Media ± Desviación estándar n-1 (n=9). En cada columna, las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) entre lotes para cada variedad

Barreca *et al*., (2016), en un estudio realizado en naranjas pigmentadas Sanguinello y Tarocco presentaron un perfil similar al obtenido en el presente estudio, con la hesperidina como flavonoide mayoritario, obteniendo unos valores para Sanguinello y Tarocco de 42,6 y 10,6 mg/100 mL de zumo, respectivamente, seguido de narirutina con valores de 6,1 mg/100 mL de zumo para Sanguinello y 1,4 mg/100 mL en Tarocco. Dicho contenido en ambos flavonoides, son bastante inferiores a los obtenidos en las naranjas objeto de estudio.

La quercetina fue el siguiente flavonoide mayoritario en todas las variedades estudiadas (28,1 – 42 mg/100 g de porción comestible), siendo nuevamente la variedad Sanguinelli la que presentó el mayor contenido de este flavonol. Mientras que la naringenina fue el flavonoide minoritario en todas las variedades estudiadas.

Taroco T. 70 fue la variedad que presentó mayor contenido de flavonoides totales, mientras que T. Rosso fue la que presentó el menor valor, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tal y como se observa en la **Figura 4.19**.

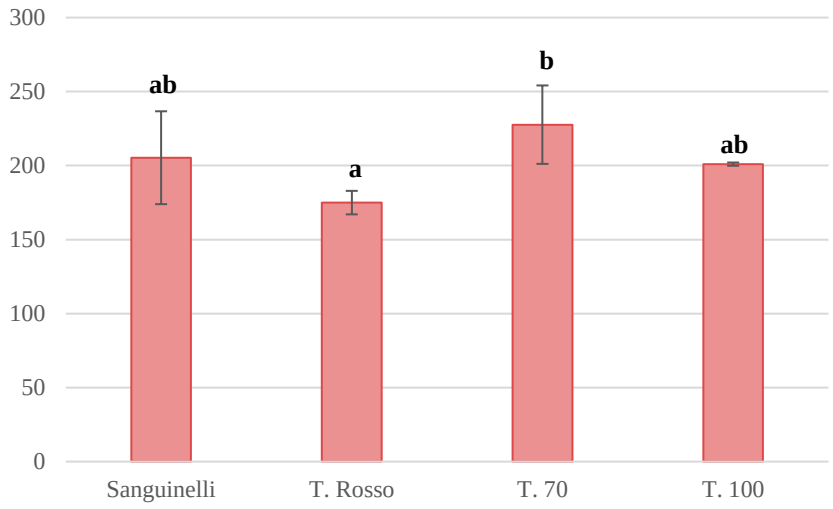


Figura 4.19. Contenido medio de flavonoides totales (mg/100 g de porción comestible) en las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, el contenido total de flavonoides fue superior al descrito por Lee, *et al*., (1990), los cuales indicaron valores para un tipo de naranja sanguina (*California*) de 68 - 88 mg / 100 mL de zumo. En general, el contenido total de flavonoides es superior al de otros cítricos como el pomelo (141 mg/100g según Igual *et al*., 2013).

Contenido de compuestos fenólicos: Antocianinas

Considerando que la acumulación de licopeno es inusual en este tipo de naranjas y que como se ha comentado anteriormente, este carotenoide no se ha identificado en ninguna de ellas, el color rojo que presentan se debe fundamentalmente a la presencia de compuestos antocianos hidrosolubles (Barreca *et al*, 2006), dándole tanto a la pulpa como a la corteza, o piel, una coloración rojiza (Rapisarda *et al*., 2001; Morillo *et al*., 2009).

La identificación tentativa de compuestos de antocianinas en las cuatro muestras de naranjas pigmentadas estudiadas en el presente estudio, se muestran en la **Tabla 4.8** donde se incluyen las características de los picos (tiempo de retención, longitud de onda máxima en la región visible (λmax), y datos espectrales de masas).

Se identificaron diez compuestos en todas las muestras, siete derivados de cianidina (los picos 2, 3, 5, 6, 7, 9 y 10) y tres derivados de delfinidinas (picos 1, 4 y 8). Los picos 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 9 fueron previamente identificados por otros autores en otras muestras de naranjas sanguinas (Lee *et al*., 2002, Dule *et al*., 2003, Kelebek *et al*., 2008, Destani *et al*., 2013, Fabroni *et al*., 2016).

Todos los compuestos se identificaron (**Figura 4.20**) de acuerdo con sus características espectrales de fragmentación de masas (iones moleculares y patrón de fragmentación), espectros de UV-visible junto con una identificación tentativa comparando estos datos con la información encontrada en la literatura. Por otro lado, los compuestos 5, 8 y 10, no han sido descritos previamente en la bibliografía en muestras de naranjas pigmentadas.

Tabla 4.8. Tiempo de retención (tR), longitudes de onda de máxima absorción en la región del UV-Visible (λ_{max}) pseudomoléculas (iones moleculares) y fragmentos MS^2 (entre paréntesis, abundancias relativas) e identificación tentativa de las antocianinas en las naranjas pigmentadas estudiadas

Pico	tR(min)	λ_{max} (nm)	Ión molecular $[M+H]^+$ (*m/z*)	MS^2 (*m/z*)	Identificación	Referencias usadas para la identificación
1	15.7	526	465	303(100)	Delfinidina 3-*O*-glucósido	Dugo *et al*., 2003 Hillebrand *et al*., 2004 Kelebek *et al*., 2008 Destani *et al*. 2013 Fabroni *et al*. 2016
2	16.0	526	611	287(100)	Cianidin 3-soforósido	Hillebrand *et al*., 2004 Fabroni *et al*. 2016
3	18.2	520	449	287(100)	Cianidin 3-glucósido	Lee *et al*., 2002 Dugo *et al*., 2003 Hillebrand *et al*., 2004 Kelebek *et al*., 2008 Fabroni *et al*. 2016
4	24.9	518	551	303(100)	Delfinidin 3-(6´´- malonil)glucósido	Dugo *et al*., 2003 Hillebrand *et al*., 2004 Kelebek *et al*., 2008 Destani *et al*. 2013 Fabroni *et al*. 2016
5	27.4	520	697	287(100)	Cianidin (malonil)diglucósido	MS; DAD
6	29.3	520	535	287(100)	Cianidin 3-(6´´-malonil)glucósido	Dugo *et al*., 2003 Hillebrand *et al*., 2004 Fabroni *et al*. 2016
7	31.3	522	593	287(100)	Cianidin 3-O-(6´´-dioxalil)glucósido	Dugo *et al*., 2003 Kelebek *et al*., 2008 Destani *et al*. 2013 Fabroni *et al*. 2016
8	33.6	526	449	303(100)	Delfinidin 3-ramnósido	MS;DAD
9	34.4	522	549	301(100)	Peonidin 3-(6´´-malonil)glucósido	Dugo *et al*., 2003 Hillebrand *et al*., 2004 Kelebek *et al*., 2008 Fabroni *et al*. 2016
10	35.4	518	679	287(100)	Cianidin malonil- (dioxalil)-hexósido	Dugo *et al*., 2003

Tabla 4.9. Cuantificación de antocianinas (mg/100g de porción comestible) de las naranjas pigmentadas estudiadas

	Sanguinelli			T. Rosso			T. 70			T. 100
Pico	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**	**A**	**B**	**C**	**Único**
1**	0,02 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,19 ± 0,01	tr	0,05 ± 0,00	0,09 ± 0,00	tr	0,30 ± 0,01	0,44 ± 0,03	tr
2*	0,29 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,45 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,40 ± 0,00	0,58 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,32 ± 0,02	1,15 ± 0,04	0,08 ± 0,00
3*	4,68 ± 0,01	2,90 ± 0,06	8,18 ± 0,04	2,32 ± 0,10	2,68 ± 0,07	3,85 ± 0,12	4,66 ± 0,11	3,82 ± 0,14	6,85 ± 0,13	0,38 ± 0,00
4**	0,11 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,42 ± 0,01	tr	0,11 ± 0,00	0,12 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,60 ± 0,05	0,01 ± 0,00
5*	0,34 ± 0,00	0,19 ± 0,00	0,45 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,43 ± 0,03	0,18 ± 0,01	0,58 ± 0,06	0,09 ± 0,00
6*	8,21 ± 0,00	4,21 ± 0,20	10,95 ± 0,24	2,75 ± 0,20	3,29 ± 0,17	4,65 ± 0,28	6,31 ± 0,37	4,19 ± 0,22	9,14 ± 0,37	0,71 ± 0,01
7*	0,78 ± 0,00	0,54 ± 0,02	1,20 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,56 ± 0,02	0,93 ± 0,06	0,66 ± 0,04	0,99 ± 0,07	0,15 ± 0,01
8**	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,00	0,27 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,48 ± 0,04	0,03 ± 0,00
9*	1,24 ± 0,00	0,67 ± 0,01	1,88 ± 0,00	0,40 ± 0,02	0,40 ± 0,00	0,69 ± 0,02	0,98 ± 0,03	0,61 ± 0,01	0,70 ± 0,06	0,13 ± 0,00
10*	0,99 ± 0,00	0,62 ± 0,01	1,27 ± 0,04	0,38 ± 0,02	0,47 ± 0,00	0,60 ± 0,04	0,98 ± 0,04	0,51 ± 0,01	0,90 ± 0,06	0,16 ± 0,00
Total	16,81 ± 0,01	9,70 ± 0,33	25,26 ± 0,23	6,95 ± 0,39	8,35 ± 0,24	11,58 ± 0,54	15,09 ± 0,73	11,01 ± 0,48	21,8 ± 0,90	1,74 ± 0,00
Rango de variación antocianinas totales	**8,67 – 25,49**			**6,56 – 12,12**			**10,53 – 22,70**			**1,74**

*tr: trazas (<0,01). Curvas de calibración: (*) cianidin-3-*O*-glucósido (y =630276x-153.83; R^2=0.999); (**) delfinidina (y =557274x +126.24; R^2=0.999).

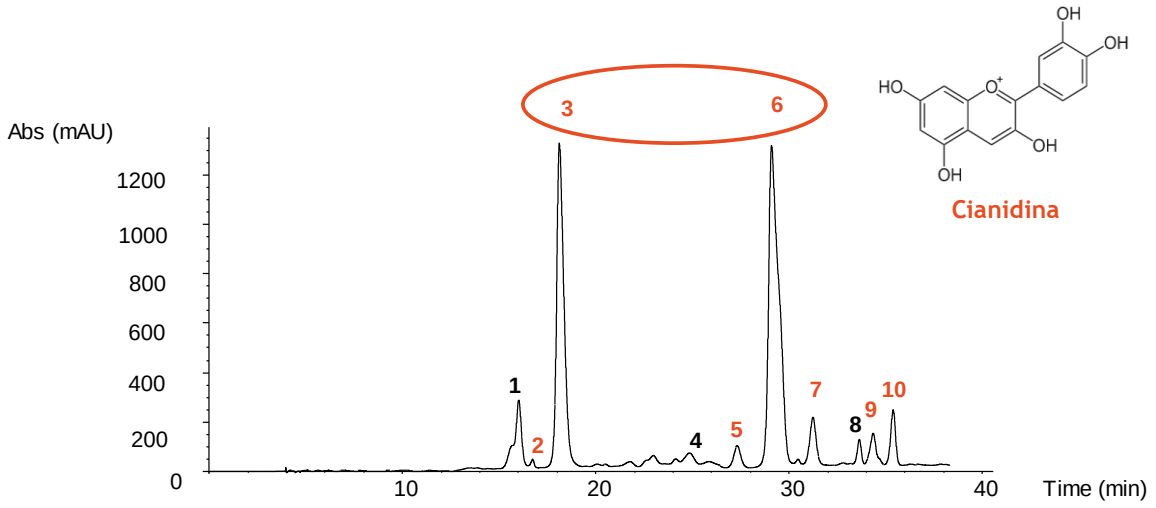


Figura 4.20. Ejemplo de un perfil cromatográfico correspondiente a la naranja pigmentada T. 70 a una longitud de onda de 520 nm. 1: Delfinidina 3-*O*-glucósido; 2: Cianidina 3-soforósido, 3: Cianidina-3-glucósido; 4: Delfinidina-3-(6´´-malonil) glucósido; 5: Cianidina (malonil) diglucósido; 6: Cianidina-3-(6´´-malonil) glucósido; 7: Cianidina-3-*O*-(6´´-dioxalil) glucósido; 8: Delfinidina 3-ramnósido; 9: Peonidina-3-(6´´-malonil) glucósido; 10: Cianidina malonil-(dioxalil)-hexósido.

El pico número **5** se identificó tentativamente como un (malonil) diglucósido de cianidina, presentando un ión pseudomolecular $[M + H]^-$ a m/z 697, liberando un fragmento MS^2 único a m/z 287 $[M + H\text{-}410]^-$, el cual podría corresponder a la pérdida conjunta sucesiva de un grupo malonil (-86 µm) y dos unidades glucósido (-324 µm).

El pico número **8** se identificó tentativamente como delfinidina-3-ramnósido, presentando un ión pseudomolecular $[M + H]^-$ en m/z 449 y un fragmento MS^2 único a m/z 303 (delfinidina aglicona) correspondiente a la pérdida de una unidad ramnósida $[M + H\text{-}146]^-$

El pico número **10** mostró un ión pseudomolecular $[M + H]^-$ a m/z 679 y un fragmento MS^2 a m/z 287 ($[M + H\text{-}392]^-$, que podría corresponder a la pérdida sucesiva de un malonil (-86 µm), dioxalil (-144 µm) y hexósido (-162 µm). Otros autores como Dugo *et al*. (2003) informaron sobre presencia de un compuesto similar en el zumo de naranjas pigmentadas, sin embargo, sólo identificaron la aglicona (cianidina), que se identificó provisionalmente como cianidin-malonil-(dioxalil)-hexósido.

La cuantificación correspondiente a los compuestos identificados se muestra en la **Tabla 4.9**. En general, Sanguinelli, T. Rosso y T. 70 mostraron los mayores valores en el último momento de recolección (Lote C) tanto el contenido individual de cada uno de los compuestos identificados, como en el contenido total de antocianinas.

Sanguinelli, T. Rosso y T. 70 mostraron valores similares y homogéneos en el contenido de antocianinas totales, mostrando todas ellas valores comprendidos en un rango de 6,56 – 25,49 mg/ 100g de porción comestible (**Figura 4.21**). Sin embargo, destaca T. 100, por ser la naranja que menor contenido de antocianinas totales presentó (1,74 mg/100g de porción comestible).

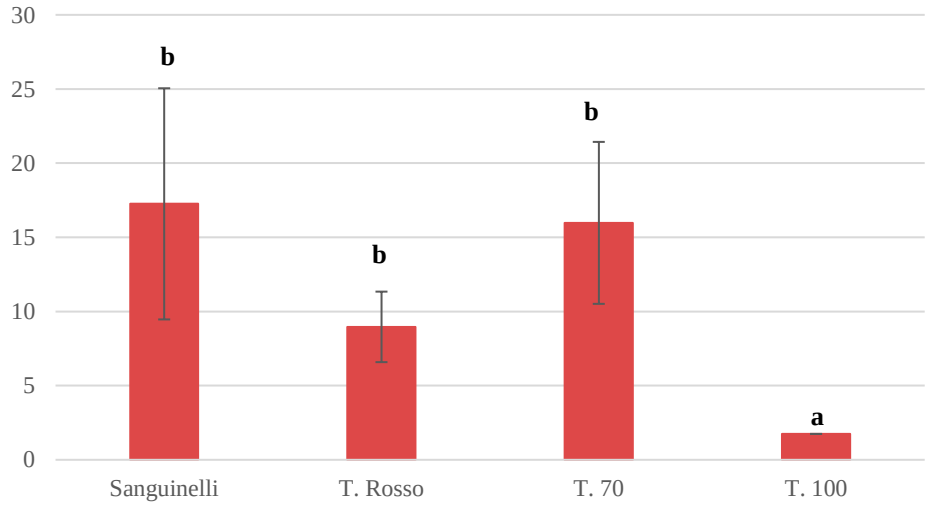


Figura 4.21. Contenido medio de antocianinas totales (mg/100g porción comestible) presente en las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

En todas las naranjas pigmentadas analizadas el pico más abundante fue el pico 6 (cianidina 3- (6"-malonil) glucósido), seguido del pico 3 (cianidina 3-glucósido). Como es lógico destacaron las tres naranjas Sanguinelli, T. Rosso y T. 70 por presentar el contenido más elevado de ambos compuestos, comprendidos en un rango de 2,55 – 11,19 mg/100g de porción comestible de cianidina 3- (6"-malonil) glucósido (compuesto mayoritario) y 2,22 – 8,22 mg/100 g de porción comestible de cianidina-3-glucósido (**Figura 4.22**).

