

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Nutrición y Bromatología II. Bromatología**



**TESIS DOCTORAL**

**Efecto del tratamiento de altas presiones hidrostáticas y del almacenamiento sobre la seguridad y la calidad nutricional, sensorial y funcional de smoothies como alternativa a las bebidas mixtas comerciales**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Víctor Andrés Martín**

Directores

**M<sup>a</sup> Dolores Tenorio Sanz**  
**M<sup>a</sup> José Villanueva Suárez**

Madrid, 2016



**FACULTAD DE FARMACIA**

**Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología**

**TESIS DOCTORAL**

**EFECTO DEL TRATAMIENTO DE ALTAS  
PRESIONES HIDROSTÁTICAS Y DEL  
ALMACENAMIENTO SOBRE LA SEGURIDAD  
Y LA CALIDAD NUTRICIONAL, SENSORIAL  
Y FUNCIONAL DE SMOOTHIES COMO  
ALTERNATIVA A LAS BEBIDAS MIXTAS  
COMERCIALES**

**VÍCTOR ANDRÉS MARTÍN**

**Bajo la dirección de:**

**M<sup>a</sup> Dolores Tenorio Sanz**

**M<sup>a</sup> José Villanueva Suárez**

**Madrid, 2015**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA

-----  
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II  
Bromatología

**M<sup>a</sup> DOLORES TENORIO SANZ Y M<sup>a</sup> JOSÉ VILLANUEVA SUÁREZ,  
PROFESORAS TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE NUTRI-  
CIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA, DE LA FACUL-  
TAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE  
MADRID.**

**CERTIFICAN QUE:**

**D. Víctor Andrés Martín**, ha realizado bajo nuestra dirección y en este Departamento el trabajo que lleva por título **“Efecto del tratamiento de altas presiones hidrostáticas y del almacenamiento sobre la seguridad y la calidad nutricional, sensorial y funcional de smoothies como alternativa a las bebidas mixtas comerciales”** que constituye su Memoria de Tesis Doctoral. Dicho trabajo reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmamos el presente certificado en Madrid a veintitrés de noviembre de dos mil quince.

**M<sup>a</sup> Dolores Tenorio Sanz**

**M<sup>a</sup> José Villanueva Suárez**





UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA

-----  
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA II  
Bromatología

**M<sup>a</sup> DOLORES TENORIO SANZ, PROFESORA TITULAR Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA II: BROMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.**

**CERTIFICA:**

Que la Memoria presentada por el Licenciado **D. Víctor Andrés Martín** titulada **“Efecto del tratamiento de altas presiones hidrostáticas y del almacenamiento sobre la seguridad y la calidad nutricional, sensorial y funcional de smoothies como alternativa a las bebidas mixtas comerciales”** se ha realizado en este Departamento bajo la dirección de las **Dras. M<sup>a</sup> Dolores Tenorio Sanz y M<sup>a</sup> José Villanueva Suárez**, y reúne los requisitos legales establecidos para su correspondiente defensa.

Y para que conste a los efectos oportunos firmo el presente certificado en Madrid, a veintitrés de noviembre de dos mil quince.

**M<sup>a</sup> Dolores Tenorio Sanz**



*“Caminante, no hay camino,  
se hace camino al andar”*

**Antonio Machado**



# AGRADECIMIENTOS





En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis Directoras de Tesis, M<sup>a</sup> Dolores Tenorio Sanz y M<sup>a</sup> José Villanueva Suárez. Si este trabajo es hoy una realidad es por vuestra constante dedicación y sobre todo por la motivación y apoyo que me habéis ofrecido en todo momento. Aparte de dos excelentes investigadoras y profesionales sois dos personas extraordinarias. Creo que nunca podré estaros lo suficientemente agradecido. Ojalá este sea el principio de muchos años trabajando juntos.

Quisiera agradecer también al personal del Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología por la ayuda que me habéis brindado desde que entré allá por finales de 2010 con la Beca de Colaboración. Gracias en especial a Inma, no sólo por tu ayuda profesional sino también por haberme hecho pensar con claridad en los momentos en que era complicado ver la luz. Gracias también a Araceli y al resto de profesores por vuestros sabios consejos y palabras de ánimo. Cómo no a Rebeca, por esos cafés en las escaleras de la Facultad arreglando el mundo. Y a Marta, Marcos y Giulia por los meses que coincidimos.

Muchas gracias a la gente del Laboratorio de Salud Pública de Madrid por estos tres años increíbles haciéndome disfrutar con mi trabajo. A Emiliano y Alberto por creer en mí. A Justina, por ser mi mentora y alguien con una calidad humana excepcional. A Julia, por enseñarme a trabajar en un laboratorio y los entresijos de la espectrometría de masas. A Javi, por ayudarme con el análisis de minerales y guiarme con los criterios de calidad de la 17025. A la Unidad de Microbiología, por echarme una mano con las muestras, siempre con una sonrisa. A Sara, Julio, Montse y Marisol por vuestro apoyo. A Mila y Ambra, que aunque ya no estéis aquí, no sabéis cuánto os echo de menos.

Muchas gracias a Laura y Eva, del Centro para la Calidad de los Alimentos del INIA de Soria, por hacerme sentir más en casa si cabe durante mi estancia allí. A Pilar Rupérez, por el análisis de los aniones en el Instituto del Frío, y a Ricardo por el asesoramiento estadístico. Gracias también a Pancho, Beatriz, Diego y David de Hiperbaric por dejarme procesar los *smoothies*, por la ayuda y las facilidades ofrecidas y el buen trato mostrado en todo momento.

Millones de gracias a mis amigos por aguantarme todo este tiempo, por animarme, por escucharme y por estar ahí siempre que lo he necesitado. Gracias Beito, Clara, Bárbara, Tere, Bea e Isa, sois lo mejor que me ha dado el San Luis. Irene, Javi, Pilar, Patri, Vega, Marisa, Laura, Ana y demás gente del grupo, gracias por contribuir a que la carrera de Farmacia fuera más bonita aún. Mención especial al artista del grupo, Varete, por maquetar esta memoria. Gracias a Javi y a Fran, por todas las historias vividas este año.

Sobre todo gracias a mi familia, la mejor del mundo, porque es quien realmente ha vivido conmigo todo este proceso. En especial a mis primas Tania y Cris, a mis tíos y abuelos por preocuparos por cómo iba todo y a mi hermano, porque estoy orgulloso de ti. Pero si de verdad tengo que agradecer algo a alguien es a mis padres, por la educación que me habéis dado y los valores que me habéis transmitido. Os quiero.

Como seguro que me dejo a alguien, quiero agradecer también a todas aquellas personas que de una manera u otra, consciente o inconscientemente, habéis contribuido a que esta Tesis pueda ver la luz.

**A todos. Gracias. Siempre.**



**A Dolores**



# ÍNDICE ● ● ● ● ● ●

Resumen .....	15
Abstract.....	21
Abreviaturas y acrónimos .....	27
Índice de tablas.....	31
Índice de figuras .....	35
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN .....	39
Capítulo 2: OBJETIVOS .....	69
Capítulo 3: DISEÑO EXPERIMENTAL.....	73
Capítulo 4: MÉTODOS ANALÍTICOS .....	83
Capítulo 5: PUBLICACIONES.....	99
Capítulo 6: DISCUSIÓN .....	107
Capítulo 7: CONCLUSIONES.....	163
Capítulo 8: BIBLIOGRAFÍA.....	169



# RESUMEN





## **Efecto del tratamiento de altas presiones hidrostáticas y del almacenamiento sobre la seguridad y la calidad nutricional, sensorial y funcional de *smoothies* como alternativa a las bebidas mixtas comerciales**

El consumidor actual, cada vez más concienciado de la estrecha relación entre la alimentación y la salud, busca alimentos mínimamente procesados, apetecibles, de fácil consumo y con propiedades funcionales. En este sentido, las bebidas refrescantes mixtas y los *smoothies* suponen una opción para satisfacer estas necesidades. Además, la aplicación de tecnologías de conservación alternativas a la pasteurización tradicional, entre las que destacan las altas presiones hidrostáticas, constituye una revolución en la industria alimentaria, al obtenerse productos seguros que conservan las características funcionales, nutricionales y sensoriales de los alimentos frescos.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral consiste en la evaluación del efecto de las altas presiones hidrostáticas aplicadas a *smoothies* elaborados con leche de vaca y leche de soja así como su modificación durante la vida comercial, bajo la premisa de tratarse de una tecnología más idónea que la tradicional pasteurización con que se procesan los zumos y las bebidas refrescantes mixtas. El fin último es alcanzar un mayor grado de conocimiento en relación a estos nuevos productos y procesos con objeto de establecer futuras guías de normalización, ya que en la actualidad el reconocimiento legal no es claro ni preciso. Previamente se lleva a cabo un estudio de mercado y caracterización de veinticuatro bebidas refrescantes mixtas comerciales a base de fruta y leche o soja como base sobre la que desarrollar las formulaciones de *smoothies*.

Para evaluar el efecto de las altas presiones se desarrollaron dos prototipos de *smoothies* mixtos con productos vegetales (naranja, papaya, melón y zanahoria) por su aporte de compuestos bioactivos con elevado potencial saludable, a los que se les añadió leche de vaca o leche de soja. Las bebidas elaboradas con leche de vaca fueron sometidas a dos intensidades de presión: 450 y 600 MPa, y las formuladas con leche de soja a 550 y 650 MPa. En todos los casos el tiempo y temperatura se mantuvieron constantes: 3 minutos y 20 °C. Para comparar el impacto del tratamiento y del almacenamiento sobre las características evaluadas, los *smoothies* se sometieron paralelamente a un proceso convencional de pasteurización térmica a 80 °C durante 3 minutos. También se ha considerado el efecto del almacenamiento en refrigeración a 4 °C a lo largo de 45 días.

En este trabajo se ha llevado a cabo una profunda investigación de estas bebidas desde cinco puntos de vista: general (pH, acidez, densidad, °Brix y color), nutricional (azúcares, ácidos orgánicos, elementos minerales, aniones y retinol), sensorial (color, aroma, sabor, consistencia y aceptabilidad general), funcional (carotenoides, tocoferoles, ácido ascórbico, polifenoles y capacidad antioxidante asociada a estos compuestos medida por los mecanismos FRAP y DPPH) y microbiológico (aerobios mesófilos, enterobacterias, *E. coli*, *L. monocytogenes*, mohos y levaduras). Los métodos utilizados han sido validados para demostrar su adecuación al fin previsto.

Los resultados obtenidos en este trabajo han sido objeto de seis publicaciones, de las cuales cinco ya se encuentran aceptadas en revistas de reconocido prestigio en el ámbito de la química analítica y de los alimentos, y una sexta se encuentra actualmente en revisión.

Los resultados de la optimización y validación de las metodologías de trabajo utilizadas han sido altamente satisfactorios para su aplicación en el análisis de bebidas mixtas y *smoothies*, tanto en términos de linealidad como de sensibilidad, exactitud y precisión. Los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) han sido en todos los casos superiores a 0,990, con coeficientes de linealidad por encima del 95%. La sensibilidad, medida como límites de detección y de cuantificación, ha resultado suficiente para cuantificar los analitos de interés. La adecuada exactitud queda reflejada por los buenos porcentajes de recuperación obtenidos, situados entre el 88 y el 108%. La precisión, medida como desviación estándar relativa de repetibilidad y de reproducibilidad, ha sido correcta al situarse siempre por debajo del 10%.

Las bebidas refrescantes mixtas a base de frutas y leche o soja comerciales aportan cantidades significativas de nutrientes esenciales, entre los que destaca la sacarosa como principal azúcar. La presencia de ácido cítrico es debida en gran parte a su inclusión como aditivo y la fracción mineral viene representada principalmente por potasio, sulfatos y fosfatos. Las bajas concentraciones de sodio, especialmente en las bebidas con soja, tienen implicaciones positivas para la salud cardiovascular. La fracción vitamínica está integrada por la provitamina A y las vitaminas A, C y E, en su mayoría añadidas por el fabricante en cantidad normalmente superior a la indicada en la etiqueta con objeto de asegurar dicha cantidad a lo largo de la vida útil del producto.