Este perfil de antocianinas se corresponde con el descrito por otros autores para variedades similares (Tarocco y Sanguinelli) procedentes de Italia (Barreca *et al.*, 2016) y California

(Lee *et al*., 2002), también se corresponde con otras variedades de naranjas pigmentadas procedentes de China (Liang *et al*., 2011).

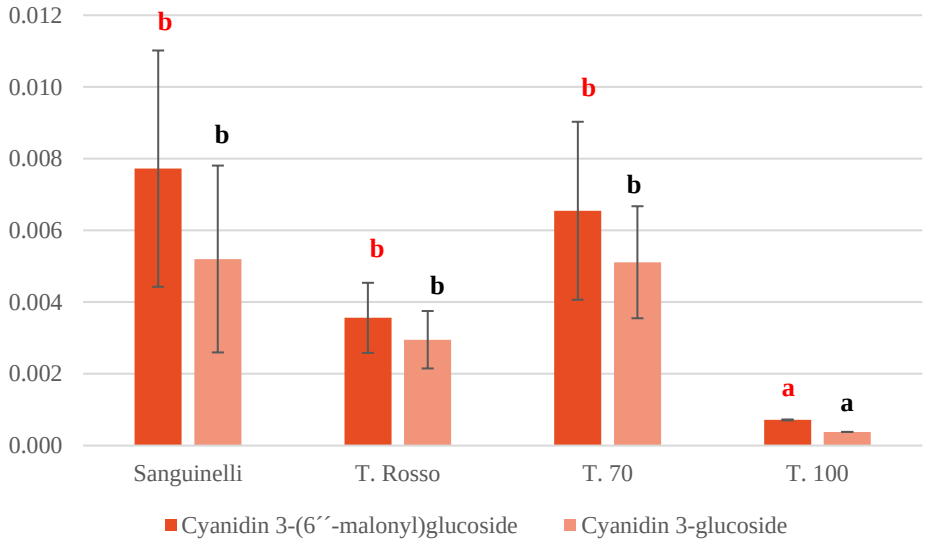


Figura 4.22. Contenido medio de antocianinas mayoritarias (mg/100g porción comestible) presente en las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Por otro lado, Barbagallo *et al*., (2002) publicaron un estudio en el que analizaron el contenido de antocianinas en Taroccos procedentes de Italia, los resultados de este estudio están en concordancia con los obtenidos en el presente trabajo (15,6 y 11,5 mg/100 mL de zumo).

Del mismo modo, Liang *et al*., (2011) realizaron un estudio también en taroccos procedentes de China, en el que ponían de manifiesto que las antocianinas mayoritarias en este tipo de frutas son cianidina 3- (6"-malonil) glucósido y cianidina 3-glucósido, tal y como se ha reflejado en el presente estudio (Shao-quian *et al*., 2010).

Como se ha podido observar a lo largo del presente capítulo, la descripción en la literatura de la composición química de naranjas pigmentadas ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. Además de los estudios ya mencionados, existen numerosos estudios no sólo sobre el perfil y contenidos en antocianinas (Maccarone *et al*., 1983, Maccarone *et al*., 1985a, 1985b), flavonoides (Barreca *et al*., 2016) y ácidos hidroxicinámicos (Fallico *et al*., 1996; Rapisarda *et al*., 1998).

Determinación del Color

El color es el primer atributo de percepción por los consumidores y uno de los parámetros más importantes de calidad en productos alimentarios de origen vegetal, ya que va ligado a la maduración, tratamiento tecnológico, presencia de impurezas, etc. El intenso color rojizo de las variedades de naranjas pigmentadas las convierte en un ingrediente muy atractivo para el consumidor actual, influyendo en su elección a la hora de escoger este tipo de frutos, no sólo por su apariencia sino también por su contenido en compuestos bioactivos antioxidantes como los carotenoides y antocianinas.

La caracterización colorimétrica de las naranjas pigmentadas estudiadas en el presente capítulo, se ha realizado mediante los parámetros CIELAB (L*, a*, b*, C^*_{ab} y h_{ab}), medidos en la pulpa homogeneizada, y en la piel, donde se realizaron tres medidas consecutivas de tres partes diferenciadas del fruto: clara, oscura y base.

En la **Figura 4.23** se muestra el aspecto visual de la pulpa de las variedades de naranjas sanguinas del último momento de recolección (Lote C).

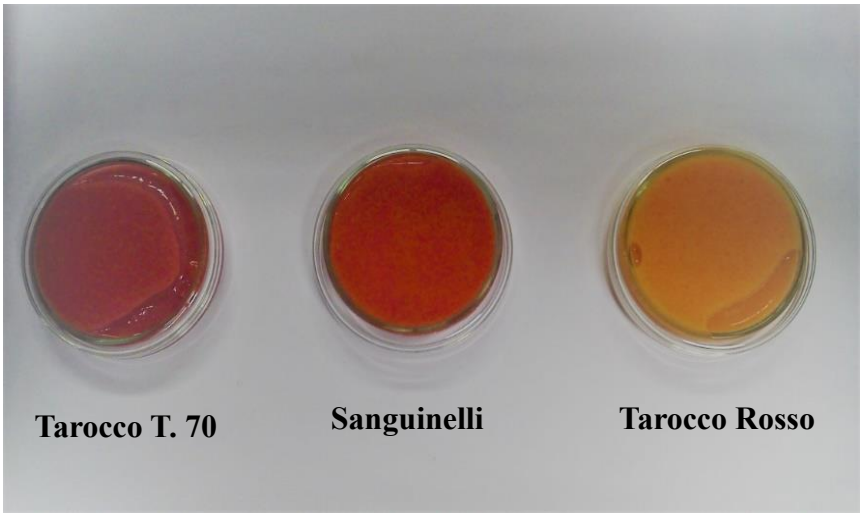


Figura 4.23. Aspecto visual de la pulpa de las naranjas pigmentadas estudiadas.

Tabla 4.10. Parámetros de color en la pulpa de diferentes variedades de naranjas sanguinas.

Variedad	Lote	L*	a*	b*	C*	h (hue)
T. 70	**A**	49,32 ± 2,62c	30,33 ± 0,18a	38,06 ± 0,02c	48,68 ± 3,87c	51,36 ± 1,61c
	B	41,64 ± 0,13b	32,07 ± 1,51b	25,49 ± 0,13b	40,28 ± 0,18b	39,25 ± 0,02b
	C	36,85 ± 0,02a	33,86 ± 0,02c	20,79 ± 0,04a	39,73 ± 0,02a	31,55 ± 0,06a
	Rango de variación	**36,85 – 49,32**	**30,33 – 33,86**	**20,79 – 38,06**	**39,73 – 48,68**	**31,55 – 51,36**
Sanguinelli	**A**	46,96 ± 1,30c	29,93 ± 0,10a	31,39 ± 0,03c	43,38 ± 0,61b	46,35 ± 0,92c
	B	41,29 ± 0,06b	32,85 ± 0,38b	28,42 ± 0,69b	43,44 ± 0,74b	40,86 ± 0,37b
	C	39,68 ± 0,04a	34,54 ± 0,07c	24,34 ± 0,04a	42,25 ± 0,05a	35,18 ± 0,09a
	Rango de variación	**39,68 – 46,96**	**29,93 – 34,54**	**24,34 – 31,39**	**42,25 – 43,44**	**35,18 – 46,35**
Tarocco Rosso	**A**	56,14 ± 0,02c	20,70 ± 0,93a	44,96 ± 0,02b	49,49 ± 0,02b	65,28 ± 0,02c
	B	49,65 ± 0,01a	26,93 ± 0,01c	39,03 ± 0,07a	47,42 ± 0,06a	55,40 ± 0,05a
	C	53,52 ± 0,03b	23,33 ± 0,02b	45,24 ± 0,12c	50,90 ± 0,12c	62,71 ± 0,04b
	Rango de variación	**49,65 – 58,14**	**20,70 – 26,93**	**39,03 – 45,24**	**47,42 – 49,49**	**55,40 – 65,28**
T. 100	**Único**	54,02 ± 0,05	19,71 ± 0,02	50,92 ± 0,08	54,60 ± 0,07	68,84 ± 0,04

Resultados expresados como Media ± desviación estándar. Diferentes letras en una misma columna para cada variedad, indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$)

Todas las muestras estudiadas tuvieron valores positivos de a* y b*, tanto para la pulpa como para la piel, situándose en la zona de amarillo-anaranjados-rojizos. Se observó un parámetro a* alto y positivo, indicando que se acerca al color rojo y se aleja del color verde; y un parámetro b* alto y positivo situándose más cerca del color amarillo que del color azul, como era de esperar en estas muestras de naranja. Respecto al estudio del color en la pulpa, el análisis de la varianza, mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para los parámetros CIELAB entre los diferentes lotes (**Tabla 4.10**).

Del mismo modo, la comparación entre las distintas variedades estudiadas (**Figura 4.24**), según el análisis de la varianza (ANOVA) realizado, mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). Tanto los valores de a* como los valores de b* fueron similares entre las variedades Sanguinelli y Tarocco T. 70, y éstos a su vez diferentes con respecto a los otros dos taroccos estudiados Tarocco Rosso y Tarocco T. 100.

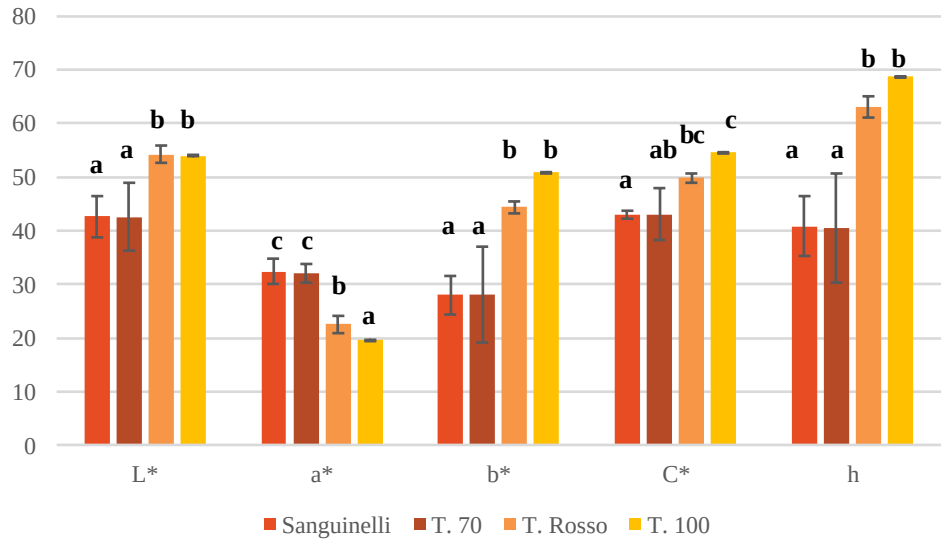


Figura 4.24. Parámetros de color (valores medios) en la pulpa de las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0,05), n=9

Las muestras Sanguinelli y Tarocco T. 70, presentaron un parámetro a* significativamente mayor, lo cual indica una coloración más rojiza que los otros dos taroccos estudiados (T. Rosso y T. 100), mientras que en T. Rosso y T. 100 el parámetro b* fue significativamente mayor, lo cual significa que estas dos muestras mostraron una coloración más amarillo-anaranjada. Estas diferencias en la pigmentación de la pulpa, pueden deberse a varios factores, la variedad, tipo de suelo, clima, condiciones meteorológicas de la campaña, etc.

Por ejemplo, veranos cálidos seguidos de inviernos fríos producen frutos de pigmentación más intensa, además la escasez de lluvias incrementa el contenido en estos pigmentos (antocianinas y carotenoides), debido principalmente a la influencia de las condiciones de estrés hídrico sobre las rutas biosintéticas de estos compuestos (Merodio y Escribano, 2003).

Del mismo modo, en los dos taroccos (T. Rosso y T. 100) la luminosidad o claridad (L*) mostró un comportamiento similar al parámetro b* como cabría esperar, es decir, fue mayor puesto que se trata de las dos naranjas con color amarillo anaranjado, y menor en Sanguinelli y T. 70, las dos variedades más rojizas en su pulpa. Por su parte, el croma, o índice de saturación C*, obtuvo el valor más elevado para el tarocco T. 100 (coloración más tenue), a diferencia de Sanguinelli que tuvo el valor más bajo, lo que indicaría que Sanguinelli, junto con tarocco T. 70 presentaron los colores más vivos.

Por último, Sanguinelli y tarocco T. 70 presentaron los valores más bajos del tono (h), al igual que la luminosidad, es decir, más cercanos al rojo según la escala de grados de color, mientras que T. Rosso y T. 100 están más próximos al color amarillo anaranjado, mostrando los valores más altos para este parámetro.

Por tanto, a la vista de los resultados podemos concluir que Sanguinelli y T. 70 fueron las variedades que presentaron una coloración más rojiza en su pulpa (mayor a* y menor b*), con los colores más vivos (mayor C*). Mientras que los taroccos T. Rosso y T. 100 fueron las que presentaron una coloración más amarillo anaranjada (mayor b* y menor a*), con una mayor luminosidad (L*). El análisis de las coordenadas de color CIELAB (L*, a*, b*, C* y h) puede ser un buen método para determinar el contenido total de carotenoides y otros pigmentos como las antocianinas que presentan estas frutas, puesto que tiene la ventaja de que los compuestos no tienen que ser extraídos, por lo que la evaluación es más rápida y los riesgos de degradación y/o formación de contaminantes se minimizan (Meléndez-Martínez *et al*., 2011).

Por otro lado, la determinación del **color de la piel** de la fruta fresca de las cuatro muestras de naranjas pigmentadas analizadas, presentó valores superiores a los obtenidos en el análisis de la pulpa para todos los parámetros analizados. La **Tabla 4.11** muestra todos los valores obtenidos para las diferentes partes del fruto, y los diferentes lotes analizados.

Tabla 4.11. Determinación del color de la piel de diferentes variedades de naranjas sanguinas.

Variedad/Lote	Parte del fruto	Parámetros				
T. 70		**L***	**a***	**b***	**C***	**h (hue)**
Lote A	**Clara**	60,37 ± 5,62	33,41 ± 1,46	54,74 ± 10,15	64,34 ± 8,05	58,14 ± 5,64
	Oscura	48,37 ± 4,71	36,26 ± 1,08	36,24 ± 6,89	51,45 ± 4,54	44,66 ± 5,81
	Base	59,87 ± 0,76	34,55 ± 1,86	53,56 ± 0,80	63,75 ± 0,67	57,18 ± 1,72
Lote B	**Clara**	61,95 ± 5,53	34,30 ± 5,04	59,23 ± 8,01	68,76 ± 5,08	59,64 ± 6,65
	Oscura	54,69 ± 9,27	34,44 ± 2,44	45,39 ± 16,59	57,74 ± 12,2	51,26 ± 11,07
	Base	57,83 ± 3,63	37,03 ± 1,30	53,19 ± 5,75	64,84 ± 5,36	55,04 ± 2,16
Lote C	**Clara**	51,51 ± 5,93	37,34 ± 1,76	40,95 ± 9,01	55,74 ± 5,60	47,15 ± 7,43
	Oscura	56,05 ± 8,87	36,55 ± 1,91	47,61 ± 11,98	60,46 ± 8,25	51,71 ± 8,71
	Base	60,47 ± 3,28	33,80 ± 3,33	55,75 ± 3,49	65,29 ± 1,89	58,73 ± 3,87
Sanguinelli		**L***	**a***	**b***	**C***	**h (hue)**
Lote A	**Clara**	59,09 ± 7,98	33,01 ± 1,59	53,41 ± 13,67	63,11 ± 11,36	57,39 ± 7,53
	Oscura	57,87 ± 4,11	32,93 ± 1,52	51,38 ± 7,44	61,08 ± 7,01	57,15 ± 2,67
	Base	61,81 ± 3,01	32,00 ± 1,62	56,98 ± 4,31	65,40 ± 3,60	60,61 ± 2,51
Lote B	**Clara**	52,86 ± 1,22	34,67 ± 0,23	44,69 ± 1,61	56,57 ± 1,37	52,18 ± 0,90
	Oscura	44,99 ± 6,62	32,79 ± 3,09	30,90 ± 10,13	45,25 ± 9,26	42,44 ± 6,34
	Base	46,01 ± 1,21	32,37 ± 0,53	34,85 ± 1,15	47,57 ± 1,20	47,11 ± 0,48
Lote C	**Clara**	57,90 ± 10,22	30,91 ± 3,75	51,73 ± 15,20	60,89 ± 11,41	57,86 ± 10,23
	Oscura	41,91 ± 4,24	30,07 ± 2,09	26,06 ± 7,04	39,92 ± 6,13	40,30 ± 5,93
	Base	43,21 ± 6,14	32,13 ± 2,41	29,89 ± 10,84	44,16 ± 9,26	41,87 ± 7,63
Tarocco Rosso		**L***	**a***	**b***	**C***	**h (hue)**
Lote A	**Clara**	62,06 ± 6,49	34,64 ± 4,26	57,07 ± 7,35	67,02 ± 4,50	58,50 ± 6,06
	Oscura	55,06 ± 4,95	34,38 ± 1,83	46,36 ± 7,35	57,90 ± 5,15	53,13 ± 5,38
	Base	62,91 ± 2,35	32,88 ± 1,22	58,64 ± 3,56	67,26 ± 2,61	60,66 ± 2,30
Lote B	**Clara**	50,19 ± 4,70	35,61 ± 3,02	41,26 ± 7,62	54,60 ± 7,20	48,92 ± 4,02
	Oscura	50,39 ± 1,27	38,20 ± 1,25	41,58 ± 2,42	56,50 ± 1,03	47,40 ± 2,56
	Base	58,38 ± 3,22	35,54 ± 2,37	54,87 ± 6,77	65,45 ± 6,01	56,92 ± 3,35
Lote C	**Clara**	59,35 ± 4,74	33,60 ± 2,84	53,44 ± 5,92	63,27 ± 3,80	57,66 ± 10,23
	Oscura	49,10 ± 3,31	35,67 ± 1,91	38,16 ± 4,01	52,34 ± 1,71	46,84 ± 5,93
	Base	60,58 ± 3,42	35,78 ± 2,60	57,25 ± 4,87	67,61 ± 3,32	57,90 ± 7,63
T. 100		**L***	**a***	**b***	**C***	**h (hue)**
Lote Único	**Clara**	65,22 ± 9,71	23,79 ± 5,05	65,57 ± 12,88	69,82 ± 13,26	69,92 ± 3,13
	Oscura	63,97 ± 8,63	27,52 ± 6,75	62,60 ± 10,13	68,41 ± 11,96	66,50 ± 2,12
	Base	63,42 ± 8,18	26,94 ± 6,28	62,74 ± 10,23	68,29 ± 11,85	66,95 ± 1,71

Parámetros CIELAB: L*, a*, b*, C*: Croma y h: Tono. Resultados expresados como Media ± desviación estándar.

Al igual que en la pulpa, todas las naranjas presentaron valores positivos de a* y b*, situándose en la zona de los amarillos, anaranjados y rojizos en su coloración externa.

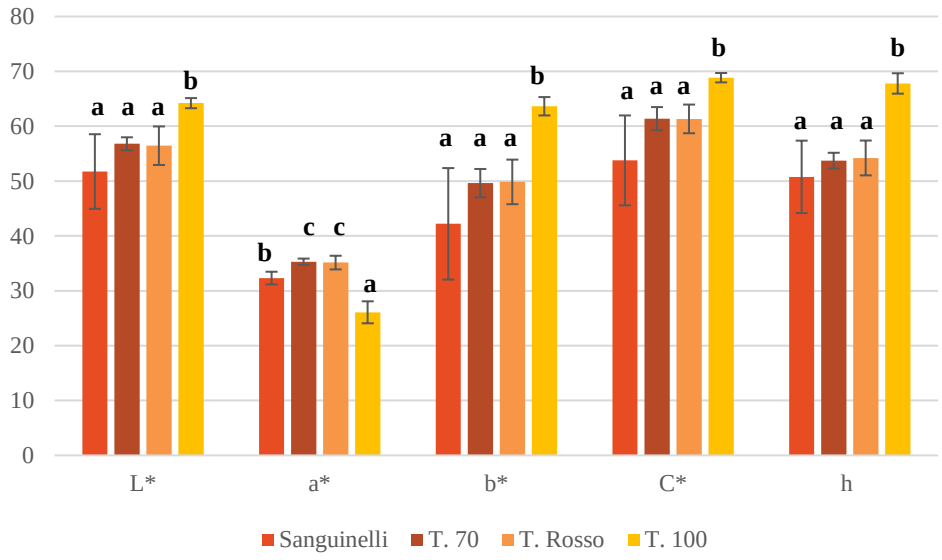


Figura 4.25. Valores medios de los parámetros de color en la piel de las naranjas pigmentadas estudiadas. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), n=9

Tarocco T. 100 mostró el parámetro a* significativamente más bajo, lo cual indicaría que su piel tiende a una coloración menos rojiza, a diferencia de las otras naranjas estudiadas que mostraron valores más elevados, y por consiguiente coloración externa más rojiza. Por el contrario, el resto de los parámetros analizados (b*, L*, C* y h) fueron significativamente más altos en esta variedad, mostrando una coloración con tendencia al amarillo anaranjado, por tanto, una coloración más clara, a diferencia de las otras naranjas estudiadas, que presentaron valores similares y homogéneos para este parámetro, mostrando coloración externa menos anaranjada y más rojiza.

Por su parte, el resto de las naranjas pigmentadas (Sanguinelli, T. Rosso y T. 70) presentaron valores similares y homogéneos para todos los parámetros estudiados, a excepción de Sanguinelli la cual presentó un parámetro a* significativamente más bajo con respecto a los otros dos taroccos estudiados (T. Rosso y T. 70), lo cual indicaría una coloración menos rojiza en su piel.

En general, los parámetros de color obtenidos muestran variaciones, pero sin desviarse de los valores referenciados por otros autores para otras variedades de cítricos (Choia *et al,* 2002). Dicha variación puede deberse a las características del producto, a la variedad seleccionada y a su momento de recolección.

A la vista de los resultados obtenidos, se deduce que no existe una relación entre la coloración externa e interna de estas naranjas, pudiendo encontrar naranjas con una coloración más rojiza en su piel, y sin embargo una pulpa más amarillo-anaranjado, como ocurre en el caso de T. Rosso. El color que toman la corteza y pulpa no es uniforme, y no siempre se corresponde una zona pigmentada de la corteza con pulpa roja, la zona más coloreada suele aparecer en la parte del fruto con orientación norte (Pérez, 2004).

Estudio de correlaciones entre el contenido de carotenoides, antocianinas y la medida del color

Con el fin de valorar si los parámetros de color seleccionados son valores predictivos del contenido en pigmentos de las muestras analiazadas se ha realizado el estudio de correlaciones entre los diferentes parámetros CIELAB analizados (L*, a*, b*, C* y h) de la pulpa, y el contenido en pigmentos, carotenoides y antocianinas (**Tabla 4.12**).

El estudio de correlaciones muestra que todos los parámetros de color están fuertemente correlacionados con el contenido de antocianinas totales y contenido de β-caroteno de la pulpa. El parámetro a* mostró correlación positiva con el contenido de estos compuestos tal y como como cabría esperar puesto que este parámetro es el que mide la intensidad del color anaranjado - rojizo, color característico de estos pigmentos.

Por otro lado, los parámetros L*, b*, el croma C* y h, muestran una fuerte correlación negativa con el contenido total de β-caroteno y antocianinas, de modo que que una mayor coloración con tendencia al amarillo y más alejados del rojizo, junto con colores más vivos y claros, son indicativo de un menor contenido de estos compuestos. La única diferencia encontrada fue que el β-caroteno no mostró correlación significativa con el parámetro C*.

Tabla 4.12. Matriz de correlaciones de los distintos parámetros analizados en la pulpa de las naranjas pigmentadas estudiadas.

	L*	**a***	**b***	**C***	**h (hue)**	**β-carot**	**AnT**
L*	**1,0000**						
	0,0000						
a*	-0,8502	**1,0000**					
	0,0000	**0,0000**				n=30	
b*	0,9655	-0,8435	**1,0000**				
	0,0000	**0,0000**	**0,0000**				
C*	0,8792	-0,6664	0,9547	**1,0000**			
	0,0000	**0,0001**	**0,0000**	**0,0000**			
h (hue)	0,9710	-0,9296	0,9776	0,8720	**1,0000**		
	0,0000	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**		
β-carot	-0,4228	0,6130	-0,4528	-0,3216	-0,5338	**1,0000**	
	0,0199	**0,0003**	**0,0120**	0,0831	**0,0024**	**0,0000**	
AnT	-0,7052	0,7097	-0,7621	-0,7037	-0,7639	0,4791	**1,0000**
	0,0000	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0000**	**0,0074**	**0,0000**

Parámetros de color CIELAB de la pulpa (L*, a*, b*, C*); β-carot: β-caroteno; AnT: Antocianinas totales

4.5. CONCLUSIONES PARCIALES

Los principales aspectos a destacar de la **caracterización** de las naranjas pigmentadas (*Citrus sinensis* L. cv. Sanguinelli; *Citrus sinensis* L. cv. Tarocco) son los siguientes:

1. El contenido medio de **humedad** osciló entre 79,74 - 87,57 g/100g de porción comestible. La variedad Tarocco T. 100 destacó por presentar elevados contenidos próximos al 90% mostrando diferencias estadísticamente significativas con respecto al resto de variedades estudiadas.
2. Sanguinelli, T. Rosso y Tarocco T. 70 mostraron valores similares y homogéneos en cuanto al contenido de sólidos solubles (ºBrix 12,57 – 15,30). Además T. 70 presentó el índice de madurez más alto (17,01 – 20,44), debido principalmente a su baja acidez titulable y elevado pH.
3. Las naranjas pigmentadas Sanguinelli y Tarocco Rosso destacaron por presentar los contenidos más altos de vitamina C (66,70 mg/100g y 66,42 mg ácido ascórbico/100 g, respectivamente). De acuerdo con el Reglamento (UE) 1169/2011 de información al consumidor en relación al etiquetado de los alimentos, el cual indica un valor de referencia de nutriente (VRN) de 80 mg/día, podemos afirmar que el consumo de una sola pieza de estas naranjas pigmentadas (150 gramos) cubriría el 100% de dichas recomendaciones, pudiendo en todos los casos promocionarse estas naranjas como **fuente natural de vitamina C**, al cubrir más del 15% de dichas recomendaciones.
4. En relación a los **ácidos orgánicos,** se identificaron los ácidos oxálico, tartárico, málico, ascórbico, cítrico y fumárico. Todas las naranjas pigmentadas destacaron por su elevado contenido en **ácido cítrico,** siendo éste el ácido orgánico mayoritario, con valores entre 864,99 a 1.622,70 mg/100g, en T. 70 y Sanguinelli, respectivamente considerándose el mayor responsable de la acidez de estas frutas.
5. El contenido de β - caroteno osciló entre 0,25 y 0,59 mg/100 g de porción comestible, destacando T. 70 por presentar el valor medio más elevado (0,542 mg/100 g). El VRN para la vitamina A está establecido en 800 μg/día, de modo que a la vista de los resultados obtenidos en el presente estudio destaca T. 70 por presentar el mayor aporte de esta vitamina (9%) por porción comestible de 150 g, (peso aproximado de una pieza de fruta). Dado que es inferior al 15%, de acuerdo con el Reglamento (UE)

1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor las muestras consideradas en este estudio **no pueden** ser publicitadas como "**fuente de vitamina A**".

6. Taroco T. 70 fue la variedad que presentó mayor contenido de flavonoides totales (200 – 275 mg/100g de porción comestible). El flavonoide mayoritario en las naranjas estudiadas fue la hesperidina (78 a 143 mg/100g de porción comestible), siendo la variedad Sanguinelli la que mayor contenido de este flavonoide presentó (92,9 a 143 mg/100g), seguida de la narirutina (37,0 – 93,0 mg/100g de porción comestible).
7. En cuanto a las antocianinas, se identificaron diez compuestos en todas las naranjas pigmentadas, siete derivados de cianidina y tres derivados de delfinidinas, siendo las más abundantes cianidina 3- (6"-malonil) glucósido), y cianidina 3-glucósido. Destacan Sanguinelli, T. Rosso y T. 70 por mostrar los valores más altos de antocianinas totales, mostrando todas ellas valores comprendidos en un rango de 6,56 – 25,49 mg/ 100g de porción comestible.

Los aspectos más importantes que se deducen del **estudio del color** fueron:

8. Sanguinelli y Taroco T. 70 fueron las variedades que presentaron una coloración más rojiza en su pulpa (mayor a* y menor b*), con los colores más vivos (mayor C*). Mientras que los taroccos T. Rosso y T. 100 fueron las que presentaron una coloración más amarillo anaranjada (mayor b* y menor a*), con una mayor luminosidad (L*).
9. El estudio del color evidenció que no existe una relación entre la coloración externa e interna de estas naranjas, pudiendo encontrar naranjas con una coloración más rojiza en su piel, y sin embargo una pulpa más amarillo-anaranjado, como ocurre en el caso de T. Rosso.
10. Los principales responsables del color de estas frutas fueron los pigmentos β – caroteno y antocianinas, los cuales estuvieron fuertemente correlacionados con los parámetros CIELAB (a*, b*, L*, C* y h) proporcionándoles a las naranjas los colores tan característicos, puesto que todas las muestras estudiadas tuvieron valores positivos de a* y b*, tanto para la pulpa como para la piel, situándose en la zona de amarillo-anaranjados-rojizos.

PARTIAL CONCLUSIONS

The main aspects to highlight from red oranges **characterisation** (*Citrus sinensis* L. cv. Sanguinelli; *Citrus sinensis* L. cv. Tarocco) are as follows:

1. The average moisture content varied between 79.74 and 87.57 g/100 g of edible portion. The Tarocco T. 100 variety had the highest values, close to 90 %, showing statistically significant differences compared to the other varieties.
2. Sanguinelli, T. Rosso y Tarocco T. 70 varieties showed similar and homogeneous values with respect to soluble solids (ºBrix; 12.57 – 15.30). T. 70 variety also showed the highest maturity index (17.01 – 20.44), mainly due to its low titratable acidity and high pH.
3. The pigmented oranges Sanguinelli and Tarocco Rosso has the highest vitamin C content (66.70 mg ascorbic acid/100 g and 66.42 mg ascorbic acid/100 g, respectively). In accordance with Regulation (EU) 1169/2011, which gives a Vitamin C nutrient reference value (NRV) of 80 mg/day, we can claim that the consumption of single piece of these pigmented oranges (150 grams) could cover the 100 % of these recommendations and in all cases these oranges could be claimed as a **natural source of vitamin C**, covering more than 15 % of these recommendations.
4. In relation to the organic acids, oxalic acid, tartaric acid, malic acid, citric acid and fumaric acid were characterized. All the pigmented oranges had a high citric acid content, being the predominant organic acid, with values between 864.99 and 1,622.70 mg/100g, in T. 70 and Sanguinelli, respectively; being this compound the responsible for these fruits acidity.
5. The β-carotene content varied between 0.25 and 0.59 mg/100g of edible portion, being T. 70 the variety with the highest mean value (0.542 mg/100g). The NRV for vitamin A is set at 800 μg/day, so that in view of the obtained results, T. 70 variety also showed the highest content in this vitamin (9 %) per each 150 g of edible portion (approximate weight of a piece of fruit). Given that this is less than 15 % in accordance with Regulation (EU) 1169/2011 on food information provided to the consumer, the samples considered in this study **cannot** be claimed as a "**source of vitamin A**".
6. Tarocco T. 70 was the variety that showed the highest total flavonoid content (200 -

275 mg/100g of edible portion). The predominant flavonoid in the studies oranges was hesperidin (78 to 143 mg/100g of edible portion), being Sanguinelli the variety with the highest content of this flavonoid (92.9 to 143 mg/100 g), followed by the narirutin flavonoid (37.0 - 93.0 mg/100 g of edible portion).