Los resultados del análisis de cata muestran diferencias significativas en los atributos de color, dulzor, acidez y consistencia. Las bebidas integradas por naranja, papaya y mango presentan las coloraciones más intensas y la mayor acidez se relaciona con la mayor proporción de naranja debido al ácido cítrico. Las bebidas elaboradas con soja presentan menor dulzor y mayor consistencia y, junto con las que contienen plátano y naranja, son las de mejor aceptabilidad general. La comparación entre el perfil sensorial y los componentes químicos da lugar a correlaciones positivas entre el porcentaje de concentrado de frutas y su consistencia, así como con componentes naturales de las frutas: fructosa, ácido málico, potasio y fosfato. Se observa también una correlación negativa entre el contenido total de azúcar y el sabor ácido.

Las bebidas refrescantes mixtas a base de frutas y leche o soja comerciales constituyen una buena fuente de compuestos bioactivos (carotenoides, vitaminas C y E y polifenoles) con potencial actividad antioxidante, que deriva en un 98% de los componentes añadidos (vitamina C y  $\beta$ -caroteno) y en un 2% de los componentes naturales (polifenoles). Si bien el contenido de polifenoles totales es significativamente superior en aquellas bebidas que cuentan con naranja, uva, manzana y/o piña en su composición, no se detecta una correlación significativa con el porcentaje de fruta empleado en su elaboración. Aunque el  $\beta$ -caroteno puede tener un origen natural, sobre todo en aquellas muestras que cuentan con naranja y zanahoria entre sus ingredientes, la presencia de este pigmento se debe fundamentalmente a su incorporación artificial como colorante.

Respecto a las bebidas de tipo *smoothie*, los resultados indican que las características físico-químicas y nutricionales permanecen estables tras el tratamiento térmico (80 °C/3 min) y de altas presiones hidrostáticas (450-650 MPa/3 min/20 °C). El análisis conjunto de los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  demuestra que las bebidas presurizadas conducen a modificaciones de color ( $\Delta E$ ) sensiblemente inferiores a las pasteurizadas. Se obtienen también resultados más satisfactorios al evaluar los atributos de aroma y aceptabilidad general tras el tratamiento por altas presiones con respecto al tratamiento térmico.

El contenido de compuestos bioactivos, en los *smoothies* procesados por alta presión es equiparable o incluso superior al de los frescos y tratados térmicamente, con una retención de ácido ascórbico superior al 92% y un incremento de concentración del licopeno,  $\beta$ -caroteno y polifenoles totales, lo que se traduce en una actividad antioxidante superior en las muestras sometidas a altas presiones con respecto a las tratadas térmicamente.

Microbiológicamente, los *smoothies* presurizados muestran una reducción significativa de la población de aerobios mesófilos (más de 3 log ufc/mL), equivalente a la obtenida tras el tratamiento térmico convencional.

Durante el almacenamiento en refrigeración a 4 °C no se ven afectadas las fracciones de azúcares, ácidos orgánicos ni minerales. Respecto al color, en general los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  son menos afectados por el almacenamiento en las muestras sometidas a alta presión frente a las tratadas térmicamente. Los compuestos bioactivos de los *smoothies* tratados por presión son relativamente estables al almacenamiento en comparación con el producto fresco, con pérdidas menores y más graduales que las observadas en las muestras tratadas térmicamente, lo que deriva en valores de capacidad antioxidante superiores en las bebidas tratadas por la tecnología de alta presión. El deterioro microbiano observado en todas las muestras durante el almacenamiento resulta inversamente proporcional a la intensidad de presión aplicada, siendo equiparable la pasteurización a las condiciones más suaves de presión (450 y 550 MPa).

A la vista de todos los resultados se concluye que las bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y leche o, en su caso, extracto de soja suponen una opción interesante para la población infantil y geriátrica por su contribución a la hidratación y por el aporte de nutrientes esenciales y compuestos bioactivos con potencial antioxidante, aunque la presencia de muchos de ellos se debe a la incorporación deliberada como aditivo por el fabricante.

Por su parte, los *smoothies* formulados han demostrado ser ricos en compuestos bioactivos, particularmente licopeno,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico y hesperidina, procedentes de las propias frutas con que se elaboraron. La elevada capacidad antioxidante desarrollada por estos compuestos repercute positivamente en la salud del consumidor.

La investigación del efecto de las altas presiones se aborda desde una perspectiva global, incidiendo en todos los aspectos que afectan a la calidad y estabilidad de los *smoothies*, y por tanto constituye una aportación novedosa y completa de gran interés para el sector industrial de los zumos. La bebida tipo *smoothie* desarrollada en este trabajo de investigación supone una oferta de grandes expectativas en el ámbito de la alimentación y la salud por el perfil y concentración de compuestos bioactivos. En este estudio se demuestra también la idoneidad del procesado por altas presiones (450-650 MPa/3 min/20 °C) como alternativa real frente a los métodos tradicionales de tratamiento térmico (80 °C/3 min) al conseguir el mantenimiento de la calidad microbiológica y preservar en mayor medida los componentes responsables de la calidad nutricional, funcional y sensorial tras el tratamiento y posterior almacenamiento en refrigeración.



# ABSTRACT





## **Effect of high hydrostatic pressure treatment and storage on the safety and nutritional, sensory and functional quality of smoothies as an alternative to commercial mixed drinks**

The current consumer is each more conscious about the close relationship between food and health and demands minimally-processed, palatable, easy-to-use, and functional food. In this sense, mixed-juice based beverages and smoothies represent an option to meet these requirements. Furthermore, the application of novel alternative technologies to traditional pasteurization, among which high hydrostatic pressure is, is a revolution in the food industry, by obtaining safe products that retain the functional, nutritional and sensory characteristics of fresh foods.

The main objective of this thesis is to evaluate the effect of high hydrostatic pressures applied to smoothies made with cow's milk and soy milk and the modifications during the commercial life under the premise of being a more suitable technology than traditional pasteurization used for mixed-juice based beverages processing. The ultimate purpose is to achieve a greater degree of knowledge regarding these new products and processes to establish future guidelines of standardization as currently the legal recognition is not clear and accurate. Previously it is conducted a market study and characterization of twenty four commercial milk- and soy-juice based beverages as a base on which to develop the smoothies' formulations.

To evaluate the effect of high pressure, two smoothies' prototypes were developed by mixing vegetable products (orange, papaya, melon, carrot) rich in bioactive compounds, and cow milk or soy milk. Drinks made with cow's milk were subjected to two intensities of pressure: 450 and 600 MPa, and those made with soy milk, to 550 and 650 MPa. In all cases the time and temperature were held constant: 3 minutes 20 ° C. To compare the impact of treatment and storage of the evaluated characteristics, the smoothies were subjected in parallel to a conventional heat pasteurization process at 80 ° C for 3 minutes. It has also considered the effect of refrigerated storage at 4 °C along 45 days.

This paper has conducted a thorough investigation of these drinks from five points of view: general (pH, acidity, density, total soluble solids and color), nutritional (sugars, organic acids, minerals, anions and retinol), sensory (color, aroma, flavor, texture and overall acceptability), functional (carotenoids, tocopherols, ascorbic acid, polyphenols and antioxidant capacity associated with these compounds measured by the FRAP and DPPH mechanisms) and microbiological (aerobic mesophilic bacteria, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, molds and yeasts). The methods have been validated to demonstrate its suitability for the intended purpose.

This work has resulted in six papers, five of which are already published in important journals of the food science and technology area, and a sixth is currently under review.

The results of the optimization and validation of methodologies applied are highly satisfactory for use in the analysis of mixed drinks and smoothies, both in terms of linearity, sensitivity, accuracy and precision. Correlation coefficients ( $r^2$ ) were in all cases greater than 0,990, with linearity coefficients over 95%. The sensitivity, measured as limits of detection and quantification, has proved to be sufficient to quantify the analytes of interest. Adequate accuracy is reflected by the good recovery percentages obtained, ranging between 88 and

108%. The precision, measured as relative standard deviation of repeatability and reproducibility, has been correct for keeping it always below 10%.

Commercial milk- and soy-juice based beverages provide significant amounts of essential nutrients, among which sucrose is the main sugar. The presence of citric acid is due, in large part, to its inclusion as an additive and mineral fraction is mainly represented by potassium, sulfates and phosphates. Low concentrations of sodium, especially in soy beverages have positive implications for cardiovascular health. The vitamin fraction consists of provitamin A and vitamins A, C and E, most of which were added by the manufacturer in higher quantity than indicated on the label in order to ensure this amount over the shelf-life of the product.

The sensory results show significant differences in the colour, sweetness, acidity and consistency attributes. Drinks made with orange, papaya and mango have the most intense colours. The increased acidity is related to the higher proportion of orange due to its citric acid. Soy-based beverages have lower sweetness and greater consistency and, along with those that contain banana and orange, are the best overall accepted. When comparing the sensory profile with chemical components results, positive correlations between the percentage of fruit concentration and consistency, as well as natural constituents of fruits (fructose, malic acid, potassium and phosphate) are found. A negative correlation between the total sugar content and the acid flavor is also observed.

Commercial milk- and soy-juice based beverages are a good source of bioactive compounds (carotenoids, vitamins C and E and polyphenols) with potential antioxidant activity, resulting in 98% of the added components (vitamin C and  $\beta$  carotene) and 2% of natural components (polyphenols). While the total polyphenol content is significantly higher in those drinks that include orange, grape, apple and/or pineapple in its composition, no significant correlation with the percentage of fruit used in their preparation is detected. Although the  $\beta$ -carotene can be naturally occurring, especially in those samples that have orange and carrot among its ingredients, the presence of this pigment is mainly due to its incorporation as artificial dye.

Regarding smoothie drinks, the results indicate that the physicochemical and nutritional characteristics remain constant after heat treatment (80 °C/3 min) and high hydrostatic pressures (450-650 MPa/3 min/20 °C). The evaluation of  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  parameters shows that pressurized samples lead to colour changes ( $\Delta E$ ) substantially lower than pasteurized ones. More satisfactory results are also obtained when evaluating the aroma and overall acceptability after the high pressure treatment with respect to the thermal treatment.

The content of bioactive compounds, in smoothies processed by high pressure, it is comparable or even higher than fresh and thermally treated, with retention above 92% for ascorbic acid and increased concentration of lycopene,  $\beta$ -carotene and polyphenols, resulting in a higher antioxidant activity in the samples subjected to high pressures with respect to heat treated.

Microbiologically, pressurized smoothies show a significant reduction of the population of aerobic mesophilic bacteria (more than 3 log cfu/mL), equivalent to that obtained after conventional heat treatment.

During refrigerated storage at 4 °C the fractions of sugars, organic acids and mineral elements are not affected. Paying attention to the colour, in general  $a^*$  and  $b^*$  parameters are

less affected by storage in the samples subjected to high pressure against the heat treated. The bioactive compounds of smoothies treated by pressure are relatively stable in storage compared to the fresh product, with lower and more gradual losses than the observed in heat treated samples, resulting in higher antioxidant capacity values than in treated drinks.

Microbial spoilage is observed in all samples during storage, and it is inversely proportional to the intensity of pressure applied, being comparable the pasteurization to the milder pressure conditions applied (450 and 550 MPa).

In view of all the results it is concluded that commercial milk- and soy-juice based beverages are an interesting option for infant and geriatric population for contributing to hydration and for the supply of essential nutrients and bioactive compounds with potential antioxidant activity, although the presence of many of them is due to the deliberate incorporation as an additive by the manufacturer.

The smoothies formulated are rich in bioactive compounds, particularly lycopene,  $\beta$ -carotene, ascorbic acid and hesperidin, by the fruits that they were elaborated from. The high antioxidant capacity developed by these compounds has a positive impact on consumers' health.

The investigation about the effect of high pressure is approached from a global perspective, focusing on all the aspects that affect the quality and stability of smoothies, and therefore constitutes a novel and complete contribution with great interest to the juice industry. The smoothie developed in this study represents a good option in the area of food and health because of the bioactive compounds' profile and concentration found. In this study it is also demonstrated the suitability of high pressure processing (450-650 MPa/3 min/20 °C) as a real alternative to traditional thermal treatment (80 °C/3 min) to achieve the maintenance of microbiological quality and preserve as much as possible the components responsible of the nutritional, functional and sensory quality after treatment and subsequent refrigerated storage.



# ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS





<b>AIJN</b>	Asociación europea de zumos de frutas
<b>CL</b>	Coefficiente de linealidad
<b>DAD</b>	Detector de diodos array
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>FRAP</b>	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
<b>Gy</b>	Gray
<b>HP</b>	Altas presiones
<b>HPP</b>	Procesado por altas presiones
<b>Hz</b>	Herzio
<b>ICP-AES</b>	Espectroscopía de emisión atómica por plasma acoplado inductivamente
<b>IDR</b>	Ingestas diarias de referencia
<b>IR</b>	Índice de refracción
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>LOQ</b>	Límite de cuantificación
<b>MPa</b>	Megapascales
<b>psi</b>	Libra por pulgada cuadrada
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TP</b>	Procesado térmico
<b>TPC</b>	Compuestos fenólicos totales
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tripiridil-s-triazina
<b>Trolox</b>	ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
<b>TSS</b>	Sólidos solubles totales
<b>ufc</b>	Unidades formadoras de colonias



# ÍNDICE DE TABLAS



<b>Tabla 1.</b> Tecnologías emergentes de conservación de zumos. ....	56
<b>Tabla 2.</b> Características técnicas de los equipos de alta presión comercializados por Hiperbaric.....	62
<b>Tabla 3.</b> Relación de parámetros evaluados en las bebidas mixtas comerciales y los <i>smoothies</i> . .....	76
<b>Tabla 4.</b> Relación y etiquetado de las bebidas refrescantes mixtas objeto del análisis de color, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.....	78
<b>Tabla 5.</b> Relación y etiquetado de las bebidas refrescantes mixtas objeto del análisis nutricional y sensorial. ....	79
<b>Tabla 6.</b> Relación y etiquetado de las bebidas refrescantes mixtas objeto del análisis de tocoferoles, retinol y $\beta$ -caroteno. ....	80
<b>Tabla 7.</b> Resumen de los parámetros de validación. ....	87
<b>Tabla 8.</b> Características espectrales de los carotenoides analizados. ....	92
<b>Tabla 9.</b> Contenido de sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa y azúcares totales (g/L) y datos de los °Brix reflejados en la etiqueta de las bebidas mixtas comerciales.....	113
<b>Tabla 10.</b> Contenido de ácido cítrico (g/L), L-málico y tartárico (mg/L) de las bebidas mixtas comerciales. ....	115
<b>Tabla 11.</b> Contenido de macroelementos (sodio, potasio, calcio y magnesio) y microelementos (hierro y zinc) de las bebidas mixtas comerciales (mg/L).....	116
<b>Tabla 12.</b> Contenido de aniones (mg/L) y relación calcio:fósforo de las bebidas mixtas comerciales. ....	119
<b>Tabla 13.</b> Datos de etiquetado de las vitaminas A y E y contenido en tocoferoles y palmitato de retinol (mg/L) analizados en las bebidas mixtas comerciales. ....	124
<b>Tabla 14.</b> Carotenoides cuantificados e identificados y equivalentes de retinol de las bebidas mixtas comerciales. ....	126
<b>Tabla 15.</b> Actividad antioxidante FRAP (mmoles de equivalentes de Trolox/L) de las bebidas mixtas comerciales y sus correspondientes extractos polifenólicos agrupadas por categoría comercial.....	129
<b>Tabla 16.</b> Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez, densidad y sólidos solubles totales) de los <i>smoothies</i> . ....	132

<b>Tabla 17.</b> Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de azúcares solubles (g/L) de los <i>smoothies</i> . .....	138
<b>Tabla 18.</b> Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de ácidos orgánicos (mg/L) de los <i>smoothies</i> . .....	140
<b>Tabla 19.</b> Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de elementos minerales (mg/L) de los <i>smoothies</i> . .....	142
<b>Tabla 20.</b> Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de carotenoides (mg/L) de los <i>smoothies</i> . .....	147
<b>Tabla 21.</b> Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de polifenoles individuales (mg/L) de los <i>smoothies</i> . .....	153
<b>Tabla 22.</b> Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre los parámetros microbiológicos (ufc/mL) de los <i>smoothies</i> . .....	160



# ÍNDICE DE FIGURAS



<b>Figura 1.</b> <i>Ranking</i> de países de la UE por volumen de consumo de zumos y néctares, en millones de litros en el año 2014 .....	45
<b>Figura 2.</b> Volumen de consumo de <i>smoothies</i> en la UE, en millones de litros en el año 2014. ....	46
<b>Figura 3.</b> Estructura química del ácido ascórbico (izquierda) y del ácido dehidroascórbico (derecha). ....	48
<b>Figura 4.</b> Estructura química de los cuatro isómeros de tocoferol.....	48
<b>Figura 5.</b> Estructura química de algunos carotenoides presentes en alimentos.....	50
<b>Figura 6.</b> Estructura básica de las principales familias de compuestos fenólicos. ....	52
<b>Figura 7.</b> Ciclo real de tratamiento de altas presiones aplicado a un zumo. ....	61
<b>Figura 8.</b> Ejemplo de un equipo comercial de altas presiones. ....	62
<b>Figura 9.</b> Esquema de funcionamiento de una unidad de altas presiones. ....	63
<b>Figura 10.</b> Micrografías de <i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>cremoris</i> MG1363 (a, b y c) y SK11 (d, e y f) no tratadas y tratadas por alta presión. Condiciones de presión: 0,1 MPa (a y d), 300 MPa (b y e) y 800 MPa (c y f). ....	64
<b>Figura 11.</b> Cromatograma de azúcares identificados por HPLC.....	89
<b>Figura 12.</b> Cromatograma de ácidos orgánicos identificados por HPLC a 215 nm.....	90
<b>Figura 13.</b> Espectros de luteína (arriba), licopeno (centro) y $\beta$ -caroteno (abajo). ....	93
<b>Figura 14.</b> Cromatograma de carotenoides identificados por HPLC a 475 nm. ....	94
<b>Figura 15.</b> Cromatograma de retinol, tocoferoles y sus ésteres y $\beta$ -caroteno identificados por HPLC.....	95
<b>Figura 16.</b> Valores de pH de las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial.....	109
<b>Figura 17.</b> Contenido en sólidos solubles totales ( $^{\circ}$ Brix) de las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial. ....	110
<b>Figura 18.</b> Parámetros CIE Lab de las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial.....	111
<b>Figura 19.</b> Contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y lactosa de las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes. ....	113
<b>Figura 20.</b> Contenido de ácido cítrico y L-málico de las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes.....	114

<b>Figura 21.</b> Contenido de macroelementos (sodio, potasio, calcio y magnesio) de las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes. ....	117
<b>Figura 22.</b> Distribución de cloruros, sulfatos y fosfatos en las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes.....	119
<b>Figura 23.</b> Gráfico radial de los resultados del análisis sensorial para los atributos estudiados (color, dulzor, acidez, aroma, consistencia y aceptabilidad) en las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes. ....	121
<b>Figura 24.</b> Contenido de ácido ascórbico en las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial. ....	122
<b>Figura 25.</b> Distribución de los isómeros $\alpha$ -, $\beta$ -, y $\gamma$ - de tocoferol y acetato de $\alpha$ -tocoferol en las bebidas mixtas comerciales. ....	124
<b>Figura 26.</b> Contenido total de carotenoides (expresados como suma de luteína, zeaxantina y $\beta$ -caroteno) en las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial. ....	126
<b>Figura 27.</b> Contenido de polifenoles totales en las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial. ....	127
<b>Figura 28.</b> Capacidad antioxidante medida por el método FRAP en las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial. ....	128
<b>Figura 29.</b> Gráfico de dispersión de las dos principales variables canónicas. ....	130
<b>Figura 30.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre $L^*$ en los <i>smoothies</i> . ....	133
<b>Figura 31.</b> Evolución de $L^*$ en los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento. ...	134
<b>Figura 32.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre $a^*$ en los <i>smoothies</i> . ....	135
<b>Figura 33.</b> Evolución de $a^*$ en los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento. ....	135
<b>Figura 34.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre $b^*$ en los <i>smoothies</i> . ....	136
<b>Figura 35.</b> Evolución de $b^*$ en los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento. ...	136
<b>Figura 36.</b> Evolución de las diferencias de color ( $\Delta E$ ) en los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento. ....	137
<b>Figura 37.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en azúcares de los <i>smoothies</i> . ....	138
<b>Figura 38.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en ácidos cítrico y L-málico de los <i>smoothies</i> . ....	139

<b>Figura 39.</b> Gráfico radial de los resultados del análisis sensorial para los atributos estudiados en los <i>smoothies</i> (intensidad del color, aroma, sabor ácido, dulce y natural, consistencia y aceptabilidad general).	144
<b>Figura 40.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en ácido ascórbico de los <i>smoothies</i> .	144
<b>Figura 41.</b> Evolución del contenido de ácido ascórbico de los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento.	145
<b>Figura 42.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en licopeno de los <i>smoothies</i> .	146
<b>Figura 43.</b> Evolución del contenido de licopeno de los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento.	148
<b>Figura 44.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en $\beta$ -caroteno de los <i>smoothies</i> .	149
<b>Figura 45.</b> Evolución del contenido de $\beta$ -caroteno de los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento.	150
<b>Figura 46.</b> Contribución de cada carotenoide al contenido total tras la aplicación de los distintos tratamientos.	150
<b>Figura 47.</b> Evolución del contenido de carotenoides totales de los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento.	151
<b>Figura 48.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en polifenoles totales de los <i>smoothies</i> .	155
<b>Figura 49.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre la capacidad antioxidante de los <i>smoothies</i> medida por el mecanismo FRAP.	156
<b>Figura 50.</b> Evolución de la capacidad antioxidante (FRAP) de los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento.	157
<b>Figura 51.</b> Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre la capacidad antioxidante de los <i>smoothies</i> medida por el mecanismo de neutralización del radical DPPH.	157
<b>Figura 52.</b> Evolución de la capacidad antioxidante (DPPH) de los <i>smoothies</i> a lo largo del período de almacenamiento.	158
<b>Figura 53.</b> Recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C tras la aplicación de los distintos tratamientos y lo largo del período de almacenamiento.	159

# 1. INTRODUCCIÓN



1. Introducción general .....	41
2. Legislación .....	42
3. Bebidas refrescantes mixtas y smoothies .....	44
3.1. Producción y consumo .....	44
3.2. Valor nutritivo de bebidas mixtas.....	46
3.3. Componentes bioactivos y efectos saludables .....	47
4. Tratamientos industriales de conservación de zumos.....	53
4.1. Métodos tradicionales.....	54
4.2. Métodos alternativos.....	55
4.3. La tecnología de altas presiones hidrostáticas.....	60
4.3.1. Fundamento.....	60
4.3.2. Aspectos tecnológicos y equipamiento.....	61
4.3.3. Efectos de las altas presiones hidrostáticas.....	63
4.3.4. Aplicación de las altas presiones hidrostáticas.....	67
4.3.5. Evaluación económica y percepción social.....	68

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

El consumo regular de frutas y hortalizas propio de la dieta mediterránea forma parte de un estilo de vida saludable. La asociación entre la elevada ingesta de este grupo de alimentos y la menor incidencia de ciertas enfermedades crónicas, tales como las enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, diabetes, obesidad, algunos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas y otras enfermedades inducidas por el estrés oxidativo, está avalada por numerosos estudios (*Dauchet y col., 2006; Landon, 2007; Spencer, 2008; O'Neil y col., 2011; Wang y col., 2014*).