7. Regarding anthocyanins, ten different compounds were identified in the pigmented oranges, seven cyanidin derivatives and three delphinidin derivatives, the most abundant was cyanidin 3-(6''-malonylglucoside) and cyanidin 3-glucoside. Sanguinelli, T. Rosso and T. 70 varieties had the highest total anthocyanins content, all of them with values that range between 6.56 - 25.49 mg/100 g of edible portion.

The most important aspects regarding the **colour study** was:

8. Sanguinelli and T. 70 were the varieties with the more reddish colouration in their pulp (higher a* and lower b*), with the brightest colours (higher C*). While the Tarocco T. Rosso and T. 100 varieties were those with more yellow-orange colouration (higher b* and lower a*) and high luminosity (L*).
9. The colour study demonstrated that there is no correlation between external and internal colouration; oranges could be found with a higher reddish colour in their skin whereas their pulp present a yellow-orange colour, as in the case of T. Rosso.
10. The main compounds responsible for the colour in these fruits were β–carotene and anthocyanins pigments, which were strongly correlated with the CIELAB parameters (a*, b*, L*, C* and h), giving to the oranges their characteristic colours. All the studied samples had positive values of a* and b*, both in the pulp and in the skin, all in the yellow-orange-reddish area.

5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

Características principales de las distintas variedades de clementinas estudiadas (*Citrus clementina* Hort. Ex. Tan.):

1. La variedad **Basol** se caracterizó principalmente por el alto contenido en compuestos fenólicos (5,94 – 8,42 mg/100 g de porción comestible), tanto flavonoides (2,58 – 4,87) como ácidos fenólicos (3,36 - 3,55), Fe (0,22 – 0,49 mg/ 100 g de porción comestible) y ácido cítrico (465,57 – 680,18 mg/100 g de porción comestible), así como por presentar mayor actividad antioxidante medida mediante el ensayo del poder reductor frente al estrés oxidativo, mostrando los valores de EC_{50} más bajos (1,32 – 2,46 mg/mL) así como mediante el ensayo de inhibición de la decoloración del β-caroteno (inhibición de la peroxidación lipídica; 0,21 – 0,82 mg/mL).
2. **Clemenrubí** se caracterizó por el elevado contenido de fibra soluble (0,68 - 1,89 mg/ 100 g de porción comestible) y de vitamina E principalmente en su isoforma α – tocoferol (0,12 - 0,31 mg/ 100 g de porción comestible).
3. Por su parte, **Clemensoon** se caracterizó, a diferencia del resto de clementinas estudiadas, por presentar el contenido significativamente más elevado de sacarosa siendo la variedad más dulce, llegando a alcanzar hasta 6,62 g/100g; elevado contenido de fibra insoluble (1,01 - 1,81 g /100 g) y ácidos grasos poliinsaturados (34,15 - 52,45 %), así como presentar la mayor actividad antioxidante medida por el método DPPH (3,36 – 10,98 mg/mL), lo que significa una mayor actividad de carácter hidrofílico.

Principales características de las naranjas pigmentadas estudiadas (*Citrus sinensis* L. cv. Sanguinelli; *Citrus sinensis* L. cv. Tarocco):

4. **Sanguinelli** y **T. Rosso** se caracterizaron por presentar elevados contenidos de vitamina C (67,26 y 66,96 mg/100 g respectivamente) y ácido cítrico (1705,79 y 1617,87 mg/100 g de porción comestible, respectivamente).
5. **Sanguinelli** y tarocco **T. 70** se caracterizaron ambas por presentar mayor coloración rojiza (mayor parámetro a*, menor resto de parámetros CIELAB, b*, L*, C* y h). Dicha coloración más intensa se debe fundamentalmente a que presentan elevados contenidos de pigmentos, β – caroteno (0,418 y 0,588 mg/100 g, respectivamente) y

antocianinas totales (25,49 y 22,70 mg/100 g, respectivamente), principalmente cianidina 3- (6"-malonil) glucósido), y cianidina 3-glucósido. Por su parte T. 70 destacó por presentar el contenido significativamente más elevado de flavonoides totales (200,0 – 265,0 mg/100 g de porción comestible), principalmente hesperidina y narirutina.

6. Tarocco **T. Rosso** y tarocco **T. 100** se caracterizaron por presentar una coloración menos rojiza (menor parámetro a*) y menor presencia de pigmentos (β – caroteno y antocianinas).

A modo de **reflexión final**, podemos resaltar que los cítricos estudiados, clementinas y naranjas pigmentadas, son buena fuente de fibra tanto soluble como insoluble, prensentan niveles significativos de compuestos bioactivos de características antioxidantes, como la vitamina C (principalmente en forma de ácido ascórbico siendo fuente de esta vitamina), ácido cítrico, vitamina E (en la isoforma α – tocoferol), compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos), β – caroteno y/o antocianinas. Por todo ello, consideramos que su consumo debe ser promovido dentro de unos hábitos dietéticos adecuados y saludables.

CONCLUSIONS

Main characteristics of the different varieties of clementines (*Citrus clementina* Hort. Ex. Tan.):

1. Clementine **Basol** variety was mainly characterised by the high phenolic compounds content (5.94 - 8.42 mg/100 g edible portion), both flavonoids (2.58 – 4.87) and phenolic acids (3.36 – 3.55); iron content (Fe; 0.22 – 0.49 mg/ 100 g edible portion) and citric acid levels (465.57 – 680.18 mg/ 100 g edible portion). This variety also has the higher antioxidant activity than other clementines studied, measured by the reducing power assay (oxidative stress), as it has the lowest EC_{50} values (1.32 - 2.46 mg/mL), as well as by the β-carotene assay bleaching inhibition (lipid peroxidation inhibition; 0.21 - 0.82 mg/mL).
2. **Clemenrubí** variety was characterised by the high soluble dietary fibre (0.68 - 1.89 mg/ 100 g edible portion) and vitamin E contents, mainly as α–tocopherol isoform (0.12 - 0.31 mg/ 100 g de edible portion).
3. **Clemensoon** wascharacterised by its significantly high sucrose content being the sweetest variety, reaching up to 6.62 g/100 of edible portion; high insoluble fibre (1.01 - 1.81 g /100 g edible portion) and polyunsaturated fatty acid content 34.15 - 52.45 %), as well has due to it higher antioxidant activity measured by the DPPH assay (3.36 – 10.98 mg/mL), which means a higher activity in hydrophilic phase.

Main characteristics of the red oranges (*Citrus sinensis* L. cv. Sanguinelli; *Citrus sinensis* L. cv. Tarocco):

4. **Sanguinelli** and **T. Rosso** were characterised by having high vitamin C contents (67.26 and 66.96 mg/100 g edible portion respectively) and citric acid (1705.79 and 1617.87 mg/100g of edible portion respectively).
5. **Sanguinelli** and Tarocco **T. 70** were both characterised by having higher reddish colouration (higher parameter a*, b*, L*, C* and h lower). This very intense colouration was mainly due to it high pigment content, β–carotene (0.418 and 0.588 mg/100 g of edible portion respectively) and total anthocyanins (25.49 and 22.70 mg/100 g edible portion respectively), mainly as cyanidin 3-(6"-malonylglucoside)

and cyanidin 3-glucoside. Tarocco T. 70 had a significantly high total flavonoid content (200.0 - 265.0 mg/100 g edible portion), mainly as hesperidin and narirutin.

6. Tarocco **T. Rosso** and Tarocco **T. 100** were characterised by having less reddish colouration (lower a* parameter) and therefore less pigment content (β-carotene and anthocyanins).

We can have concluded that the studied citrus fruits, clementines and red oranges, are good sources of both soluble and insoluble dietary fibre, have a significant content on bioactive compounds with antioxidant properties, vitamin C in special (mainly as ascorbic acid), citric acid, vitamin E (in the α-tocopherol isoform), phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids), β-carotene and/or anthocyanins. Therefore, we consider that their consumption should be promoted within appropriate healthy dietary habits.

6. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abad-García, B., Berrueta, L.A., López-Marquez, D.M., Crespo-Ferrer, I., Gallo, B., Vicente, F., 2007. Optimization and validation of a methodology based on solvent extraction and liquid chromatography for the simultaneous determination of several polyphenolic families in fruit juices. Journal of Chromatography, A, 1154(1–2), 87–96.

Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Berrueta, L.A., Gallon, B., Vicente, F., 2012. On line characterization of 58 phenolic compounds in Citrus fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photo diode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. Talanta, 99, 213-224.

Abeysinghe, D.C., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C., Chen, K., 2007. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. Food Chem. 104: 1338-1344.

Agostini, L.; Morón, M.J.; Ramón, A. y Ayala, A. 2004. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas tratadas térmicamente. Scientia Agroalimentaria. Arch Latinoam Nutr. 54(1): 89-92.

Agustí, M., Almela, V., 1984. Mejora de la calidad del fruto de la mandarina Satsuma. Bco. de Santander, Madrid, España. ISBN: 84-398-1798-3.

Agustí, M., Almela, V., 1991. Aplicación de fitorreguladores en citricultura. AEDOS, Barcelona, Spain.

Agustí, M., Andreu, I., Juan, M., Almela, V., Zacarías, L., 1998. Effects of ringing branches on fruti size and maturity of peach and nectarine cultivars. J. Hort. Sci. & Biotechnol., 73: 537-540.

Agustí, M., 1999. El desarrollo de los frutos cítricos. Factores y estímulo. En: IV Congreso de Citricultura de la Plana, Bromera, LAV. S.A., Valencia: 79-99.

Agustí, M., 2003. Citricultura. Mundi-Prensa, Madrid, España; 52-53.

Ahmed, S.S., Lott, M.N., Marcus, D.M. 2005. The macular xanthopylls. Surv. Ophthal, 50, 183-193.

Albertini, M.V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F.O, Berti, L. J. 2006. Changes in Organic Acids and Sugars during Early Stages of Development of Acidic and Acidless Citrus Fruit. Agric. Food Chem. 54, 8335-8339.

Albrigo, L.G., 1992. Environmental influences on citrus fruit development. Proc. Second Intl. Seminar Citrus Physiol., 91–101.

Albrigo, L.G., 1993. Multi-year production cycles of 'Valencia' orange soluble solids per fresh weight coincide with El Nino events. HortScience 28(5): 484 (Abst. 256).

Albrigo, L., y Devices, F., 1999. Cítricos. Editorial ACRIBIA. Zaragoza, España.

Alquézar, B., Rodrigo, M.J., Zacarias, L., 2008. Regulation of carotenoid biosynthesis during fruit maturation in the red-fleshed orange mutant Cara Cara. Phytochemistry, 69: 1997–2007.

Alquézar, B., Zacarías, L., Rodrigo, M.J. 2009. Molecular and functional characterization of a novel chromoplast-specific lycopene β-cyclase from citrus and its relation to lycopene accumulation. Journal of Experimental Botany 60: 1783–1719.

Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L.A., Legarreta, P., Saenz, L., Rodrigo-García, J., González Aguilar, G.A. (2010). Daily consumption of apple, pear and orange juice differently affects plasma lipids and antioxidant capacity of smoking and non-smoking adults. Int J Food Sci Nutr, 61(4), 369-80.

Álvarez, J., Pastoriza, S., Alonso-Olalla, R., Delgado-Andrade, C., Rufián-Henares, J. A., 2014. Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. Food Chemistry, 164, 396-405.

Álvarez-Sala, L.A., Millán J., De Oya, M., 1996. La dieta mediterránea en España. Leyenda o Realidad (II). Otros elementos de la dieta mediterránea: verdura y fruta, el pescado. Evolución de la dieta y de las enfermedades cardiovasculares en España en las últimas décadas.

Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Wakana, D., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa, T., Goda, Y., 2013. Characterization of Phenolic Constituents from Ephedra Herb Extract, Molecules, 18, 5326- 5334.

Andersen, Ø. M., Jordheim, M., 2006. The anthocyanins. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications 471-553. Boca Raton: Taylor and Francis.

Anecoop. S. Coop. La variedad "clemensoon" nuevas mandarinas de interés naranjas pigmentadas. Última fecha de consulta 26/03/2017: http://www.fundacioncajamarvalencia.es/es/pdf/curso-llombai/clemensoon/clemensoon.pdf

Apelblat, A., 2014. Citric Acid (electronic resource). Editorial Springer.

Aptekmann, N.P., Cesar, T.B. 2010. Orange juice improved lipid profile and bloodlactate of overweight middle-aged women subjected to aerobic training. Maturitas, 67, 343–347.

Arena, E., Fallico, B., Maccarone, E. 2001. Evaluation of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. Food Chemistry, 74: 423-427.

Aruoma, O.I., 1994. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. Food Chem Toxicol 62: 671–683.

Atti-Santos, A.C., Rossato, M., Atti, L., Cassel, E., Moyna, P., 2005. Extraction of Essential Oils from Lime (Citrus latifolia Tnaka) by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide. Brazilian Archives of Biology and Technology, 48(1), 155-160. ISSN 1516-8913.

ASOZUMOS. El libro del zumo. 2011. Madrid: Agrícola Española.

Baghurst, K., 2003. The Health Benefits of Citrus Fruits. Sidney, Australia. Horticulture Australia, Ltd. 13-14.

Biehler, E., Alkerwi, A., Hoffmann, L., Krause, E., Guillaume, M., Lair, M-L., Bohn, T., 2001. Contribution of violaxanthin, neoxanthin, phytoene and phytofluene to total carotenoid intake: Assesment in Luxembourg. Journal of Food Composition and Analysis.

Bahorun, T., Luximon-Ramma, A., Crozier, A., Aruoma, O., 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. Journal of Science of Food and Agriculture, 84, 1553-1561.

Bahorun T., Soobrattee M.A., Luximon-Ramma V., Aruoma O.I. 2006. Free radicals and antioxidants in cardiovascular health and disease. Internet J. Med. Update. 1:1–17.

Bahorun, T., Neergheen, V. S., Soobrattee, M. A., Luximon-Ramma, V. A., & Aruoma, O. I. 2007. Prophylactic phenolic antioxidants in functional foods of tropical island states of the Mascarene Archipelago (Indian Ocean). In J. N. Losso, F. Shahidi, & D. Bagchi (Eds.), Anti-angiogenic functional and medicinal foods (pp. 149–176). New York: CRC Press, Taylor & Francis Group.

Bain, J.M., 1958. Morphology, anatomical and physiological changes in the developing fruit of the Valencia orange, Citrus sinensis (L.) Osbeck. Austral. J. Bot. 6: 1-28.

Ball, G. F., 2005. Vitamins in foods: analysis, bioavailability, and stability, 156. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis.

Baltes, W., 2006. Química de los alimentos. Acribia. Zaragoza.

Barceló-Coblijn, G., Murphy, E.J. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. Progress in Lipid Research 48: 355–374

Barreca, M.L., Deluca, L., Iraci, N., Chimirri, A., 2006. Binding mode prediction of strand transfer HIV-1 integrase inhibitors using TN5 transposase as a plausible surrogate model for HIV-1 integrase. Journal of Medicinal Chemistry 49: 3994–3997.

Barreca, D., Bellocco, E., Leuzzi, U., Gattuso, G., 2014. First evidence of C- and Oglycosyl flavone in blood orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. Food Chemistry, 149, 244–252.

Barreca, D., Gattuso, G., Laganà, G., Leuzzi, U., Bellocco, E., 2016. C- and O-glycosyl flavonoids in Sanguinello and Tarocco blood orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck) juice: Identification and influence on antioxidant properties and cetylcholinesterase activity. Food Chemistry 196 : 619–627.

Barret, H.C., Rhodes, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of the affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. Systematic Botany 1: 105-136.

Barros, L., Venturini, B.A., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I.C., 2008. Chemical composition and biological properties of Portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(10), 3856-3862.

Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I. C. F. R. 2010b. Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics LWT - Food Science and Technology, 43, 544–550.

Barros, H.R., Pinto de Castro Ferreira, T.A., Genovese, M.I., 2012. Antioxidant capacity and mineral content of pulp and peel from commercial cultivars of citrus from Brazil. Food Chemistry, 134, 4, 1892–1898.

Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic andlipophylic compounds of Chenopodium ambrosioides L. Journal of Functional Foods, 5, 1732-1740.

Bartley G. E. Scolnick P. A. 1995. Plan carotenoids : Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. The Plant Cell, 7 : 1027-1038.