Sin embargo, la influencia de nuevos hábitos y costumbres alimentarias poco saludables como el sedentarismo, el abuso de alimentos ricos en azúcares y grasa o el bajo consumo de frutas y verduras, entre otros, han alejado a los consumidores del modelo tradicional de dieta equilibrada. La obesidad se considera la epidemia del siglo XXI y las enfermedades cardiovasculares siguen siendo la primera causa de mortalidad en los países desarrollados (*WHO, 2003; UNICEF, 2013*). Enfermedades como el síndrome metabólico, la diabetes mellitus tipo II, la hipertensión arterial o el cáncer han experimentado un considerable aumento en los últimos tiempos (*WHO, 2008*).

Concienciados del enorme problema que plantea esta situación, muchos países han adoptado medidas encaminadas a promover hábitos alimentarios y estilos de vida saludables recomendados por instituciones como la Organización Mundial de la Salud, la Unión Europea o asociaciones como la *European Fruit Juice Association (AIJN)*, destacando la Declaración de Viena sobre Nutrición y Enfermedades No Transmisibles o el Plan de Acción sobre Nutrición de la OMS (*WHO 2004, WHO 2013*). En España, los Organismos competentes han impulsado iniciativas como por ejemplo, el Programa “5 al día”, la Estrategia NAOS o el Nuevo Código PAOS-2012.

Las políticas alimentarias van persuadiendo al consumidor, cada vez más consciente de la estrecha asociación existente entre la alimentación y la salud, de la necesidad de seleccionar aquellos alimentos que puedan suponer una ventaja para mejorar su bienestar y calidad de vida. En este sentido, el sector hortofrutícola ha potenciado la diversificación de las líneas de producción y el desarrollo de productos mínimamente procesados de frutas y hortalizas apetecibles, de fácil consumo y con propiedades funcionales (*Siró y col., 2008; Henry, 2010; Santamaría, 2010*).

Uno de los sectores más dinámicos y que mayor crecimiento ha experimentado en los últimos años es el de los zumos de frutas y derivados. El producto tradicional, el zumo obtenido a partir de concentrado, ha evolucionado a nuevas presentaciones en las que se buscan aspectos relacionados con un fácil consumo, un mínimo procesado en la búsqueda de lo natural, nuevos sabores, colores y texturas, un enriquecimiento en determinados componentes o combinaciones innovadoras con otros alimentos para satisfacer las necesidades sensoriales, nutricionales y funcionales. En este último grupo destacan las bebidas refrescantes mixtas y las bebidas funcionales tipo *smoothie*.

Dado que en la actualidad las cifras de consumo de frutas y hortalizas frescas no se acercan al óptimo de 5 piezas al día necesarias para lograr los efectos preventivos de su ingesta (*FSA, 2010*), la oferta de *smoothies* puede suponer una estrategia nutricional positiva para fomentar

el consumo de este grupo de alimentos. Y si bien no deben reemplazar la ingesta de la fruta entera, sí constituyen alternativas atractivas que podrán contribuir parcialmente al consumo de la ración recomendada al tratarse de productos que proceden de trozos de fruta entera, pulpa o purés en elevada proporción. Es por ello que se han convertido en un segmento en auge del mercado de bebidas tanto en los países desarrollados como en los emergentes y están ganando popularidad en EEUU, Europa y Asia. Según un estudio llevado a cabo en 2010 por la *Global Industry Analysts*, se estima que el mercado mundial de *smoothies* alcance a finales del año 2015 los nueve mil millones de dólares.

La innovación, la calidad, la conveniencia y la promoción de la salud de los alimentos constituyen los pilares para el desarrollo de nuevos productos y procesos por la industria. En las últimas décadas, la investigación de tecnologías alternativas a los procesos tradicionales de conservación (pasteurización, fundamentalmente) ha supuesto también una revolución en la industria alimentaria, al obtenerse productos seguros que conservan las características funcionales, nutricionales y sensoriales de los alimentos frescos. En este sentido, la tecnología de altas presiones hidrostáticas se considera prometedora para el procesado de alimentos.

## 2. LEGISLACIÓN

Las bebidas mixtas de zumo y leche se regulan dentro del amplio grupo de bebidas refrescantes aunque su definición está más próxima a la de zumo, mientras que los *smoothies* son productos próximos a los zumos que no cuentan hoy por hoy con un reconocimiento legal preciso. Estos condicionantes nos obligan a abordar la legislación de ambos tipos de productos.

El marco legislativo donde se contemplan las bebidas refrescantes en España está constituido por el *Real Decreto 650/2011, de 9 de mayo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria en materia de bebidas refrescantes*. Dicha norma recoge el nuevo enfoque que desde la Unión Europea se venía haciendo en tema de seguridad alimentaria, desde la aprobación del *Reglamento (CE) n° 178/2002*, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria, y del *Reglamento (CE) n° 852/2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios*. Este nuevo Real Decreto regula ciertos aspectos a cumplir por parte de las empresas que intervienen en la elaboración, importación, almacenamiento y comercialización de bebidas refrescantes y hace especial hincapié en lo relativo a los aditivos, etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.

De acuerdo a esta norma, se entiende por bebidas refrescantes “las bebidas analcohólicas, carbonatadas o no, preparadas con agua de consumo humano, aguas preparadas, agua mineral natural o de manantial, que contengan uno o más de los siguientes ingredientes: anhídrido carbónico, azúcares, zumos, purés, disgregados de frutas y/o vegetales, extractos vegetales, vitaminas y minerales, aromas, aditivos autorizados u otros ingredientes alimenticios”. Las denominaciones permitidas son: agua de seltz, agua de soda, agua aromatizada, gaseosa y otras bebidas refrescantes, entre las que se encuentran las bebidas refrescantes de zumos de frutas, las bebidas refrescantes de extractos, las bebidas refrescantes mixtas, las bebidas refrescantes para diluir, los productos sólidos para la preparación de bebidas refrescantes y las bebidas refrescantes aromatizadas. La denominación “bebidas refrescantes mixtas” incluye aquellas bebidas refrescantes en cuya composición se especifica algún otro alimento.

Por su parte, los zumos constituyen una de las categorías de alimentos más reguladas a nivel europeo. En particular, la legislación española sobre zumos es la más completa y estricta de Europa al reconocer legalmente los parámetros químicos de calidad de los zumos más comunes en nuestro mercado o que son objeto de comercio exterior: naranja, albaricoque, mandarina, manzana, melocotón, pera, piña y uva (*Real Decreto 1044/1987* y *Real Decreto 1518/2007*). En el resto de países europeos solamente constituyen un Código o Guía de Buenas Prácticas de obligado cumplimiento.

En España, las normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana vienen reflejadas en el *Real Decreto 781/2013*. Esta reglamentación transpone la *Directiva 2012/12/UE*, deroga el *Real Decreto 1050/2003* (hasta ese momento, la norma básica nacional para los zumos), define lo que se entiende por zumo de frutas y productos similares (zumo de fruta a partir de concentrado, zumo de frutas concentrado, zumo de fruta extraído con agua, zumo de frutas deshidratado o en polvo y néctar de frutas) y establece las normas para su elaboración (ingredientes, tratamientos y sustancias autorizadas) y comercialización (etiquetado, presentación y publicidad). Además, establece ciertas disposiciones particulares, como el contenido mínimo de zumo y/o puré en los néctares de frutas, o los niveles mínimos de grados Brix para el zumo de frutas reconstituido y el puré de frutas reconstituido.

A nivel europeo existe una doble reglamentación en cuanto a los zumos. Por un lado existe una legislación “horizontal” que cubre aspectos genéricos de los alimentos, tales como aditivos o etiquetado. Por otro lado, existe una reglamentación específica o “vertical”, conocida como *breakfast Directives*, que afecta a la producción y comercialización de siete productos concretos, entre los que se encuentran los zumos de fruta y otros productos derivados. Dentro de este marco legal específico vertical hay que destacar la *Directiva 2001/112/CE relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana* y posteriores modificaciones, siendo la última la *Directiva 2012/12/UE*. Entre la normativa general horizontal vinculada a estos productos cabe resaltar la de declaraciones nutricionales y de propiedades saludables (*Reglamento CE N° 1924/2006*), la información alimentaria facilitada al consumidor (*Reglamento UE N° 1169/2011*), la adición de vitaminas y minerales (*Reglamento CE N° 1925/2006* y *posteriores modificaciones*), los aditivos, enzimas y aromas (*Reglamentos CE N° 1331-1334/2008*), los nuevos alimentos e ingredientes alimentarios (*Reglamento CE N° 258/97*) y los límites máximos de residuos de plaguicidas (*Reglamento CE N° 396/2005*).

Entidades como la Asociación Europea de Zumos de Frutas (AIJN) representan a este sector en las instituciones europeas con objeto de asesorarlas en la elaboración de la legislación relacionada. Otras como EQCS (*European Quality Control System*) o AEAZN (Asociación Española de Autocontrol de Zumos y Néctares) velan por el fomento y la defensa de la calidad y autenticidad de los productos de la industria de zumos y néctares.

A nivel internacional, el *Codex Alimentarius* desarrolla normas alimentarias, reglamentos y códigos de prácticas, entre otros, bajo el Programa Conjunto FAO/OMS de Normas Alimentarias con el objetivo de armonizar las legislaciones alimentarias entre todos los países y facilitar el comercio internacional de alimentos. Es por ello que aunque los principios establecidos en este código no son de obligado cumplimiento, la normativa Comunitaria los tiene muy en cuenta a la hora de desarrollar la regulación aplicable. La Norma general *Codex* para los zumos de frutas está constituida por la “Norma general del *Codex* para zumos (jugos) y néctares de frutas” (CODEX STAN 247-2005).

Los *smoothies* carecen de un marco legal preciso y se ajustarían más a la normativa de los zumos por su proximidad con estos productos.

En el ámbito de las altas presiones hidrostáticas, no existe a día de hoy una reglamentación específica que controle el lanzamiento al mercado de alimentos tratados con este tipo de tecnología. Sin embargo, existen ciertos documentos oficiales al respecto. Con arreglo al *Reglamento (CE) N° 258/97 sobre nuevos alimentos e ingredientes alimentarios*, la Comisión Europea aprobó en 2001 una Decisión por la que se autorizaba la comercialización de preparados pasteurizados a base de frutas obtenidos por medio de un tratamiento de pasteurización a alta presión (8 kilobares, 6 min, 20 °C) en respuesta a una solicitud presentada por el grupo Danone. Por su parte, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos emitió en 2003 una carta de no objeción donde se reconocía el uso de las altas presiones (87.000 psi, 3 min) para la eliminación de *Listeria monocytogenes* en un producto cárnico envasado listo para su consumo (*USDA-FSIS, 2003*).

### 3. BEBIDAS REFRESCANTES MIXTAS Y SMOOTHIES

#### 3.1. Producción y consumo

El sector de los zumos ha diversificado sus líneas de producción ante la demanda del mercado hacia productos de fácil consumo, más saludables y con buena aceptación por la población. En este sentido se encuentran nuevos productos entre los que destacan las bebidas refrescantes mixtas y las bebidas funcionales tipo *smoothie*.

Las bebidas refrescantes mixtas, como se comentó anteriormente, cuentan con una normativa específica que incluye una definición precisa en términos legales. Los *smoothies*, por su parte, podrían definirse en términos generales como batidos de frutas o bebidas cremosas no alcohólicas preparadas a base de trozos y zumo de fruta, concentrados o congelados, mezclados tradicionalmente con productos lácteos, leche de soja y/o helado. Otros ingredientes que pueden incluirse en su elaboración son las hortalizas o la miel, aparte de aditivos, colorantes y conservantes. Se caracterizan por presentar una consistencia algo densa y aunque constituyen uno de los productos de gama más alta (*premium*) del sector de bebidas, su precio y la limitada oferta constituyen aún un inconveniente que frena su desarrollo (*Mena, 2011; Keenan y col., 2012*).

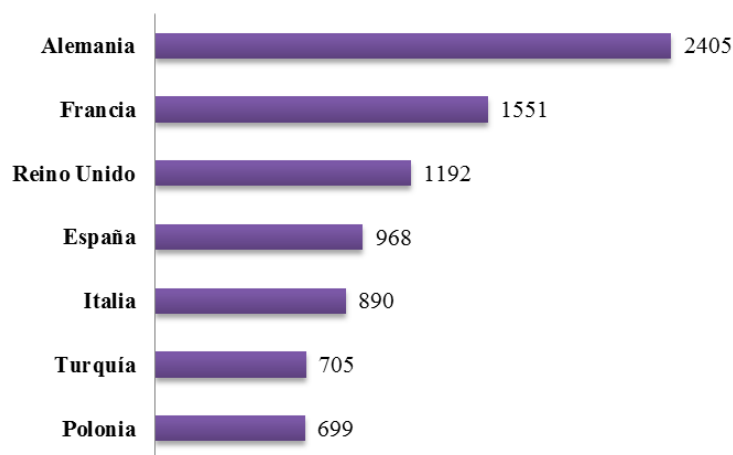
El sector del zumo incluye presentaciones muy diversas: zumos procedentes de concentrado, néctares, néctares sin azúcar, zumo exprimido conservado a temperatura ambiente, zumos refrigerados, zumos enriquecidos, con leche, con soja, con fibra, antioxidantes, etc. Los estudios de panel de consumidores segmentan este sector en 4 grupos con diferentes cuotas de mercado: zumos clásicos, puros, funcionales y con leche. Los consumidores asocian los zumos de fruta y leche a bebidas más nutritivas y con sabores nuevos y se orientan hacia la población infantil y juvenil, mientras las bebidas de zumo y soja se relacionan con aspectos saludables y su consumo se centra en la población adulta (*Kantar WorldPanel, 2011*).

Según el informe elaborado por *Campos y Gómez-Bengochea (2013)* sobre las bebidas refrescantes y su impacto socioeconómico en España, la facturación total asociada a estos productos supera los 12.000 millones de euros y genera casi 64.000 puestos de trabajo directos e indi-

rectos, sin contar los otros miles que dependen de la comercialización. El pilar sobre el que se asienta el sector de bebidas refrescantes es la inversión en innovación. En el año 2011 se realizaron 148 lanzamientos en el mercado de las bebidas refrescantes, de los cuales un 49% fueron nuevos productos, un 25% innovaciones en envases o packs y un 26% extensiones de línea o nuevos sabores. Además se considera que las bebidas refrescantes tienen un fuerte arraigo y un destacado papel en la economía española, tanto de manera directa como por su vinculación a otros sectores como la agricultura, los proveedores, los transportes, la hostelería y restauración o el turismo. Las empresas que forman parte de la Asociación de Bebidas Refrescantes (ANFABRA), casi la totalidad del sector, comercializan en conjunto 2.000 bebidas refrescantes y 500 sabores.

El sector del zumo también cuenta con una posición sólida en el mercado español. Su importancia para la economía y empleo es relevante, especialmente en las zonas de máxima producción hortofrutícola. El sector español de elaboradores de zumos y néctares cuenta en la actualidad con alrededor de 50 empresas, de las cuales 17 pertenecen a la Asociación Española de Fabricantes de Zumos (ASOZUMOS), representando cuantitativamente un 70% aproximadamente de la producción nacional de estos productos. Según datos del informe anual sobre los zumos y néctares en Europa (AIJN, 2015), el mercado español de zumos y néctares durante 2014 fue de 968 millones de litros (Fig. 1), lo que sitúa a nuestro país en cuarta posición por volumen de comercialización, con casi un 10% del mercado total europeo de zumos y néctares, por detrás de Alemania (2.405 millones de litros), Francia (1.551 millones de litros) y Reino Unido (1.192 millones de litros). Detrás se sitúan Italia (890 millones de litros), Turquía (705 millones de litros) y Polonia (699 millones de litros). El consumo total de zumos y néctares en la Unión Europea ascendió a 9.702 millones de litros en 2014.

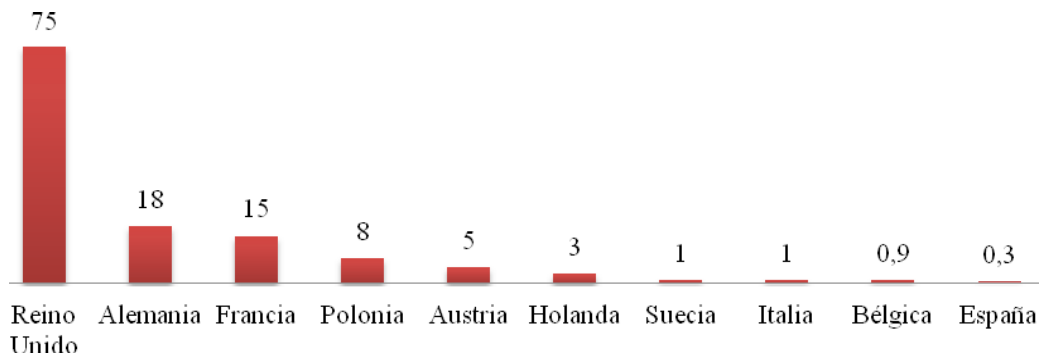
Fig. 1. Ranking de países de la UE por volumen de consumo de zumos y néctares, en millones de litros en el año 2014.



En cuanto al consumo *per cápita*, la media española se posiciona en 20,8 litros, por encima de la media europea (19,1 litros) pero por detrás de los grandes países consumidores que tienen un menor acceso a la fruta fresca: Alemania, Holanda y Finlandia (con más de 25 litros por habitante en el mismo periodo). Según datos del mismo informe, en el desglose del consumo de zumos y néctares, ciertos países aportan datos del volumen correspondiente a los *smoothies* (Fig. 2). Así, en primer lugar destaca Reino Unido con 75 millones de litros, seguido muy de lejos por Alemania, Francia, Polonia, Austria y Holanda con 18, 15, 8, 5 y 3 millones de litros,

respectivamente. El consumo de *smoothies* en Suecia e Italia en 2014 ascendió a 1 millón de litros cada uno, mientras que en Bélgica y España tan solo fue de 0,9 y 0,3 millones de litros, respectivamente.

Fig. 2. Volumen de consumo de *smoothies* en la UE, en millones de litros en el año 2014.



### 3.2. Valor nutritivo de las bebidas mixtas

Las bebidas elaboradas a partir de fruta y leche poseen una buena calidad nutritiva derivada de los nutrientes propios de estos dos tipos de alimentos. Constituyen un aporte hídrico esencial, ya que el agua es el componente mayoritario (85-90%) y tiene una gran importancia por ser imprescindible en los procesos de hidratación (*de Arpe Muñoz, 2006*). Estas bebidas ayudan de forma muy significativa al mantenimiento del balance hídrico por el contenido en agua y por los niveles óptimos de los electrolitos imprescindibles en la regulación de la presión osmótica y el mantenimiento del volumen intracelular, como son el sodio y el potasio, respectivamente (*Miján y col., 2001*).

Los componentes propios de la fruta de partida poseen un elevado contenido de azúcares y de ácidos orgánicos. Los primeros serán los máximos contribuyentes al aporte calórico y ambos participarán en el sabor dulce o ácido, respectivamente. Además constituyen una fuente de fibra (de menor importancia en zumos con respecto a las frutas), vitamina C, provitamina A y sales minerales (K, Mg, P). Se caracterizan también por su bajo contenido en proteínas y grasas (*Bertsias y col., 2005*). Desde el punto de vista nutricional la leche desnatada añadida complementa muy bien el aporte de proteínas, lactosa y minerales (Ca, P). En el caso de bebidas de fruta y soja, esta semilla complementaría el aporte de proteínas, grasa, carbohidratos y minerales (K, P).

Las bebidas elaboradas a base de frutas constituyen una buena fuente de vitamina C, que supone un micronutriente esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La riqueza en vitamina C en los vegetales está condicionada por el tiempo de exposición solar, factores genéticos, ambientales y climáticos (*Podsedeke, 2007; Martínez y col., 2008*). Dada la extremada labilidad del ácido ascórbico, éste se considera un parámetro indicador de la calidad de estos productos (*Belitz y Grosch, 2004*).

Desde el punto de vista nutricional algunos carotenoides presentes en las bebidas de frutas y hortalizas actúan como precursores de la vitamina A, que no puede ser sintetizada por los

mamíferos. Los carotenoides con actividad provitamínica son el  $\beta$ -caroteno, el  $\alpha$ -caroteno, el  $\zeta$ -caroteno y la  $\beta$ -criptoxantina por contar en su estructura con al menos un anillo de  $\beta$ -ionona no sustituido en uno de los extremos de la molécula, capaz de convertirse en retinol. Teóricamente, en base a la estructura química, al  $\beta$ -caroteno se le asignaría una actividad provitamínica del 100%, ya que la ruptura central de la molécula da lugar a dos moléculas de retinal (Saini y col., 2015). Existe cierta controversia en cuanto a la estimación exacta de los equivalentes de retinol, ya que la biodisponibilidad de los carotenoides depende de factores intrínsecos de la matriz y del propio individuo. En la actualidad la equivalencia de retinol se establece en 12  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno y 24  $\mu\text{g}$  de los demás carotenoides provitamínicos (Meléndez-Martínez y col., 2004).

Estas bebidas también contienen una serie de compuestos implicados en las características sensoriales, que repercutirán en la apariencia, sabor, aroma y color del producto. Los compuestos responsables de estas propiedades pueden encontrarse de forma natural donde la fruta tiene un mayor peso (carotenoides-color, polifenoles-color y astringencia, ácidos orgánicos-sabor, azúcares-sabor) o incorporarse en forma de aditivo durante el proceso de elaboración. Es frecuente en estos productos la adición de acidulantes como el ácido cítrico o de colorantes como  $\beta$ -caroteno o incluso derivados de clorofila.

La mayoría de los efectos beneficiosos asociados al consumo de fruta o zumo derivan de la acción antioxidante sinérgica de los componentes bioactivos nutricionales como la vitamina C, los tocoferoles y ciertos minerales como el Zn y compuestos bioactivos no nutricionales tales como los carotenoides y los polifenoles. Su acción se basa en la neutralización de los radicales libres, implicados en el daño oxidativo, y por este mecanismo pueden considerarse factores preventivos de ciertas enfermedades como el cáncer, afecciones cardiovasculares y estados neurodegenerativos (carotenoides y flavonoides), cataratas o degeneración macular asociada a la edad (zeaxantina, luteína, vitaminas C y E, Zn) (Pineda-Alonso y col., 1999; Cámara y col., 2011).

La presencia de leche en las bebidas también repercute positivamente en la capacidad antioxidante de estos productos. De este modo, los caseínofosfopéptidos o la lactoferrina permiten secuestrar metales pro-oxidantes, donar electrones o protones para estabilizar los radicales libres o aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de metales como el Fe y el Zn (Kitts, 2005; Cilla, 2010). La soja por su contenido en polifenoles y su fracción proteica también tiene implicaciones positivas en la salud frente a la menopausia, afecciones cardiovasculares, etc. (Xiao, 2008).

### 3.3. Componentes bioactivos y efectos saludables

El papel beneficioso que juegan los componentes bioactivos en la salud constituye un elemento clave en la presente Tesis Doctoral por lo que en este apartado se abordará y profundizará en el conocimiento de los mismos.

#### Ácido ascórbico

La vitamina C es un micronutriente esencial para el correcto funcionamiento del organismo. Químicamente se trata de una molécula sencilla, análoga a los azúcares simples, compuesta por dos formas activas: el ácido ascórbico y el ácido dehidroascórbico (Fig. 3).

Fig. 3. Estructura química del ácido ascórbico (izquierda) y del ácido dehidroascórbico (derecha).