Bartholomew, E.T., Sinclair, W.B., 1943. Soluble constituents and buffer properties of orange juice. Plant Physiol 18: 185–206.

Bastos, C., Barros, L., Dueñas, M., Calhelha, R.C., Queiroz, M.J.R.P., Santos-Buelga, C., Ferreira. I.C.F.R., 2015. Chemical characterization and bioactive properties of Prunus avium L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. Food Chemistry, 173: 1045-1053.

Belitz, H.D., Grosch, W., 1997. Química de los alimentos. 2ª Ed. Acribia. Zaragoza.

Beltrán, G., Aguilera M.P., Del Río, C., Sánchez, S., Martínez, L. Influencia del proceso de maduración del fruto de diferentes variedades de olivo sobre el contenido de antioxidantes naturales. Libro Maduración y post-recolección de frutas y hortalizas. Merodio, C. y Escribano, M.I. 99-105.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., Marin, F.R., Ortuno, A., Del Rio, J.A., 1997. Uses and properties of Citrus flavonoids. J Agric Food Chem 45: 4505–4515.

Benavente-Garcia, O., Castillo, J., 2008. Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-Inflammatory Activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 15, 6185 – 6205.

Ben Yehoshua, S., Rodov, V., Fang, D. Q., Kim, J. J., 1995. Preformed antifungal compounds of citrus fruit: effect of postharvest treatments with heat and growth regulators. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43 (4): 1062-1066.

Berhow, M., Tisserat, B., Kanes, K., Vandercook, C. 1998. Survey of phenolics compounds

produced in Citrus. Agricultural research service technical bulletin, 1856. United States Department of Agriculture.

Berker, K. I., Güçlü, K., Demirata, B., Apak, R., 2010. A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent. Analytical Methods, 2(11), 1770-1778.

Bermejo, A., Pardo, J., Cano A. 2011. Influence of Gamma Irradiation on Seedless Citrus Production : Pollen Germination and Fruit Quality. Food and Nutrition Sciences 2, 169-180.

Bermejo, A., Cano, A., 2012. Analysis of Nutritional Constituents in Twenty Citrus Cultivars from the Mediterranean Area at Different Stages of Ripening. Food and Nutrition Sciences, 3, 639-650.

Bouayed, J., y Bohn, T., 2012. Dietary derived antioxidants: implications on health. Nutrition, Well-Being and Health, ISBN: 978-953-51-0125-3, InTech, DOI: 10.5772/25337. Disponible en:

Boudries, H., Madani, K., Touati, N., Souagui, S., Medouni, S., Chibane, M. 2012. Pulp antioxidant activities, mineral contents and juice nutritional properties of algerian clementine cultivars and mandarin. African Journal of Biotechnology, 11(18), 4258-4267.

Bourourou, M., Heurteaux, C., Blondeau, N., 2016. Alpha-linolenic acid given as enteral or parenteral nutritional intervention against sensorimotor and cognitive deficits in a mouse model of ischemic stroke. Neuropharmacology. 108: 60–72.

Brady, C.J., 1987. Fruit ripening. Annual Review of Plant Physiology 38, 155- 178.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenchaft und Technologie, 28: 25-30.

Braverman, J.S. The chemical composition of the orange, Hadar 6 (1933) 62-65.

Breksa A.P., Hidalgo M.B., Yuen M.L. 2009. Liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry method for the rapid identification of citrus limonoid glucosides in citrus juices and extracts. Food Chem 117:739–744.

Brigelius-Flohé, R., Traber, M.G., 1999. Vitamin E: function and metabolism. FASEB J. 13: 1145-1155.

Britton G. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. FASEB Journal 9:1551-1558.

Britton, G. y D. Hornero-Méndez. 1997. Carotenoids and colour in fruits and vegetables. Pp. 11-28 in F.A. Tomás-Barberán and R.J. Robins, eds., Phytochemistry of Fruits and Vegetables. Clarendon Press, Oxford, England, UK.

Britton, G., Liaanen-Jensen, S., Pfander, H., 2004. Carotenoids Handbook; Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 17−27.

Bub, A., Watzl, B., Blockhaus, M., Briviba, K., Liegibel, U., Müller, H., Pool-Zobel, B.L., Rechkemmer, G. 2003. Fruit juice consumption modulates antioxidative status, immune status and DNA damage J Nutr Biochem, 14(2), 90-8.

Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. J. Agric. Food Chem. 49: 2774-2779.

Burns, J., Fraser, P., Bramley, P. 2003. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. Phytochemistry 62: 939–947.

Buscemi, S., Rosafio, G., Arcoleo, G., Mattina, A., Canino, B., Montana, M., Rini, G., 2012. Effects of red orange juice intake on endothelial function and inflammatory markers in adult subjects with increased cardiovascular risk. American Journal of Clinical Nutrition, 95(5), 1089–1095.

Butterfield, D.A., Castegna, A., Lauderback, C.M., Drake, J., 2002. Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. Neurobiol Aging 23(5):655-664.

Calabrese, F. 1994. The history of Citrus in the Mediterranean Countries and Europe. In Proc. Int. Soc. Citriculture, 1992 Ed. Tribulato, E., Gentile, A., Reforgiato, G. 232 – 234. Catania, Italy.

Calogero, G., Di Marco, G., 2008. Red Sicilian orange and purple eggplant fruits as natural sensitizers fordye-sensitized solar cells. Solar Energy Materials & Solar Cells, 92: 1341–1346.

Cámara, M.1990. Estudio de la Carica papaya grupo Solo. Maduración en distintos sistemas de almacenamiento. Tesina, 18-22. Universidad Compolutense de Madrid.

Cámara, M. 1992. Caracterización de derivados de piña: zumos y néctares. Tesis Doctoral. Universidad Compolutense de Madrid.

Cámara, M., Sánchez-Mata, M.C., Torija, E., 2003. Frutas y verduras, fuentes de salud. Editado por Comunidad Madrid.

Cámara, M. y Sánchez-Mata, M. C. 2006. Tomatoes, Lycopene and Human Health. En: Lycopene Analysis in Foods; Rao V., Ed.; Caledonian Press: Barcelona, Spain.

Campbell, Neil. 1987. Biology. p. 795. Hardcover, Seventh Edition. Published 2004 by Benjamin Cummings (first published 1987).

Cardeñosa, V.E., Medrano, P., Lorenzo, M.C., Sánchez-Guerrero, F., Cuevas, I., Pradas, 2015. Effects of salinity and nitrogen supply on the quality and healthrelated compounds of strawberry fruits (Fragaria×ananassa cv Primoris). J. Sci. Food Agric.

Cardeñosa, V. 2016. Influence of preharvest factors on nutritional quality and bioactives compounds in strawberry and orange fruits. Doctoral Thesis. Universidad de Córdoba.

Caristi, C., Bellocco, E., Gargiulli, C., Toscano, G., Leuzzi, U., 2006. Flavone-di-Cglycosides

in citrus juices from Southern Italy. Food Chemistry. 95(3): 431-437.

Carocho, M., Ferreira, I. C., 2012. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology 51C, 15–25.

Carocho, M., Ferreira, I., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and Chemical Toxicology; 51: 15–25.

Cercós, M., Soler, G., Iglesias, D.J., Gadea, J., Forment, J., Talon, M., 2006. Global analysis of gene expression during development and ripening of citrus fruit flesh. A proposed mechanism for citric acid utilization. Plant Mol. Biol. 62: 513-527.

Chatterjee, M., Roy, K., Janarthan, M., Das, S., Chatterjee, M. (2012). Biological activity of carotenoids: its implications in cancer risk and prevention. Curr. Pharm. Biotechnol, 13, 180-190.

Cho, M.J.; Howard, L. Prior, R.L. y Clark, J.R. 2005. Flavonol glycosides and antioxidant capacity of various blackberry and blueberry genotypes determined by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. Journal of the Science of Food and Agriculture. 85:2149–2158.

Choi, M.H., Kima, G.H., Leeb, H.S., 2002. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (Citrus sinensis) juice during refrigerated storage. Food Research International 35 (2002) 753–759.CIE, Commission internationale de l'éclairage. 2001. Technical Report Publication, 142.

Clifford, M. N., 1999. Chlorogenic acids and other cinnamates–nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture, 79(3), 362-372.

Cloutier, M., Adamson, E., 2004. The mediterranean Diet Harper Collins.

Coultate, T.P., 1984. Alimentos: Química de sus componentes. Acribia. Zaragoza.

Crozier, A., Jaganath, I. B., Clifford, M. N., 2006. Phenols, polyphenols and tannins. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet, 1-24. Oxford: Blackwell Publishing.

Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N., 2009. Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. Nat. Prod. Rep., 26: 1001-1043.

Cuyckens, H., Claeys, M., 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. Journal of Mass Spectrom, 39, 1-15.

Davies, F.D., Abrigo, l.G. 1994. Citrus. CABI Head Office, Wallingford, UK. 254.

Deckelbaum, R. J., Torrejon, C., 2012. The omega-3 fatty acid nutritional landscape: Health benefits and sources. The Journal of Nutrition, 142(3), 587S-591S.

Del Caro, A., Piga. A., Vacca, V., Agabbio, M., 2004. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. Food Chem. 84: 99–105.

Delgado-Vargas F., Jiménez A. R. y Paredes-López O. 2000. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains characteristics, biosynthesis processing, and stability. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40:176–271.

Del Río, J.A., Arcas, M.C., Botía, J.M., Avidez, A., Fuster, M.D., Ortuño, A., 2000. Involvement of phenolic compounds in the antifungal defense mechanisms of Olea europea L. and Citrus sp. In: Pandalai SG. Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry, 4: 331-341. Research Signpost, Trivandrum.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. Antioxidants & Redox Signaling, 18(14), 1818-1892.

Demarin, V., Lisak, M., Morović, S., 2011. Mediterranean diet in healthy lifestyle and prevention of stroke Acta clinica Croatica, 1 67-77.

Deng, Z.N., Gentile, A., Nicolosi, E., Continella, G., Tribulato, E. 1996. Parentage determination of some citrus hydrids by molecular markers. Proceedings of the 8th International Society of Citriculture 2: 849-854.

Déprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapierre, C., Scalbert, A., 2000. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. The Journal of Nutrition, 130(11), 2733-2738.

Destani, F., Cassano, A., Fazio, A., Vincken, J.P., Gabriele, B. 2013. Recovery and concentration of phenolic compounds in blood orange juice by membrane operations. Journal of Food Engineering 117: 263–271

Dhuique-Mayer, C., Caris-Veyrat, C., Ollitrault, P., Curk, F., Amiot, M.J., 2005. Varietal and interspecific influence on micronutrient contents in citrus from the mediterranean area.

DiDonna, L., Taverna, D., Mazzotti, F., Benabdelkamel, H., Attya, M., Napoli, A., Sindona, G., 2013. Comprehensive assay of flavanones in citrus juices and beverages by UHPLC–ESI-MS/MS and derivatization chemistry," Food Chemistry 141 2328–2333.

Ding, D., Gebel, K., 2012. Built environment, physical activity, and obesity: what have we learned from reviewing the literature. Health Place 18 (1), 100-105.

Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Viña-Ribes, J., 1998. Functional Food Science and defence against reactive oxidative species. The British Journal of Nutrition, 80, 77.

Dissanayake D.W, Dissanayake D.M.D. 2015. The physiology of pain: an update and review of clinical relevance. Journal of the Ceylon College of Physicians, 46, 19-23

Dixon, R. A., Xie, D. Y., Sharma, S. B., 2005. Proanthocyanidins–a final frontier in flavonoid research. New Phytologist, 165(1), 9-28.

Dobzhansky T. 1937. Genetics and the origin of species. Columbia University Press, New York.

Domínguez, E., Ordoñez, E. 2014. Evaluación de la actividad antioxidante, vitamina c de zumos cítricos de lima dulce (C*itrus limetta*), limón tahití (*Citrus latifolia*), limón rugoso (*Citrus jambhiri lush*) y mandarina cleopatra (*Citrus reshni*) almacenados en refrigeración. Investigación y Amazonía; 3 (1): 30-35 ISSN 2223.

Donovan, J. L., Manach, C., Faulks, R. M., Kroon, P. A., 2006. Absorption and metabolism of dietary plant secondary metabolites. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet, 303-351. Oxford: Blackwell Publishing.

Dugo, P., Mondello, L., Morabito, D., Dugo, G., 2003. Characterization of anthocyanin fraction of Sicilian blood orange juice by Micro-HPLC-ESI/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1373–1376.

Durazzo, A., Zaccaria, M., Polito, A., Maiani, G., Carcea, M., 2013. Lignan Content in Cereals, Buckwheat and Derived Foods. Foods, 2(1), 53-63.

Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A., 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. Nutrition Research Reviews 13(1):79-106.

Ebere, D., 2008. Citrus fruits: a rich source of phytochemicals and their roles in human health. Int. J. Chem. Sci, 6(2), 451-471.

Economos, C., Clay W.D., 1999. Nutritional and health benefits of citrus fruits, FAO

EFSA, Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy.

ElGharras, H., 2009. Polyphenols: food sources, properties and applications–a review. International journal of Food Science and technology, 44(12), 2512-2518.

Erlund, I., 2004. Review of the flavonoids quercetin, hesperidin, and naringenin. Dietarysources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. Nutrition Research, 24, 851-874.

Escarpa, A., Gonzalez, M., 2001. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic compounds in food. Critical Reviews Analytical Chemistry, 31(2), 57–139.

Esteve, M.J., Farré, R., Frigola, A. García-Cantabella, J.M., 1997. Determination of ascorbic and dehydroascorbic acids in blood plasma and serum by liquid chromatography. J. Chromat. B, 688,345-349.

Fabroni, S., Ballistreri, G., Amenta, M., Rapisarda, P., 2016. Anthocyanins in different Citrus species: an UHPLC-PDA-ESI/MSn-assisted qualitative and quantitative investigation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96, 4797-4808.

Falder, A. 2003. Enciclopedia de los alimentos. Distribución y Consumo, 115 – 134. Editado por la Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca.

Fallico, B., Lanza, M.C., Maccarone, E., Asmundo, C.N., Rapisarda, P., 1996. Role of hydroxycinnamic acids and vinylphenols in the flavor alteration of blood orange juices. J. Agric. Food Chem.; 44: 2654–2657.

Fang, D.Q., Zang, W.C., Xiao, S.Y. 1993. Studies on taxonomy and evolution of Citrus and its related genera by isozyme analysis. Acta Phytotaxon Sinica 31: 329-352.

FECYT. 2005. Alimentos Funcionales. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología, Madrid. Disponible en:http://infoalimenta.com/uploads/_publicaciones/id58/58_Alimentos-funcionales.pdf [Último acceso: 12/04/17].

Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W., Roose, M.L. 1998. Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theoretical and Applied Genetics 96: 812-822.

FEPEX. Federación Española de Productores Exportadores de Furtas y Hortalizas. [Última consulta: Marzo 2017]; http://www.fepex.es/datos-del-sector/exportacion-importacion-espa%C3%B1ola-frutas-hortalizas

Fernández-Bañares F, Gassull Duró MA. Fibra dietética. En: Hernández M, Sastre A., editores. Tratado de Nutrición. Madrid: Díaz de Santos, 1999; p. 125-38.

Fernández-García, E.; Carvajal-Lérida, I.; Jarén-Galán, M.; Garrido-Fernández, J.; Pérez-Gálvez, A.; Hornero-Méndez, D. Carotenoids bioavailability from foods: from plant pigments to efficient biological activities. Food Res. Int. 2012, 46, 438−450.

Fernández-Ruiz, V., Torrecilla JS., Cámara, M., Sánchez Mata, MC. 2010. Shoemaker C.F. Radial Basis Network Analysis of Color Parameters to Estimate Lycopene Content on Tomato Fruits. Talanta, 83, 9-13

Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Vinholes, J., Grosso, C., Valentão, P., Andrade, P.B., 2011. Approach to the study of C-glycosyl flavones acylated with aliphatic and aromatic acids from Spergularia rubra by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom, 25, 700-712.

Fisher, K., Phillips, C.A., 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of Campylobacter jejuni, Escherichia coli O157, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus and Staphylococcus aureus in vitro and in food systems". Journal of Applied Microbiology 101, 1232-1240.

Fraga, C. G., Oteiza, P. I., 2011. Dietary flavonoids: role of (−)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. Free Radical Biology and Medicine, 51(4), 813-823.