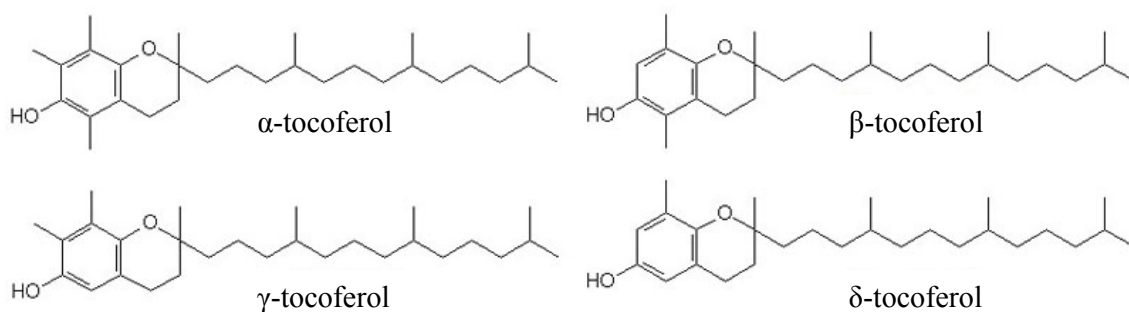
Las frutas, verduras y hortalizas constituyen la principal fuente de vitamina C en la dieta, encontrándose en gran medida en cítricos, frutos rojos, kiwi, tomate y perejil (*Souci y col., 2008*).

La vitamina C se considera un parámetro indicador de las alteraciones sufridas por los alimentos (*Belitz y Grosch, 2004*), aunque su interés nutricional depende más de su potente actividad reductora, resultando en multitud de funciones en el organismo. La vitamina C ayuda a prevenir la oxidación de las moléculas hidrosolubles, entre ellas ciertas vitaminas del grupo B (riboflavina, tiamina, ácido fólico y ácido pantoténico) e indirectamente a las vitaminas A y E (*Arias Carmona, 2009*). Tiene múltiples funciones como coenzima y cofactor, estimula la absorción de hierro y bloquea la degradación de ferritina a hemosiderina (*Guržau y col., 2003*). También resulta esencial para la oxidación de ciertos aminoácidos (fenilalanina y tirosina) e interviene en el metabolismo del triptófano y en la síntesis de noradrenalina (*Belitz y Grosch, 2004*). La vitamina C juega un papel importante en la generación y mantenimiento del colágeno en la piel y en los tejidos cartilaginoso y conectivo y participa en la cicatrización de heridas, fracturas y hemorragias (*Agriello y col., 2010; Kishimoto y col., 2013*). Sus propiedades redox la convierten en un potente agente neutralizante de especies reactivas de oxígenos (ROS) y de nitrógeno (RNS), con el consiguiente efecto protector frente a determinados tipos de cáncer (*Putchala y col., 2013*).

## Tocoferoles

Los tocoferoles constituyen junto con los tocotrienoles la vitamina E. La estructura química de los tocoferoles está constituida por un núcleo hidroquinona (cromano) unido a una cadena isoprenoide saturada de 12 átomos de carbono. Las diferencias en cuanto al número y posición de los grupos metilo en dicha cadena dan lugar a los cuatro isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  (*Traber y Atkinson, 2007*). En la posición 6 del anillo hidroquinona existe un grupo alcohol que puede encontrarse esterificado por distintos grupos, dando lugar a los distintos ésteres de vitamina E, siendo la más frecuente el acetato de  $\alpha$ -tocoferol (*Amažan, 2013*). La **Figura 4** ilustra la estructura de estos compuestos.

Fig. 4. Estructura química de los cuatro isómeros de tocoferol.



La vitamina E se encuentra fundamentalmente en alimentos de origen vegetal, donde destacan los aceites vegetales (maíz, trigo, girasol), semillas y frutos secos. En menor medida se pueden encontrar en hortalizas de hoja verde (brócoli, espinacas) y ciertos alimentos de origen animal como la yema de huevo. El  $\alpha$ - y el  $\gamma$ -tocoferol son los principales isómeros presentes en los alimentos (*Saldeen y Saldeen, 2005; da Costa y col., 2010*).

Su interés funcional radica en la actividad antioxidante, protegiendo al ADN, a las lipoproteínas de baja densidad y a los ácidos grasos poliinsaturados de la oxidación inducida por los radicales libres (*Hounsome y col., 2008*). De los cuatro isómeros existentes, el  $\alpha$ -tocoferol es el que desarrolla la actividad más potente reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (*Schwartz y col., 2008*) por su elevada capacidad para estabilizar el radical peroxilo, responsable de la peroxidación de las bicapas lipídicas que forman las membranas (*Londoño-Londoño, 2011*). También es importante en el funcionamiento normal de las células del sistema inmune (*Pekmezci, 2011*) y se ha demostrado su implicación en las funciones cerebrales, retrasando el deterioro cognitivo asociado a la edad y enfermedades como el Alzheimer y la demencia senil (*Morris y col., 2015*).

## Carotenoides

Los carotenoides constituyen el grupo de pigmentos más ampliamente distribuidos, representado por más de 750 estructuras, y son especialmente abundantes en frutas y verduras amarillas y naranjas y en vegetales de hoja verde (*Maiani y col., 2009*).

Estructuralmente los carotenoides forman parte del grupo de los tetraterpenos y se clasifican en carotenos y xantofilas; los primeros son estrictamente hidrocarburos mientras que los segundos incorporan grupos funcionales con átomos de oxígeno. La **Figura 5** muestra la estructura química de algunos ejemplos de ambos tipos.

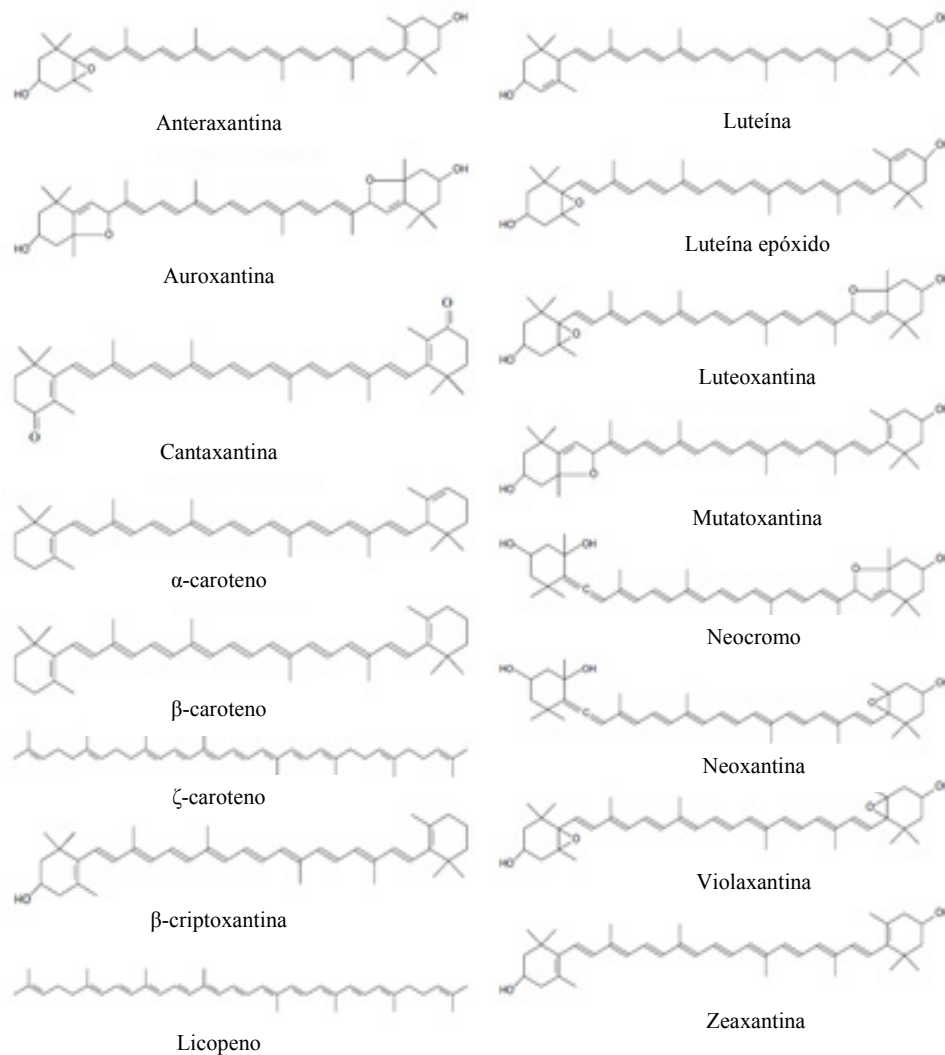
El sistema de dobles enlaces conjugados que caracteriza a estas estructuras es el responsable de su comportamiento cromóforo, aportando los colores amarillo, naranja y rojo a muchos alimentos (*Meléndez-Martínez y col., 2007*).

Las principales fuentes de  $\alpha$ -caroteno son las zanahorias y la calabaza. El  $\beta$ -caroteno está presente en multitud de alimentos, principalmente en naranja, mango, albaricoque, melón, zanahoria y pimiento rojo. La  $\beta$ -criptoxantina abunda en frutas tropicales (mango, papaya) y la luteína en maíz y verduras de hoja verde (brócoli, coles de Bruselas, judías verdes, guisantes). El licopeno se encuentra principalmente en tomates, sandía y papaya. La yema de huevo y el maíz son ricos en zeaxantina (*Holden y col., 1999*). Existen diferentes factores que afectan al contenido y composición de carotenoides de los alimentos, entre los que destacan la variedad, el genotipo, las condiciones climatológicas y de cultivo o el grado de maduración (*Mainai y col., 2009*).

Otra característica que justifica la importancia de algunos carotenoides es su capacidad antioxidante frente a los radicales libres. La capacidad de los carotenoides para atrapar radicales, especialmente oxígeno singlete, está ligada a su estructura de dobles enlaces conjugados, observándose la máxima eficacia cuando la molécula posee nueve o más enlaces conjugados (*Rodríguez Amaya y Kimura, 2004*). Esta actividad se ha demostrado en el  $\beta$ -caroteno, la  $\beta$ -criptoxantina, el licopeno, la luteína y la zeaxantina. La implicación de los mismos en la inhibición o reducción del estrés oxidativo, participando como antioxidantes, así como la modulación

de la diferenciación y proliferación celular serían los dos mecanismos de acción de estos compuestos. En consecuencia disminuyen el riesgo de aparición de procesos degenerativos como ciertos cánceres y tumores, enfermedades cardiovasculares, cataratas y degeneración macular, depresión del sistema inmune, etc.

Fig. 5. Estructura química de algunos carotenoides presentes en alimentos.



La luteína y su esteroisómero, la zeaxantina, se encuentran en altas concentraciones en la región macular de la retina donde se fijan constituyendo el pigmento macular amarillento y desempeñan un papel beneficioso en la reducción de riesgo de enfermedades visuales como la degeneración macular asociada a la edad. (Alves-Rodrigues y Shao, 2004). También existen pruebas que correlacionan dietas ricas en licopeno con una disminución del riesgo de desarrollar cáncer de próstata. El papel del β-caroteno en enfermedades coronarias ha sido objeto de una serie de estudios que proporcionan datos que en ocasiones son contradictorios por lo que se ha propuesto que dicha prevención se podría deber más al consumo de alimentos ricos en β-caroteno que a la suplementación con este pigmento en particular (Fraser y Bramley, 2004; Krinsky y Johnson, 2005; EFSA, 2006; Rao y Rao, 2007; Carranco-Jáuregui y col., 2011; Fiedor y Burda, 2014; Woodside y col., 2015).

## Polifenoles

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas sintetizados a partir de los hidratos de carbono a través de la ruta del ácido shikímico, con importantes implicaciones en la calidad sensorial y nutricional de los alimentos. El término “polifenoles” hace referencia a un gran número de familias (más de 8000 compuestos) con estructuras y propiedades muy diversas. Los ácidos fenólicos son las estructuras más sencillas y se dividen en ácidos hidroxibenzoicos (gálico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico) e hidroxicinámicos (cafeico, ferúlico, sinápico, *p*-cumárico). Los flavonoides constituyen el grupo más numeroso, dividiéndose en flavonas (apigenina, luteolina, tangeretina, nobiletina), flavonoles (kaempferol, quercetina), flavanonas (naringenina, hesperetina), flavan-3-oles (catequina, epicatequina), isoflavonas (daidzeína, genisteína), antocianinas (pelargonidina, delphinidina) y dihidrochalconas (floreína). La clasificación de compuestos fenólicos incluye también los taninos, los estilbenos (resveratrol) y los lignanos (*Valls y col., 2009; Ignat y col., 2011; Kalili y de Villiers, 2011*). La **Figura 6** recoge la estructura básica de estas familias.