Franke, A. A.; Cooney, R. V.; Henning, S. M.; Custer, L. J. 2005. Bioavailability and antioxidant effects of orange juice components in humans. J. Agric. Food Chem., 53, 5170−5178.

Fraser, Peter P., Bramley, P. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. Progress in Lipid Research, 43:228–265.

Gallus, S., Bosetti, C., La Vecchia C., 2004. Mediterranean diet and cancer risk. Eur J Cancer Prev 13: 447-452.

Gracía-Herrera, P., Sánchez-Mata, M.C. 2016. The contribution of wild plants to dietary intakes of micronutrients (II): mineral elements. Chapter 7, MC Sánchez-Mata & J Tardío (ed), Mediterranean Wild Edible Plants - Ethnobotany and Food Composition Tables.

García-Luis, A., Agustí, M., Almela, V., Romero, E., Guardiola, J.L., 1985. Effect of gibberellic acid on ripening and peel puffing in 'Satsuma' mandarin. Scientia Hort., 27: 75-86.

García-Salas, P., Gómez-Caravaca, A.M., Arráez-Román, D., Segura-Carretero, A., Guerra-Hernández, E., Villanova, B., Fernández-Gutiérrez, A., 2013. Influence of technological processes on phenolic compounds, organic acids, furanic derivatives, and antioxidant activity of whole-lemon powder. Food Chem. 141: 869-78.

Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., Caristi, C., 2007. Flavonoid Composition of Citrus Juices. Molecules, 12, 1641-1673.

Gey, K.F., Stahelin, H.B., Eichholzer, M., 1993. Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic VII. Bibliografía 251 heart disease and stroke: Basel prospective study. Clinical Investigator, 71(1), 3-6.

Ghanim, H., Mohanty, P., Pathak R., Chaudhuri, A., Sia, C.L., Dandona, P. (2007). Orange juice or fructose intake does not induce oxidative and inflammatory response. Diabetes Care, 30, 1406-1411.

Ghasemi, K., Ghsemi, Y., Ebrahimzadeh, M.A. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. Pak. J. Pharm. Sci., (22), 3: 277-281.

Gil-Izquierdo A., Gil, M.I., Ferreres F., 2002. Effect of Processing Techniques at Industrial Scale on Orange Juice Antioxidant and Beneficial Health Compounds. J. Agric. Food Chem, 50, 5107-5114.

Gil-Izquierdo, A., Riquelme, M., A. T., Porras, I., Ferreres, F., 2003. Effect of the rootstock and interstock grafted in lemon tree (Citrus limon (L.) Burm.) on the flavonoid content of lemon juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52(2): 324-331.

Gilbert, S., Omenn, M.D., Ph.D., Gary, E., Goodman, M.D., M.S., Mark, D., Thornquist, Ph.D., John Balmes, M.D., Mark, R., Cullen, M.D., Andrew Glass, M.D., James, P., Keogh, M.D., Frank, L., Meyskens, Jr., M.D., Barbara Valanis, Dr.P.H., James, H., Williams, Jr., M.D., Scott Barnhart, M.D., M.P.H., Samuel Hammar, M.D., 1996. Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. N Engl J Med; 334:1150-1155.

Godoy, H.T., Rodriguez-Amaya, D. B. (1994). Ocurrence of cis-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42, 1306-1313.

Granado, F., Blázquez, S., Olmedilla, B. (2007). Changes in carotenoid intake from fruit and vegetables in the Spanish Poluplation over the period 1964-2004. Public Health Nutrition, 10 (10), 1018-1023

Grosso, G., Galvano, F., Mistretta, A., Marventano, S., Nolfo, F., Calabrese, G., Buscemi, S., Drago, F., Veronesi, U., Scuderi, A., 2013. Red orange: Experimental models and

epidemiological evidence of its benefits on human health. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 157240.

Gu, L., Kelm, M. A., Hammerstone, J. F., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., y Prior, R. L., 2004. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. The Journal of nutrition, 134(3), 613-617.

Gu, L., 2012. Analysis methods of proanthocyanidins. Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals 247-271. Chichaste: John Wiley & Sons.

Guardiola, J.L., 1988. Factores internos que determinan el tamana del fruto en los agrios. Levante Agrícola, 279/80: 247-250.

Guardiola, J.L., 1992. Fruit set and growth. En: 2nd International Seminar on Citrus Physiology; 10 - 13 agosto, 1992; Bebedouro, San Pablo, Brasil. Bebedouro: Editora Legis Summa. 1 – 30.

Guarnieri, S., Riso, P., Porrini, M. (2007). Orange juice vs vitamin C: effect on hydrogen peroxide-induced DNA damage in mononuclear blood cells. Br J Nutr., 97(4), 639-43.

Guerra, M., Kenton, A., Bennett, M.D., 1996. rDNA sites in mitotic and polytene chromosomes of Vigna unguiculata (L.) Walp. And Phaseolus coccineus L. revealed by in situ hybridization. Ann. Bot. 78: 157-161.

Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J., Sousa, M.J., Carvalho, A.M, Ferreira. I., 2010. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. Food and Chemical Toxicology, 48, 99–106.

Gülçin, I., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of Toxicology, 86, 345–391.

Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. 59:1609-1623.

Halliwell, B., 1996. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. Free Radic Res, 25:57-74.

Halliwell, B., 2001. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. Drugs Aging, 18: 685-716.

Harborne, J.B., 1990. Constraints on the evolution of biochemical pathways. Biological Journal of the Linnean Society, 39: 135-151.

Haro, J.J. 1999. Conceptos y métodos en el estudio de la filogenia. Bol. SEA (Sociedad Entomológica Aragonesa), 26: 105-112.

Hatano, T., Kira, R., Yoshizaki, M., Okuda, T., 1986. Seasonal changes in the tannins of Liquidambar formosana refl ecting their biogenesis. Phytochemistry 25, 2787 – 2789.

Hellström, J. K., Törrönen, A. R., Mattila, P. H., 2009. Proanthocyanidins in common food products of plant origin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(17), 7899- 7906.

Heltosky, C. 2009. Typical meals. Food culture in Mediterranean. Stany Zjednoczone: Green

Wood.

Hensley, K., Floyd, R.A., 2002. Reactive Oxygen Species and Protein Oxidation in Aging: Alook Back, A Look Ahead. Arch of Biochem and Biophys, 397(2): 377-383.

Hernández, M., Sastre, A., 1999. Tratado de nutrición. Díaz de Santos. Madrid.

Herrero, R., Asins, M.J., Carboness, E.A., Navarro, L. 1996. Genetic diversity in the orange subfamily Aurantioideae I. Intraespecies and intragenus genetic variability. Theoretical and Applied Genetics 92: 599-609.

Herrera, F., Betancur, D., Rubi, M., 2013. Compuestos bioactivos de la dieta con potencial en la prevención de patologías relacionadas con sobrepeso y obesidad; péptidos biológicamente activos.

Hidalgo Jerez, M., 2013. Antocianos: Metabolismo y Actividad Biológica (Doctoral dissertation). Universidad Complutense de Madrid.

Hillebrand, S., Schwarz, M., Winterhalter, P., 2004. Characterization of anthocyanins and pyranoanthocyanins from blood orange [Citrus sinensis (L.) Osbeck] juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 7331–7338.

Horwitz, W., Latimer, G.W., 2005. Official methods of analysis. Asociación de Químicos Analíticos Oficial Internacional AOAC (18th ed). USA: AOAC International Association of Analytical Communities International.

HOWITT, C.A. & POGSON, B.J. 2006. Carotenoid accumulation and function in seeds and non-green tissues. Plant, Cell and Environment, 29: 435–445.

Huang, J.N. 2001. Activity of the APC(Cdh1) form of the anaphase-promoting complex persists until S phase and prevents the premature expression of Cdc20p. J Cell Biol 154(1):85-94

Huang, Y.S., Ho, S.C., 2010. Polymethoxy flavones are responsible for the antiinflammatory activity of citrus fruit peel. Food Chemistry 119, 868-873.

Humphries, J.M., Khachick, F. (2003). Distribution of lutein, zeaxanthin, and related geometrical isomers in fruit, vegetables, wheat, and pasta products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 1322-1327.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. Food Chemistry, 126(4), 1821-1835.

Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M., Martínez-Navarrete, N., 2011. Changes in Flavonoid content of grapefruit juice caused by thermal treatment and storage. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 12, 153-162.

Igual, M., García-Martínez, E., Camacho, M.M., Martínez-Navarrete, N., 2013. Jam

processing and storage effects on □-carotene and flavonoids content in grapefruit. Journal of Functional Foods, 5, 736-744.

Isabelle, M., Lee, B.L., Lim, M.T., Koh, W.P., Huang, D., Ong, C.H., 2010. Antioxidant activity and profiles of common fruits in Singapore. Food Chemistry 123: 77–84.

Jacob, R., Hasegawa, S., Manners, G., 2000. The potential of Citrus Limonoids as Anticancer Agents. Perishables Handling Quarterly Issue, 102.

Jaganath I. B., y Crozier, A., 2010. Dietary flavonoids and phenolic compounds. Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology, 1-49. Hoboken: John Wiley & Sons.

Jaswir, I., Noviendri, D., Fitri, R., Octavianti, F., 2011. Carotenoids: Sources, medicinal properties and their application in food and nutraceutical industry. Journal of Medicinal Plants Research, 5(33), 7119-7131.

Jiménez-Cuesta, M., Cuquerella, J., Martínez-Jávega, J.M., 1983. Teoría y práctica de la desverdización de los cítricos. INIA.

Johnson, E.J., Krinsky, N.I. 2009. Carotenoids and Coronary Heart Disease; en Carotenoids. Volume 5: Nutrition and Health (Britton, G.; Pfander, H.; Liaaen-Jensen, S., ed.) Birkhäuser Basel, 287-300.

Jomova, K., Valko, M. 2013. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. Eur J Med Chem, 70, 102-10.

Joshipura, KJ., Hu, FB., Manson, JE., Stampfer, MJ., Rimm, EB., Speizer, FE., Colditz, C., Ascherio, A., Rosner, B., Spiegelman, D., Willet. W.C., 2001. The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. Annals International of Medicine 134: 1106-1114.

Kafkas, E., Ercisli, S., Kemal, K.N., Baydar, K., Yilmaz, H., 2009. Chemical composition of blood orange varieties from Turkey: A comparative study. Pharmacognosy Magazine, 5: 329-35.

Kafkas, E., Polatöz S., Koç, N.K., 2011. Quantification and Comparison of Sugars, Carboxylic Acids and Vitamin C Components of Various Citrus Species by HPLC Techniques.

Kamal-Eldin, A., Lars, A. 1996. The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. Lipids, By AOCS Press. Vol. 31, no. 7, 671.701.

Kamal, G.M., Anwar, F., Hussain, A.I., Sarri, N., Ashraf, M.Y., 2011. Yield and chemical composition of Citrus essential oils as affected by drying pretreatment of peels. International Food Research Journal 18(4), 1275-1282.

Karadeniz, F., 2004. Main Organic Acid Distribution of Authentic Citrus Juices in Turkey. Turkish Journal of Agriculture & Forestry, 28, 267-271.

Ke, Z., Yupan, Xu, X., Nie, Ch., Zhou, Z., 2015. Citrus flavonoids and human cancers. Journal of Food and Nutrition Research, 3(5), 341-351.

Kelebek, H., Selli, S., 2011. Determination of Volatile, Phenolic, Organic Acid and Sugar Components in a Turkish cv. Dortyol (Citrus sinensis L. Osbeck) Orange Juice. Journal of the Science of Food and Agriculture, 91, 1855-1862.

Kelebek, H., Canbas, A., Selli, S., 2008. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (Citrus sinensis (L.) Osbeck) grown in Turkey. Food Chemistry, 70: 1710–1716.

Keys, A., 1980. Seven countries: A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease. Cambridge, Harvard University Press.

Keys, A., Menotti. A., Karvonen. M.J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B.S., Dontas, A.S., Fianza, F., Keys, M.E., Kromhout, D., Nedeljkovic, E., Punsar, E., Seccareccia, E.; Toshima, H., 1986. The diet and IS-vear death rato in tho seven Countries Study. Ann. J. Epidem., 124: 903-15.

KEYS, A., 1995. Mediterranean diet and public health: personal reflections. Am J Clin Nutr, 61, 1321S-23S.

Khachik F, Spangler CJ, Smith Jr. JC, Canfield LM, Pfander H, Steck A. 1997. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids, and their metabolites in human milk and serum. Anal Chem 69: 1873–1881.

Kimball, D.A., 1984. Factors affecting the rate of maturation of citrus fruits. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 97: 40-44.

Kimball, D. A. 1999. Procesado de cítricos. Acribia. Zaragoza.

Kivirikko, K.I., Myllyla, R., Pihlajaniemi, T., 1989. Protein hydroxylation: prolyl 4-hydroxylase, an enzyme with four cosubstrates and a multifunctional subunit. FASEB J 3, 1609- 1617.

Khan, I. 2007. Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology. CABI.

Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., 2002. Flavonoid intake and riskof chronic diseases. Am J Clin Nutr. 76(3): 560.

Kuskoski M. *et al* (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos– Ciencia y Tecnología Alimentaria – Campinas - Brasil- 25(4): 726- 732.

Kyle, J. A. M., Duthie, G.G., 2006. Flavonoids in foods. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and applications, 219-262. Boca Raton: CRC Press.

Lachance, P.A., Nakat, Z., Jeong, W.S., 2001. Antioxidants: an integrative approach. Nutrition, 17, 835–838.

Ladaniya, M., 2008. Citrus fruit: biology, technology and evaluation. Academic Press. San Diego. E.E.U.U.

Lafay, S., Gil-Izquierdo, A., 2008. Bioavailability of phenolic acids. Phytochemistry

Reviews, 7(2), 301-311.

Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P., 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. Progress in Lipid Research, 46(5), 244-282.

Landete, J.M. 2012. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. Crit. Rev. Food Sci. Nutr, 52, 936-48.

Lands, B., 2014. Historical perspectives on the impact of n-3 and n-6 nutrients on health. Progress in Lipid Research, 55, 17-29.

Landrum, J.T., Bone, R.A. (2001). Lutein, Zeaxanthin and the Macular Pigment. Archives of Biochemistry and Biophysics, 385, 28-40.

Lee, J.C., *et al*. 1983. Binding of proteins from the large ribosomal subunits to 5.8 S rRNA of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 258(2): 854-8.

Lee, H. S., Carter, R. D. Barros, S. M. Dezman, D. J. Castle, W.S. 1990. Chemical Characterization by Liquid Chromatography of Moro Blood Orange Juices. Journal of Food Composition and Analysis 3,9- 19.

Lee, Hyoung, S., 2002. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed budd blood orange (Citrus sinensis). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(5): 1243-1246.

Legua, P., J.B. Forner, F. Hernandez, M.A., FornerGiner, 2014. Totalphenolics, organic acids, sugars and antioxidant activity of mandarin (Citrus clementina Hort. ex Tan.): Variation from rootstock. Sci. Hortic., 174: 60-64.

Letaief, H., Zemni, H., Mliki, A., Chebil, S., 2016. Composition of Citrus sinensis (L.) Osbeck cv «Maltaise demi-sanguine» juice. A comparison between organic and conventional farming, Food Chemistry, 1;194: 290-5.

Liang, L., Shao-qian, C., Si-yi, P., 2011. Thermal Degradation Kinetics of Three Kinds of Representative Anthocyanins Obtained from Blood Orange. Agricultural Sciences in China 10(4): 642-649.

Liu, R.H. 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. Am J Clin Nutr., 78, 517S-520S.

Liu, Y., Liu, Q., Tao, N., 2006. Efficient isolation of RNA from fruit peel and pulp of ripening navel orange (Citrus sinensis Osbeck). J. Huazhong Agri. Uni., 25 300–304.

Liu, Y.Z., Deng, X.X., 2007. Citrus breeding and genetics in China. Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology, 1, 23-28.

Lock, O., 1997. Colorantes naturales. Universidad Católica del Perú. Lima. Perú.

Londoño, J., Montoya G.P., Guerrero K.M., Aristizabal, L., Arango J. 2006. Citrus juice inhibits low density lipoprotein oxidation: relationship between free radical scavenger activity and electrophoretic mobility. Rev Chil Nutr Vol. 33, Nº3.

López-Bucio, J., Nieto-Jacobo, M.F., Ramírez-Rodríguez, V., Herrera-Estrella, L., 2000. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. Plant Science 160: 1–13.

Lorenz, P., Conrad, J., Bertrams, J., Berger, M., Duckstein, S., Meyer, U., 2012. Investigations into the phenolic constituents of dog's mercury (Mercurialis perennis L.) by LC–MS/MS and GC–MS analyses. Phytochemical Analysis, 23, 60–71.

Lozano, C., Torres, J.L., Julia, L., Jiménez, A., Centelles, J.J., Cascante, M., 2005. Effect of new antioxidant cysteinyl-flavanol conjugates on skin cancer cells. FEBS Lett, 579, 4219-4225.

LURO, F., LAIGRET, F., BOVÉ, J.M. 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to Citrus genetics and taxonomy. Proceedings of the 7th International Citrus Congress 1: 225-228.

Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Crozier, A., 2003. Antioxidant actions and phenolic and vitamin contents of common Mauritian exotic fruits Journal of the Science of Food and Agricultural, 83 (5) 496–502.

Maccarone, E., Maccarrone, A., Perrini, G., Rapisarda, P., 1983. Anthocyanins of the moro orange juice. Annali di Chimica 73: 533-539.

Maccarone, E., Maccarrone, A., Rapisarda, P., 1985a. Acylated anthocyanins from oranges. Ann. Chim. (Rome) 75, 79 – 86.

Maccarone, E., Maccarrone, A., Rapisarda, P., 1985b. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. J. Food Sci. 50, 901-904.

Mahan, K., Escott-Stump, S., Raymond, J., 2013. Krause Dietoterapia. Elsevier, España; 245-249.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L., 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. The American Journal of Clinical Nutrition, 79(5), 727-747.

Manthey, J.A., Guthrie, N., Grohmann, K., 2001. Biologicalproperties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. Current Medicinal Chemistry, 8: 135-153.

MAPAMA. 2017a. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/encuestas-plantaciones-arboles-frutales/ [Última consulta 12/02/2017]

MAPAMA, 2017b. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. http://www.mapama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/default.aspx [Última consulta 18/03/2017]

MAPAMA. 2017c. Boletín de estadística Mensual febrero 2017. Edición © Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente Secretaría General Técnica Centro de Publicaciones. http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/03181.pdf. [Última

consulta 16.04.2017].

MAPAMA. 2017d. Panel de Consumo: Bases de datos panel de consumo en hogares. Nueva base de datos 2013 y 2014. Ver: http://www.mapaama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/base-de-datos-de-consumo-en-hogares/consulta.asp

MAPAMA. 2017e. Las variedades de cítricos. El material vegetal y el registro de variedades comerciales de España. http://www.mapama.gob.es /es/ministerio/servicios/publicaciones/ Variedades_de_Citricos_primeras_p%C3%A1ginas_tcm7-212147.pdf

Márquez, M., Yépez, C.E., Sútil-Naranjo, R., Rincón, M., 2002. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E y A. Invest Clin 43(3): 191-204.

Martí, N., Mena, P., Cánovas, J. A., Micol, V., Saura, D., 2009. Vitamin C and the role of citrus juices as functional food. Natural Product Communications, 4(5), 677-700.

Matos-Chamorro, A., Chambilla-Mamani, E., 2010. Importancia de la fibra dietética, sus propiedades funcionales en la alimentación humana y en la industria alimentaria. Ciencia y Tecnología de los Alimentos 1: 4-17.

Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia Univ. Press, New Yorkmbridge, Mass.

Mayr, E.1991 One long, argument, Charles Darwin and the génesis of modern evolutionary through. Harvard University Press

Mayr, E., 1999. Conceptos y métodos en el estudio de la filogenia. Bol. SEA (Sociedad Entomológica Aragonesa), 26: 35-39

Mayumi, V., Alves, G., Alves, J., 2014. Citrus bioactive phenolics: Role in the obesity treatment. Food Science and Technology, 59, 1205-1212.

Mazza, G., Miniati, E., 1993. Grapes. Anthocyanins in fruit vegetables and grains, CRC Press Inc., Boca Raton, 149-199.

Meléndez-Martínez, A. J.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. 2007. Review: analysis of carotenoids in orange juice. J. Food Compos. Anal. 20, 638−649.

Meléndez-Martínez, A. J.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. 2007b. Rapid assessment of vitamin A activity through objective color measurements for the quality control of orange juices with diverse carotenoid profiles. J. Agric. Food Chem., 55, 2808−2815.

Meléndez-Martínez, A. J.; Britton, G.; Vicario, I. M.; Heredia, F. J. Does the carotenoid neoxanthin occur in orange juice? Food Chem. 2008, 107, 49−54.

Meléndez-Martínez, A. J., Gómez-Robledo, L., Melgosa, M., Vicario, I. M., Heredia, F. J., 2011. Color of orange juices in relation to their carotenoid contents as assessed from

different spectroscopic data. Journal of Food Composition and Analysis, 24(6), 837-844.

Meskin, M.S., Bidlack, W.R., Davies, A.J., Omaye, S.T., 2002. Phytochemicals in nutrition and health. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, 46-60.

Middleton, E., Kandaswami, C., 1994. Potential health-promoting properties of citrus flavonoids. Food Technology, 48(11), 115-119.

Milenkovic, D., Deval, C., Mazur, A., Morand, C. 2011. Hesperidin displays relevant role in the nutrigenomic effect of orange juice on blood leukocytes in human volunteers: a randomized controlled cross-over study. Plos One 6: e26669.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I. Clorofilas y carotenoides en tecnología de los alimentos. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, 1997.

Mitrou, P. N., Kipnis, V., Thiebaut, A. C., Reedy, J., Subar, A. F., Wirfalt, E., 2007. Mediterranean dietary pattern and prediction of all-cause mortality in a US population: results from the NIH-AARP Diet and Health Study. Arch Intern Med, 167(22), 2461-2468.

Miyake, Y., Mochizuki, M., Okada, M., Hiramitsu, M., Morimitsu, Y., Osawa, T., 2007 Isolation of Antioxidative Phenolic Glucosides from Lemon Juice and Their Suppressive Effect on the Expression of Blood Adhesion Molecules. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 71, 8, 1911-1919.

Moco, S., Capanaglu, E., Tikunov, Y., Bino, R., Boyacioglu, D., Hall, R., Vervoort, J., De Vos, R., 2007. Tissue specialization at the metabolite level is perceived during the development of tomato fruit. Journal of Experimental Botany, 58 (15-16): 4131-4146.

Morales, P., Carvalho, A.M., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Molina, M., Ferreira, I.C., 2012. Tocopherol composition and antioxidant activity of Spanish wild vegetables. Genetic Resources and Crop Evolution, 59(5), 851-863.

Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., Carvalho, A.M., Fernández-Ruiz, V., Sánchez-Mata, M.C., Cámara, M., Morales, R., Tardío, J., 2013. Wild edible fruits as a potential source of phytochemicals with capacity to inhibit lipid peroxidation. European Journal of Lipid Science and Technology, 115, 2,176–185.

Morales, P., Barros, L., Dias, M. I., Santos-Buelga, C., Ferreira, I. C., Asquieri, E. R., & Berrios, J. D. J. 2016. Non-fermented and fermented jabuticaba (*Myrciaria cauliflora Mart.)* pomaces as valuable sources of functional ingredients. Food chemistry, 208, 220-227.

Morand, C., Dubray, C., Milenkovic, D., Lioger, D., Martin, J.F., Scalbert, A., Mazur A. 2011. Hesperidin contributes to the vascular protective effects of orange juice: a randomized crossover study in healthy volunteers. Am J Clin Nutr, 93, 73-80.

Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C., 2013. Tablas de composición de alimentos. Guía de prácticas. 16ª ed. Madrid: Pirámide.

Moufida, S., Marzou, B. 2003. Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange, Phytochemistry, 62: 1283–1289

Naczk, M., Shahidi, F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. J. Pharm. Biomed. Anal., 41, 1523–1542.

Nakajima, A., Ohizumi, Y., Yamada, T. 2014. Anti-dementia Activity of Nobiletin, a Citrus Flavonoid: A Review of Animal Studies. Clin Psychopharmacol Neurosci. 12(2): 75–82.

Ndhlala, A. R., Moyo, M., Van Staden, J., 2010. Natural antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules. Molecules, 15(10), 6905-6930.

Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., Malfa, S.L., Continella, G., Tribulato, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theoretical and Applied Genetics 100: 1155-1166.

Nicolosi, E. 2007. Origin and taxonomy. En KHAN, I.A. Citrus Genetics, Breeding, and Biotechnology. CABI Head Office, Wallingford, UK. 19-43.

Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohta, H., 2006. Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 70: 178-192.

Nour, V., Trandafir, I., Ionica, M.E. 2010. HPLC Organic Acid Analysis in Different Citrus Juices under Reversed Phase Conditions. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj 38 (1), 44-48.

Ogita, H., Liao, J., 2004. Endothelial function and oxidative stress. Endothelium. 11(2):123-32. Review.

Olives, A.I., Cámara, M., Sánchez, M.C., Fernández, V., López, M., 2006. Aplication of UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and b-carotene. Food Chemistry, 95, 328-336.

Olmedilla (a), B., Granado F., Blanco, I., 2001. Carotenoides y salud humana. Fundación Española de la Nutrición (FEN).

Olmedilla (b), B., Granado, F., Blanco, I., Vaquero, M., Cajigal, C. 2001. Lutein in patiens with cataracts and age-related macular degeneration: a long-term supplementation study. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81(9), 904-909.

Olson, R.E., 1988. D-Limonene, an anticarcinogenic terpene. Nutrition Reviews, 46, 363-5.

Palencia, Y., 2010. Sustancias bioactivas en los alimentos. Zaragoza: UNIZAR.

Palomar, A. 2004. La despensa de Hipócrates. Editorial Txalaparta S.L. España.

Pamplona, J., 2003. Salud por los alimentos. Safeliz. Madrid. 102-103.

IVIA, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Fichas varietales de cítricos. http://www.ivia.gva.es/variedades/. Fecha de consulta: 26/03/2017. J. Pardo, G. Soler y

A. Buj; J. Soler, S. Zaragoza, A. Medina, R. Bellver, T. Mares, L. Gavila y P. Aleza.

Peiró, R., 2007. Cambios en los nutrientes y compuestos fitoquímicos asociados al procesado osmótico de frutas y su estabilidad en un producto gelificado. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.

Pérez, Y. 2004. Eventos fisiológicos asociados a la madurez y calidad de los frutos cítricos en Cuba y su relación con los productos transformados de la industria. Instituto de Investigaciones de fruticultura Tropical. Informe para FAO: http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1067/cuf0114s.pdf

Pérez, Z.O., 2004. Concentración nutrimental en hojas, rendimiento, eficiencia de producción, calidad de jugo e índices nutrimentales de naranjo Valencia injertado en portainjertos de cítricos. Agrociencia. 38: 141-154.

Pérez, P., 2012. Prevención del Cáncer de Mama: Factores de Riesgo y Factores Protectores Modificables. Revisión y Recomendaciones en Educación para la Salud (EpS).

Perry, R.J., Watson, P., Hodges, J.R., 2000. The nature and staging of attention dysfunction in early (minimal and mild) Alzheimer's disease: relationship to episodic and semantic memory impairment. Neuropsychologia, 38: 252-271.

Petersen, M.A., Berends, H., 1993. Ascorbic acid and dehydroascorbic acid content of blanched sweet green peppers during chilled storage in modified atmospheres. Z. Lebensm Unters Forsch. 197, 546-549.

Peterson, J., Dwyer, J., 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. Nutrition Research, 18(12), 1995−2018.

Peterson, J., Beecher, G.R., Bhagwat, S.A., Dwyer, J.T., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D.B., Holden, J.M., 2006. Flavanones in grapefruit, lemons and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. Journal of Food Composition and Analysis, 19, 74-80.

Plourde, M., Cunnane, S., 2007. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: Implications for their dietary essentiality and use as supplements. Applied Physiology, Nutrition & Metabolism, 32(4), 619–634

Pollock, M. L., Franklin, B. A., Balady, G. J., Chaitman, B. L., Fleg, J. L., Fletcher, B., Bazzarre, T., 2000. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine. Circulation, 101(7), 828–833.

Poulose, S.D., Harris, E.S., Patil, B., 2006. Antiproliferative Effects of Citrus Limonoids Against Human Neuroblastoma and Colonic Aenocarcinoma Cells. NUTRITION AND CANCER, 56(1), 103-112.

Prior, R.L. 2003. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. Am. J. Clin. Nutr., 78, 570-578.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(10), 4290-4302.

Puga, F.L., Urquiaga, I. 2010. The Mediterranean Diets: Nutrition and Gastronomy. Chapter 15 of Functional Food Product Development. (Ed. J. Smith and E. Charter), Wiley-Blackwell, Oxford, UK.

Quiñonez, G.H., 2015. Evaluación de flavonoides y actividad antioxidante en la obtención de pulpa concentrada en dos estadíos de madurez del fruto silvestre jarjancha-zarzamora (Rubus sp.). Revista de Investigación en Educación y Tecnología del GMPS "Docentes Investigadores" de la Facultad de Ciencias Aplicadas de la UNCP. YATRAYNIYU 76 Vol. 2 N°1 75-84.

Ramful, D., Bahorun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., Aruoma., O.I., 2010. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potencial prophylactic ingredients for functional foods application. Toxicology, 278: 75-87.

Rao, A. V., Rao, L. G., 2007. Carotenoids and human health. Pharmacological Research, 55(3), 207-216.

Rapisarda, P., Intelisano, S., 1996. Sample preparation for vitamin C analysis of pigmented orange juices. Italian Journal of Food Science, 8(3), 251–256.

Rapisarda, P., Carollo, G., Fallico, B., Tomaselli, F., Maccarone, E., 1998. Hydroxycinnamic acids as markers of Italian blood orange juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(2), 464–470.

Rapisarda, P., Tomaino, A., Lo Cascio, R., Bonina, F., de Pasquale, A., & Saija, A., 1999. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47, 4718–4723.

Rapisarda, P., Bellomo, S.E., Intrigliolo, F., 2001, Anthocyanins in blood orange: Composition and biological activity. Recent Research Development in Agricultural and Food Chemistry 5: 217-230.

Rapisarda, P., Lo Bianco, M., Pannuzzo, P., Timpanaro, N., 2008. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [Citrus sinensis (L.) Osbeck]. Postharvest Biology and Technology 49, 348–354.

Reglamento (CE) Nº 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo de la UE de 25 de octubre de 2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor. Boletín Oficial del Estado, nº 304, (22-11-2011).

Reische, D.W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R.R., Akoh, C.C., Min, D.B., 2002. Antioxidants. En C.C. Akoh y D.B. Min, Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology, Second Edition, Revised and Expanded 489-516). New York: Marcel Dekker, INC.

Rekha, C., Poornima, G., Manasa, M., Abhipsa, V., Devi, P.J., Kumar, V.H.T., Kekuda, P.T.R. 2012. Ascorbic Acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe Citrus fruits. Chemical Science Transactions. 1(2) : 303-310.

Risch, B., Herrmann, K., Wray, V., 1988. (e)-0-p-coumaroyl-, (e)-0-feruloyl-derivatives of

glucaric acid in citrus. Phytochemistry, 27, 10: 3327-3329.

Riso, P., Visioli, F., Gardana, C., Grande, S., Brusamolino, A., Galvano, F., Galvano, G., Porrini, M. 2005. Effects of blood orange juice intake on antioxidant bioavailability and on different markers related to oxidative stress. J Agric Food Chem, 53, 941-947.

Robbins, R. J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(10), 2866-2887.

Robinson, D., Calvo, M., Sevillano, E., 1991. Bioquímica y valor nutritivo de los alimentos. Acribia. Zaragoza.

Rock, C.L. 2009. Carotenoids and Cancer; en Carotenoids. Volumen 5: Nutrition and Health (Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. ed.) Birkhäuser Basel, 269-286.

Rodríguez, M.V., Guzmán, S., Andrade, E. y Hernández, D. (2010). Evaluación de las propiedades fisicoquímicas y funcionales de jugo obtenido mediante tratamiento enzimático en zarzamora comercial (Rubus Spp) del estado de Michoacán.