La gran variedad de compuestos existentes explica la amplia distribución en la naturaleza. Las principales fuentes dietéticas de fenoles son las frutas y las bebidas (zumos de frutas, vino, té, café y chocolate) y, en menor medida, vegetales, legumbres secas y cereales. Los cítricos contienen flavonas y flavanonas y las zanahorias aportan ácidos hidroxicinámicos. Frutos como la uva, los arándanos o las grosellas contienen gran cantidad de antocianinas, el té es rico en ácidos fenólicos y flavonoides y la soja se considera la principal fuente dietética de isoflavonas (*Piljac-Žegarac y col., 2009; Bernhoft, 2010; Cámara y col., 2011; Manchón y col., 2013*).

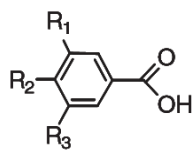
Tradicionalmente el interés de los polifenoles se ha relacionado con las propiedades organolépticas, confiriendo aroma, sabor, color (antocianinas), astringencia (taninos) o amargor (flavonoles) a los productos que los contienen (*Rolle y Guidoni, 2007*).

Los compuestos polifenólicos desempeñan una actividad antioxidante que se puede atribuir a su estructura con anillos aromáticos y dobles enlaces conjugados, a través de dos mecanismos. En primer lugar, por su facilidad para ceder átomos de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático a un radical libre y la consiguiente deslocalización de cargas en el sistema de dobles enlaces del anillo aromático, conduciendo a la neutralización de los radicales libres (*Duthie y col., 2003*). Por otra parte, los polifenoles pueden quelar iones metálicos como el hierro o el cobre y de esta forma pueden inhibir la formación de radicales libres (*García Alonso, 2005*).

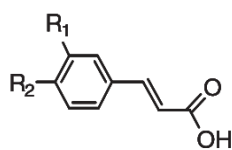
En las últimas décadas numerosos estudios han puesto de manifiesto que el consumo de compuestos fenólicos incide positivamente sobre la salud al reducir el riesgo de padecer diferentes tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, además de poseer actividad estrogénica, antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana y antienviejimiento, entre muchas otras (*Miyake y col., 2006; Kao y col., 2007; Terra y col., 2007; Juturu, 2008; García-Lafuente y col., 2009; Gorinstein y col., 2009; Aboul-Enein y col., 2013*).

Fig. 6. Estructura básica de las principales familias de compuestos fenólicos.

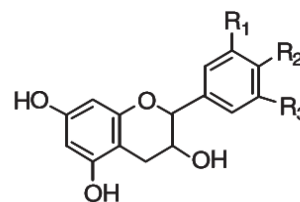
Ácidos hidroxibenzoicos



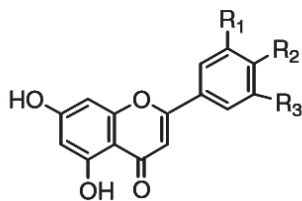
Ácidos hidroxicinámicos



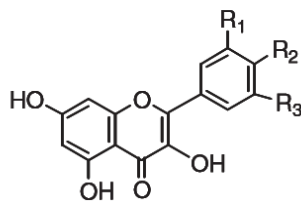
Flavanoles



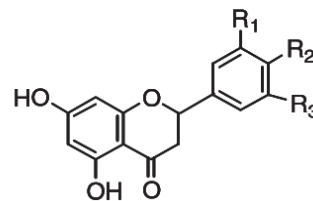
Flavonas



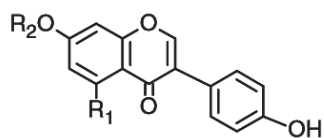
Flavonoles



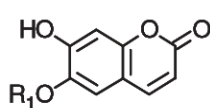
Flavanonas



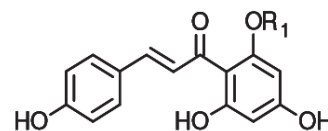
Isoflavonas



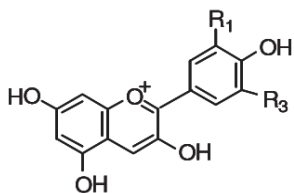
Cumarinas



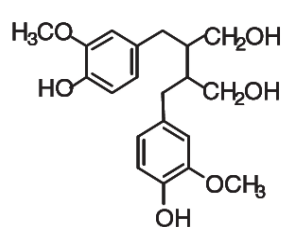
Chalconas



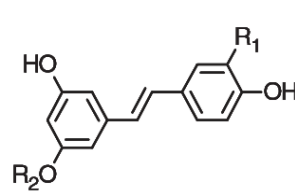
Antocianidinas



Lignanós



Estilbenos



## 4. TRATAMIENTOS INDUSTRIALES DE CONSERVACIÓN DE ZUMOS

Uno de los mayores retos de la industria de los alimentos es la conservación de los mismos para evitar la proliferación de microorganismos, con las consiguientes pérdidas económicas y daños graves para la salud de los consumidores. La estacionalidad y el carácter perecedero de las frutas justifican la obligación de aplicar técnicas de conservación con el fin de conseguir la seguridad microbiológica, preservar los atributos de calidad del alimento y extender su vida útil.

Entre la microflora capaz de deteriorar los zumos de frutas destacan las bacterias ácido-lácticas (especies de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*), las levaduras fermentativas (*Saccharomyces cerevisiae*) y los mohos formadores de esporas debido a su capacidad de crecer a valores de pH inferiores a 4,0 (Sampedro y col., 2010). Las bacterias lácticas producen malos sabores característicos debido a la producción de diacetilo como producto final del metabolismo. Las levaduras con frecuencia causan el deterioro debido a la fermentación etanólica. El deterioro de zumos de frutas también puede conducir a un aumento de la viscosidad y la producción de sulfuro de hidrógeno y otros componentes responsables de malos olores (Basak y col., 2002). Aunque se reconoce que los zumos de frutas y bebidas derivadas son microbiológicamente seguros debido a su bajo pH, algunas cepas de *E. coli* O157, *Salmonella*, *Shigella* y *Listeria* son resistentes a los ácidos y pueden sobrevivir durante largos períodos en ambientes ácidos a bajas temperaturas (Miller y Kaspar, 1994).

Estos microorganismos pueden estar presentes en el producto final por diferentes causas (alta contaminación de las materias primas, resistencia a las condiciones de procesado, contaminación post-tratamiento, etc.), dando lugar a una pequeña proporción de células supervivientes causantes de problemas de seguridad alimentaria debido a su baja dosis infectiva (Sampedro y col., 2010). El Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios establece que los microorganismos susceptibles de contaminar los productos objeto de esta Tesis son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, especies de la familia *Enterobacteriaceae* y *Escherichia coli*.

Entre las enzimas responsables de alterar las propiedades físicas y sensoriales de los zumos destaca la pectinmetilesterasa. Esta enzima es responsable de la pérdida de la turbidez característica del zumo (“nube”) y su clarificación al poco tiempo de su extracción. Las pectinmetilesterasas son enzimas ligadas a la pared celular que hidrolizan los grupos metoxilo de los residuos de ácido galacturónico en las pectinas generando grupos carboxílicos libres. Los iones divalentes, principalmente calcio, presentes en el zumo se unen a los radicales carboxilo, forman puentes entre cadenas de pectina y crean macropolímeros pécticos insolubles que tienden a precipitar y que arrastran a otros constituyentes de la “nube” del zumo, produciendo su clarificación, pérdida de turbidez, modificación de la textura, reducción en la viscosidad, pérdida de color y poca retención del sabor (Giner y col., 2000; Anthon y col., 2002; Goodman y col., 2002; Menéndez Aguirre y col., 2006). El control de su actividad es un importante punto de interés para obtener productos de alta aceptación (Jolie y col., 2009) ya que la formación de ese sedimento puede ser causa de rechazo del producto por parte del consumidor (Beveridge, 2002).

Otra enzima importante en los zumos es la polifenoloxidasa, una enzima oxidativa responsable de cambios de color y sabor indeseables y pérdidas nutricionales. Se relaciona principalmente con reacciones de pardeamiento al catalizar la hidroxilación de monofenoles, lo que lleva a la formación de di-fenoles, que a su vez se oxidan hasta quinonas en presencia de oxígeno. La condensación de las quinonas genera sustancias de tonalidad oscura (melaninas) que influyen negativamente en la calidad y la aceptabilidad de los zumos de frutas comerciales (Giner y col., 2002).

Una tercera enzima involucrada en el deterioro de los zumos es la peroxidasa, una oxidoreductasa capaz de oxidar los compuestos aromáticos presentes en las frutas por generación de radicales libres, conduciendo a cambios negativos en el sabor, la textura, el color y el valor nutricional (Élez y col., 2006; Sampedro y col., 2010).

### 4.1. Métodos tradicionales

Los tratamientos convencionales más comunes de conservación de los zumos se basan en la aplicación de calor (Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2010), si bien la congelación puede incluirse también en este grupo. Entre sus ventajas destacan la alta eficacia en la inactivación de microorganismos y enzimas alterantes. Entre los inconvenientes, el más importante es la inespecificidad, produciéndose también cambios químicos en los componentes de los alimentos: desnaturalización proteica, pardeamiento no enzimático, pérdida de calidad nutritiva, pérdida de calidad sensorial (compuestos aromáticos volátiles) y pérdida de funcionalidad (Sánchez-Moreno y col., 2006; Mosqueda-Melgar y col., 2008).

### Pasteurización

La pasteurización se define como un proceso térmico suave donde se destruyen los microorganismos patógenos, se reduce el recuento microbiano y se inactivan las enzimas que alteran las propiedades físicas y sensoriales del zumo original. El producto resultante presenta una vida media corta (Cardona Gálvez y col., 2008) y requiere la combinación con otro proceso de conservación, normalmente la refrigeración o la congelación (Vaclavik, 1998) o el uso de aditivos (acidulantes, azúcares concentrados, etc.). Dado que las pectinmetilesterasas son más termorresistentes que los gérmenes presentes en los zumos, las condiciones de tratamiento se ajustan para conseguir un nivel suficiente de inactivación de las mismas. Así, la pasteurización comercial del zumo de naranja se realiza a 90-99 °C durante 15-30 segundos (Braddock, 1999), aunque tratamientos más suaves (70-85 °C durante 10-20 s) pueden ser suficientes (Sentandreu y col., 2005). En los zumos pasteurizados refrigerados con 2-3 meses de vida útil, la estabilidad se consigue al reducir la actividad de las pectinmetilesterasa hasta niveles inferiores al 10% de la inicial.

Los zumos cítricos son especialmente termolábiles y en los tratamientos térmicos pierden sabor a fresco (esto es, a zumo recién exprimido) y adquieren sabores a cocido. Al igual que con el resto de tecnologías térmicas, el contenido en compuestos bioactivos (carotenos, vitamina C) puede resultar comprometido por la aplicación de este método de conservación (Lee y Coates, 2003; Rivas y col., 2006; Hoffmann-Ribani y col., 2009; Mertz y col., 2010; Ramson y col., 2011).

## Esterilización

La esterilización consiste en un tratamiento térmico drástico que permite la destrucción de formas vegetativas y esporas microbianas, consiguiendo una prolongada vida útil de los productos así tratados. Dado que la destrucción de microorganismos es completa, se obtienen productos estériles que pueden mantenerse a temperatura ambiente hasta más de dos años (*Bello Gutiérrez, 2000*). Esta tecnología aplica altas temperaturas (135-150 °C) durante un corto período de tiempo (4-15 s) (*Vaclavik, 1998*), lo que implica cambios sustanciales en la calidad nutricional y sensorial de los alimentos: sobrecocción, cambios de textura y sabor, fundamentalmente (*Prochaska y col., 2000*).