Rodríguez-Rivera, M. P., Lugo-Cervantes, E., Winterhalter, P., Jerz, G., 2014. Metabolite profiling of polyphenols in peels of Citrus limetta Risso by combination of preparative high-speed countercurrent chromatography and LC–ESI–MS/MS, Food Chemistry 158, 139-152.

Rojas-Argudo, C., Palou, L., Cano, A., Del Río, M.A., González-Mas, M.A., Bermejo, A., 2007. Efecto de la aplicación de rayos x a dosis moderadas sobre los componentes bioactivos de mandarinas clemenules. Rev. Iber. Tecnología Postcosecha Vol 8(2):74-81.

Romero, A. C., Hernández, E. G. O., Cerón, T. F., Chávez, A. Á., 2013. The Exogenous Antioxidants. En J.A. Morales-Gonzalez, Oxidative stress and chronic degenerative diseases a role for antioxidants. Ed. Prof. Dr. José A. Morales-González Área Académica de Farmacia, México.

Roowi, S., Crozier, A., 2011. Flavonoids in tropical citrus species. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 12217−12225.

Roussos, P.A. 2011. Phytochemicals and antioxidant capacity of orange (Citrus sinensis (l.) Osbeck cv. Salustiana) juice produced under organic and integrated farming system in Greece.Scientia Horticulturae 129: 253–258

Russell, W., Duthie, G., 2011. Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. Proceedings of the Nutrition Society, 70(03), 389-396.

Sánchez-Mata. M.C., Peñuela-Teruel. M.J., Cámara-Hurtado. M.M., Díez-Marqués. C, Torija-Isasa., 1998. M.E. Determination of Mono-, Di-, and Oligosaccharides in Legumes by High-Performace Liquid Crhomatography Using an Amino-Bonded Silica Column. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46, 3648-3652.

Sánchez-Mata, M.C., Cámara-Hurtado, M., Diez-Marques, C., Torija-Isasa, M.E., 2000. Comparison of HPLC and spectrofluorimetry for vitamin C analysis of green beans. European Food Research International, 210, 220–225.

Sánchez-Mata, M.C., Cabrera Loera, R.D., Morales, P., Fernández-Ruiz, V., Cámara, M., Díez Marqués, C., Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J., 2012. Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds. Genetic Resources and Crops Evolution, 59, 431–443.

Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., 1998. Principales métodos para la determinación de la oxidación lipídica. Maine métodos usted in lípido oxidación determinación. Food Science and Technology International, 4(6), 391-399.

Sánchez-Moreno, C., Cano, M.P., Ancos, B., Plaza, L., Olmedilla, B., Granado, F., Martín, A. 2003. High-pressurized orange juice consumption affects plasma vitamin C, antioxidative status and inflammatory markers in healthy humans. J Nutr, 133, 2204-2209.

Sánchez-Moreno, S., Minoshima, H., Ferris, H., Jackson, L.E., 2006. Linking soil properties and nematode community composition: effects of soil management on soil food webs. Nematology 8: 703–715.

Scalbert, A., Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. The Journal of Nutrition, 130(8), 2073S-2085S.

Scalzo, R., Iannoccari, T., Summa C., Morelli, R. Rapisarda P., 2004. Effect of thermal treatments on antioxidant and antiradical activity of blood orange juice. Food Chemistry 85 : 41–47.

Schieber A., Carle R. 2005. Occurrence of carotenoid cis -isomers in food: Technological, analytical, and nutritional implications. Trends in Food Science & Technology, 16, 416–422.

Schoch, T.K., Manners, G.D., Hasegawa, S., 2001. Analysis of Limonoid Glucosides from Citrus by Electrospray Ionization Liquid Chromatography−Mass Spectrometry. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49, 1102–1108.

Scora, R.W. 1975. On the history and origin of Citrus. Bulletin of the Torrey Botanical Club 102: 369-375.

Sdiri, S., Navarro, P., Monterde, A., Benabda, J., Salvador, A., 2012. New degreening treatments to improve the quality of citrus fruit combining different periods with and without ethylene exposure. Postharvest Biology and Technology 63: 25–32.

SENC. Sociedad Española De Nutrición Comunitaria. 2016. Guías alimentarias para la población española. La nueva pirámide de la alimentación saludable. Nutrición Hospitalaria. 33 (Supl. 8):1-48.

Shahidi, F., Naczk, M., 1995. Food phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications, Technomic Publishing Company Inc., Lancaster PA., 231- 245.

Shahidi, F., 2004. Functional foods: their role in health promotion and disease prevention. J. Food Sci. 69: R146-R149.

Simón-Grao, S., Gimeno, V., Simón, I., Lidón, I., Nieves, M., Balal, R.M., Carbonell-Barrachina, A.A., Manera, F.J., Hernández, F., García-Sánchez, F., 2014. Fruit quality characterization of eleven commercial mandarin cultivar in Spain. Scientia Horticulturae, 165, 274-280.

Sites, J.W., Reitz, H.J., 1949. The variation in individual Valencia oranges from different

locations of the tree as a guide to sampling methods and spot-picking for quality. Part I. Soluble solids in the juice. Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 54: 1–9.

Skrede, C., Wrolstad, R. E., 2002. 3 Flavonoids from Berries and Grapes. Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects, volume 2, 2-71. Boca Raton: CRC Press.

Slattery, M. L., Benson, J., Curtin, K., Ma, K.N., Schaeffer, D., Potter, J.D. (2000). Carotenoids and colon cancer. American Journal of Clinical Nutrition, 71, 575-582.

Soler Aznar J. 1999. Reconocimiento de variedades de cítricos en campo. Serie de Divulgación científica. Conselelria de Agricultura Pesca y Alimentación. Dirección general de investigación, desarrollo tecnológico y sanidad vegetal.

Soto, J., 2005. Detección de Fitoquímicos, contenido de Vitamina C y Ácido fólico en Chironja (Citrus sinensis x Citrus paradisi) injertada en diferentes patrones de cítrica. Tesis Doctoral. Universidad de Puerto Rico. Recinto Universitario de Mayagüez.

Soto-Vaca, A., Gutiérrez, A., Losso, J. N., Xu, Z., Finley, J. W., 2012. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(27), 6658-6677.

Souci, S.W., Fachmann, W., y Kraut, H., 2008. Food Composition and Nutrition Tables.7th edition. Stuttgart: Medpharm.

Sugiura, M., Ohshima, M., Ogawa, K., Yano, M., 2005. Chronic Administration of Satsuma Mandarin Fruit (Citrus unshiu MARC.) Improves Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat Liver. Department of Citrus Research, National Institute of Fruit Tree Science; 485–6 Okitsunaka-cho, Shimizu, Shizuoka 424–0292, Japan.

Sugiura, M., Nakamura, M., Ogawa, K., Ikoma, Y., Ando, F., Shimokata, H., Yano, M. 2011. Dietary patterns of antioxidant vitamin and carotenoid intake associated with bone mineral density: findings from post-menopausal Japanese female subjects. Osteoporosis Int., 22, 143-152.

Sun, Y., Shen, Y., Liu, D., Ye, Y. 2015. Effects of drying methods on phytochemical compounds and antioxidant activity of physiologically dropped un-matured citrus fruits. LWT - Food Science and Technology 60: 1269 – 1275.

Swingle, W.T., Reece, P.C. 1967. The botany of Citrus and its wild relatives. The Citrus Industry. Volume 1. University of California, Berkeley, USA. 190-430.

Tadeo, F., J.L. Moya, D. Iglesias, M. Talón, E. Primo-Millo. 2003. Histología y citología de cítricos. Generalitat Valenciana, Valencia, España.

Tian, Q., Ding, X., 2000. Screening for limonoid glucosides in citrus tangerina (Tanaka) Tseng by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 874(1), 13–19.

Ting, S. V. 1980. Nutrients and nutrition of citrus fruits. In Citrus Nutrition and Quality (S. Nagy and J. A. Attaway, Ed.), pp. 3-24. ACSSymp. Ser. 143.

Tomás-Barberan, F.A., Martos, I., Ferreres, F., Radovic, B.S., Anklam, E., 2001. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys, J. Sci. Food Agric. 81, 485–496.

Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I., Cremin, P., Waterhouse, A.L., Hess-Pierce, B., Kader, A.A., 2001. HPLC–DAD–ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and

plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4748-4760.

Tounsi, M.S., Wannes, W.I. Ouerghemmi, I. Jegham, S., Njima, Y.B., Hamdaoui, G., Zemnib, H., Marzouka, R. 2010. Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. Published online inWiley Online Library (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.4164.

Torres, A.M., Soost, R.K., Diedenhofen, U. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. American Journal of Botany 65: 869-881.

Trichopoulou, A., Katsouyanni, K., Gnardellis, C. H., 1993. The traditional Greek diet. European Journal of Clinical Nutrition, 47, S76.

Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco, M., 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food Chemistry 104: 466-479.

Trumbo, P., Schlicker, S., Yates, A. A., Poos, M., 2002. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Journal of the American Dietetic Association 102, 1621−1630.

Tsao, R., 2010. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients, 2(12), 1231-1246.

Tucker, G.A., Grierson, D., 1987. Fruit ripening. In: D.D. Davies (cd.). The biochemistry of plants 12: 265-317. Academic, New York.

Tucker, J.M., Townsend, D.M., 2005. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. Biomed Pharmacother. 59: 380–7.

Turner, T., J. Burry, B., 2013. Potential Nutritional Benefits of Current Citrus Consumption. Agriculture, 3, 170-187.

Ugartondo, V., 2009. Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis doctoral. Facultad de farmacia. Universidad de Barcelona. Barcelona.

Urango-Marchena, L.A., 2009. Efecto de los compuestos bioactivos de algunos alimentos en la salud, Perspectivas en Nutrición Humana, 11, 1, 27-38.

USDA, 2015. USDA National. Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. Nutrient Data Laboratory. Recuperado de: http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl USDA.

Vandercook, C. E. 1977. Organic acids. In Citrus Science and Technology (S. Nagy, P. E. Shaw, and M. L. Veldhuis, Eds.), pp. 208-228.

Vázquez-Martínez, C.; Cos, A.; Lopez-Nomdedeu, C. 2005. Alimentación y nutrición: manual teórico-práctico. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. 40.

Vikram, A., Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S., 2007. Simultaneous determination of citrus limonoid aglycones and glucosides by high performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta 590, 180-186.

Vladimir-Knežević, S., Blaženković, B., Bival Štefan, M., Babac, M., 2012. Plant Polyphenols as Antioxidants Influencing the Human Health. Photochemical as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health, 9, 155-180.

Von Doering, W. E., Sotiriou-Leventis, C., Roth, W. R. 1995. Thermal interconversions among 15- cis,13-cis, and all-trans-b-carotene: Kinetics, Arrhenius parameters, thermochemistry, and potential relevance to anticarcinogenicity of all-trans-b-carotene. Journal of the American Chemical Society,117,2747–2757.

Webber, H.J., Reuther, W., Lawton, W. 1967. History and development of the Citrus industry. The Citrus Industry. Volume 1. University of California, Berkeley, USA. 1-39.

Weedon, B.C.L., Moss G.P. (1995). Structure and nomenclature en carotenoids. Volume 1A: Isolation and Analysis (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H., ed.). Birkhäuser, Basel, Switzerland. 27-70.

West, C.E., Poortvliet, E.J., 1993. The carotenoid content of foods with special reference to developing countries. Vitamin A Field Support Project.

Wiczkowski, W., Piskula, M. K., 2004. Food flavonoids. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 13(54), 101-114.

Willett, W.C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E., Trichopoulou, D., 1995. Mediterranean Diet pyramid: a cultural model for healthy eating. American Journal of Clinical Nutrition, 61 (suppl), 1402S-1406S.

Williamson, G., 1996. Protective effects of fruits and vegetables in the diet. Nutrition & Food Science, 96(1), 6-10.

Wills, T.A., 1985. Supportive Functions of Interpersonal Relationships. En: Cohen y Syme. Social Support and Health. Acdemic Press. London.

Wu, G.A., Prochnik, S., Jenkins, J., Salse, J., Hellsten U., Murat, F., Perrier, X., Ruiz, M., Scalabrin, S., Terol, J., 2014. Sequencing of diverse mandarin, pummelo and orange genomes reveals complex history of admixture during citrus domestication. Nat Biotechnol. 32: 656–662.

Xi, W., Fang, B., Zhao, Q., Jiao, B., Zhou, Z., 2014. Flavonoid composition and antioxidant activities of Chinese local pummelo (Citrus grandis Osbeck.) varieties. Food Chemistry, 161, 230–238.

Xu, J., Tao, N., Liu, Q., Deng, X. 2006. Presence of diverse ratios of lycopene/b-carotene in five pink or red-fleshed citrus cultivars. Scientia Horticulturae, 108: 181–184.

Xu, Q., Chen, L., L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., 2013. The draft genome of sweet orange (Citrus sinensis). Nat. Genet. 45 59–66.

Yahia, E.M., 2011. Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. Volume 3: Cocona to Mango. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge, UK.

Yang, X.Y., Wang, L.C., Yuan, D.J., Lindsey, K., Zhang, X.L., 2013. Small RNA and

degradome sequencing reveal complex miRNA regulation during cotton somatic embryogenesis. Journal of Experimental Botony 64, 1521–1536.

Yeum, K.J., Aldini, G., Russell, R.M., Krinsky, N.I. 2009. Antioxidant/Pro-oxidant Actions of Carotenoids. En "Carotenoids, vol. 5: utrition and ealth". Britton G. iaaen-Jensen S, Pfander H. (Eds.). Birkhauser Verlag, Basel, 235-268.

Zaragoza, S. 2007. Aproximación a la historia de los cítricos: Origen, dispersión y evolución de su uso y cultivo. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

Zhang, J., Carlos, H., Tapia, J., Hu, Y., Jones, J., Wang, N., Liu, S., White, F.F., 2016. Homologs of CsLOB1 in citrus function as disease susceptibility genes in citrus canker. Mol. Plant Pathol. doi: 10.1111/mpp.12441.

Zouh, Z., Xi, Z., Hu, Y., Nie, C., Zhou, Z. 2016. Review: Antioxidant activity of Citrus fruits. Food Chemistry. Pages 885–896.

7. PUBLICACIONES

PUBLICACIONES

"Aproximación a la caracterización de compuestos funcionales en diferentes variedades de clementinas"
Autores: Cebadera-Miranda, L.; Morales, P.; Fernández-Ruiz, V.; Sánchez-Mata, M.C.; Del Pino, A.; Cámara. M. Actas Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Acta Nº 54, Alimentación y Salud. 1349-1354, 2010.

"Evaluación nutricional, caracterización de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de la pulpa y piel de diferentes variedades de clementinas"
Autores: Morales, P.; Cebadera-Miranda, L.; Fernández-Ruiz, V.; Sánchez-Mata, M.C.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R.; Del Pino, A.; Cámara, M. Actas Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, Acta Nº 71, Alimentación y Salud, 2015. Disponible en: http://www.sech.info/ACTAS/Acta%20n%C2%BA%2071.%20XIV%20Congreso%20Nacional%20de%20Ciencias%20Hort%C3%ADcolas/Alimentacio%CC%81n%20y%20Salud/Evaluacio%CC%81n%20nutricional,%20caracterizacio%CC%81n%20de%20compuestos%20bioactivos%20y%20actividad%20antioxidante%20de%20la%20pulpa%20y%20piel%20de%20diferentes%20variedades%20de%20clementinas.pdf.

"Estudio del color en variedades de naranjas pigmentadas [Citrus Sinensis (L.) Osbeck.]: antocianinas y carotenoides"
Autores: Cebadera-Miranda, L.; Domínguez, L.; Morales, P.; Fernández-Ruiz, V.; Sánchez-Mata, M.C.; Barros, L.; Ferreira, I.C.F.R.; Del Pino, A.; Cámara, M. Actas Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Aceptado, en prensa. Alimentación y Salud, 2017.

"Nutritional composition, bioactive compounds and antioxidant properties of pulp and peels by-product of Spanish clementine extra early varieties (*Citrus clementina* Hort ex Tan.)"
Autores: Cebadera-Miranda, L.; Dias, M.I.; Barros, L.; Morales, P.; Fernández-Ruiz, V.; Sánchez-Mata, M.C.; Del Pino, A.; Santos-Buelga, C. Ferreira, I.C.F.R.; Cámara, M. Food Research International (*in press*).