## Congelación

Mediante la congelación se reduce la cantidad de agua disponible, al solidificar y fijar parte de ésta, lo cual frena notablemente las reacciones químicas y bioquímicas y detiene el crecimiento microbiológico. El efecto letal de las temperaturas de congelación sobre los microorganismos se debe a la desnaturalización de las proteínas celulares debido al efecto salino que se produce y al daño físico que provocan los cristales de hielo que se forman sobre la membrana celular. La temperatura del procesado puede alcanzar los -40 °C y el almacenamiento, transporte y distribución debe llevarse a cabo preferiblemente a menos de -18 °C (*Barreiro Méndez y Sandoval Briceño, 2006*). Pese a todo, la congelación no previene de la pérdida de sabor y aroma, ni del deterioro del color y de la textura en los vegetales congelados porque los sistemas enzimáticos permanecen activos (*Rodríguez-Saona y col., 1995*). El almacenamiento en congelación acaba dando lugar a reacciones enzimáticas (respiración), oscurecimiento enzimático, cambios de color no enzimáticos (oxidación del ácido ascórbico, degradación de carotenoides, clorofilas, antocianinas y flavonoides), rancidez de las grasas, etc. (*Sabari y col., 2004*).

## 4.2. Métodos alternativos

En las últimas décadas se han llevado a cabo importantes avances en el conocimiento de tecnologías de conservación y/o transformación de alimentos distintas de las aplicaciones térmicas convencionales, permitiendo obtener alimentos mínimamente procesados con las mismas cualidades sensoriales y nutricionales que sus equivalentes frescos, garantizando la seguridad de los mismos y preservando los compuestos bioactivos (*Cullen y col., 2012*). Además, puede evitarse el uso de aditivos y conservantes en la formulación, lo que ofrece al consumidor una mayor sensación de producto fresco.

Las tecnologías emergentes de conservación se pueden clasificar en térmicas o no térmicas. La **Tabla 1** muestra las que han sido estudiadas hasta el momento actual en zumos.

La investigación tanto en el desarrollo de equipos como en las consecuencias de los nuevos tratamientos ha permitido que algunas de ellas, como las altas presiones, ya se hayan introducido en el mercado y se empleen industrialmente. Otros procesos emergentes como la luz pulsada ultravioleta, los ultrasonidos y el plasma frío aún no se encuentran completamente desarrollados (*Ofori y Hsieh, 2013*).

**Tabla 1. Tecnologías emergentes de conservación de zumos.**

Térmicas	No térmicas
Microondas	Pulsos eléctricos de alta intensidad
Radiofrecuencia	Altas presiones hidrostáticas
Calentamiento óhmico	Radiación
	Ultrasonidos
	Ozono
	Fluidos supercríticos (CO <sub>2</sub> )
	Plasma frío

### Microondas

Las microondas son ondas electromagnéticas cuya frecuencia varía entre 300 MHz y 300 GHz. Los aparatos de microondas domésticos trabajan generalmente a una frecuencia de 2,45 GHz, mientras los sistemas de microondas industriales operan a frecuencias de 915 MHz y 2,45 GHz. La principal característica del calentamiento por microondas es la capacidad de generar calor desde el interior de la matriz, hecho que no es factible por cualquier otro método de calentamiento convencional (Fu, 2004). La tecnología de microondas ha demostrado ser capaz de mejorar la calidad y preservar las características nutricionales (por ejemplo, retención de vitaminas) en comparación con las tecnologías convencionales por calentamiento (Chandrasekaran y col., 2013). La aplicación de la pasteurización por microondas se ha aplicado en gran medida a alimentos fluidos. La inactivación microbiana y enzimática de zumos, agua de coco y leche ha sido ampliamente revisada por Salazar-González y col. (2012), concluyendo que si se conocen las propiedades dieléctricas, se pueden predecir las condiciones más adecuadas de tratamiento (energía a aplicar). Uno de los problemas más importantes de calentamiento por microondas es la distribución no uniforme de la temperatura, lo que puede tener implicaciones en términos de seguridad (Vadivambal y Jayas, 2010; Zhu y col., 2012).

### Radiofrecuencia

Se trata de una técnica donde se aplica energía eléctrica que se convierte en ondas electromagnéticas que generan calor en el interior del producto debido a la oscilación de los dipolos (el agua contenida en los alimentos) y a la despolarización iónica (las sales minerales propias de los alimentos) (Ramaswamy y Tang, 2008). Las frecuencias habituales de aplicación son 13,56, 27,12 y 40,68 MHz (Marra y col., 2009). El procesamiento por radiofrecuencia ha demostrado inactivar bacterias de los géneros Clostridium, Listeria, Escherichia, Salmonella o Cronobacter en diferentes bebidas: sidra (Geveke y Brunkhorst, 2008), zumo de manzana y zumo de naranja (Trujillo y Geveke, 2014), leche (Michael y col., 2014), leche de soja (Uemura y col. 2010). Al igual que ocurría con la técnica de microondas, la principal desventaja del calentamiento dieléctrico por radiofrecuencia es la falta de uniformidad en la distribución de la temperatura, dando lugar a puntos fríos y calientes, lo cual obliga a conocer las propiedades dieléctricas de los alimentos para la precisa implantación de este tipo de tecnología a nivel industrial (Soto-Reyes y col., 2012).

## Calentamiento óhmico

Un calentador óhmico, también conocido como un calentador Joule, es un dispositivo de calentamiento eléctrico que utiliza la propia resistencia eléctrica de un líquido para generar el calor (*Zell y col., 2009*). Junto con la inactivación microbiana derivada del propio calentamiento, se produce una electroporación de las membranas celulares (*Knirsch y col., 2010*). Las principales ventajas de esta tecnología consisten en que el calentamiento se produce de manera rápida y se reparte uniformemente, no se transfiere calor residual tras cesar la corriente ni se producen incrustaciones en la superficie de transferencia del calor y el coste de mantenimiento de los equipos no es elevado. Entre los inconvenientes, se encuentra la dificultad de controlar, ya que se requiere un ajuste estrecho entre la temperatura y la distribución del campo eléctrico. En cualquier caso se requiere más información acerca de la conductividad eléctrica de cada producto para su completa implementación (*Saker y Liu, 2014*). Son varios los estudios centrados en la aplicación de este tipo de método de conservación en la industria alimentaria: pulpa de fresa (*Castro y col., 2004*), salvado de arroz (*Lakkakula y col., 2004*), leche (*Bansal y Chen, 2006*), o zumos y sopas (*Darvisbi y col., 2013*), entre otros.

## Pulsos eléctricos de alto voltaje o de alta intensidad

Consiste en la aplicación de una corriente eléctrica en forma de pulsos muy breves (1-70 kV/cm, 1-300  $\mu$ s) a través de un alimento colocado entre dos electrodos (*Asavasanti y col., 2010; Fox y col., 2007*). Es un proceso no térmico, ya que los alimentos tratados se mantienen a temperatura ambiente, o en todo caso a temperaturas inferiores a las de pasteurización del alimento. Por ello los alimentos tratados por esta tecnología tienen unas propiedades sensoriales y nutritivas más parecidas a las del producto fresco (*Barbosa-Cánovas y Bermúdez-Aguirre, 2001; Devlieghere y col., 2004*). Los pulsos eléctricos provocan la destrucción de la membrana celular de los microorganismos por electroporación sin un aporte significativo de calor (*Rastogi, 2003*). Al igual que ocurre con las altas presiones, el tratamiento por pulsos eléctricos sólo resulta eficaz para la inactivación de bacterias vegetativas, pero no de sus esporas.

Su aplicación se limita a productos alimenticios sin burbujas de aire y con baja conductividad eléctrica, productos ácidos y productos que se comercializan bajo refrigeración como zumos, leche, yogures, sopas, etc. (*Góngora-Nieto y col., 2002; Ramaswamy y Marcotte, 2005*). La retención de compuestos bioactivos (vitamina C, carotenoides, compuestos fenólicos) tras la aplicación de esta tecnología emergente resulta elevada (*Odriozola-Serrano y col., 2013*). A pesar de que se trata de una tecnología de conservación prometedora, su aplicación a escala industrial está resultando lenta, debido a la falta de datos concluyentes sobre las condiciones de procesado que se deben emplear a escala industrial y a la complejidad técnica que supone el desarrollo de equipos que permitan aplicar este tratamiento (*Wan y col., 2009; Singh y col., 2012*), por lo que en Europa aún no existen en el mercado productos comercializados con esta tecnología (*Lorente y col., 2011*).

## Altas presiones hidrostáticas

Esta tecnología utiliza el agua como medio para transmitir uniformemente presiones entre 100 y 1000 MPa a los alimentos a temperaturas suaves, lo que se traduce en una reducción significativa de la carga microbiana y una prolongación de la vida útil (*Cao y col., 2012*). Sin embargo, aunque la mayoría de las células vegetativas se puede inactivar a presiones relativa-

mente bajas (200-400 MPa), las esporas bacterianas son más resistentes y requieren una combinación de alta presión y temperatura (*Mor-Mur y col., 2014*). Este proceso tiene un impacto sólo en los enlaces no covalentes (de hidrógeno, iónicos e hidrófobos), sin apenas impacto en los enlaces covalentes, que están asociados a las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos (*Troy y col., 2001*). Actualmente, ya se dispone de productos tratados de esta manera en EEUU y Europa (*Kleber y col., 2007*). Según el estudio de *Sharma (2011)*, se estima que el mercado de alimentos procesados por altas presiones mueva entre 2 y 3 millones de dólares, fundamentalmente por la comercialización de productos como salsas y patés, alimentos preparados, carnes, mariscos, zumos y batidos. Dado que el objeto de esta Tesis Doctoral trata de evaluar los efectos de esta tecnología en la calidad global de los *smoothies*, se abordará de forma más exhaustiva en la sección 4.3.

## Radiación

Los alimentos, crudos o procesados, son expuestos a radiación ionizante (electrones de alta energía, rayos X o rayos gamma) o no ionizante (luz UV). En cualquiera de los casos se acaban generando radicales libres que ionizan las moléculas orgánicas del alimento, dando lugar a daños fundamentalmente a nivel del DNA (*De Ruiter y Dwyer, 2002; Niemira y Gao, 2012*). Las modificaciones que la radiación provoca en el color, sabor, aroma y demás parámetros de calidad son mínimos (*Alothman y col., 2009*). Microbiológicamente, los mohos y las levaduras son más resistentes a la radiación ionizante que las bacterias (*Niemira y Fan, 2009*). Son varias las matrices donde se ha demostrado la eficacia de este tratamiento: pulpa de mango (*El-Samahay y col., 2000*), zumo de naranja (*Foley y col., 2002*), zumo de zanahoria (*Song y col., 2005*), etc. A nivel nutricional y sensorial, los efectos son muy dependientes de la dosis empleada. Así, *Lee y col. (2009)* comprobaron que el color, el sabor, la capacidad antioxidante y la aceptabilidad general del zumo de tamarindo se mantenían estables o ligeramente mejorados en los tratamientos de irradiación de hasta 3 kGy, no así a una dosis de 5 kGy. A las dosis habituales utilizadas en las industrias de frutas y hortalizas (< 5 kGy), la irradiación es tan segura como el tratamiento térmico (*Smith y Pillai, 2004*). Debido al poder de penetración, la radiación ionizante siempre se aplica al producto envasado.

En el caso del tratamiento con radiación no ionizante se emplean longitudes de onda del espectro ultravioleta (100-400 nm), aunque la longitud de onda específica de 254 nm (UV-C) es la más eficaz en cuanto a poder germicida se refiere, ya que los fotones son mejor absorbidos por el ADN (*Muller y col., 2011*). En la actualidad las fuentes de luz UV trabajan por luz pulsada: pulsos cortos policromáticos de alta intensidad generados a través de lámparas de xenón (*Gómez-López y col., 2012*). En el año 2000, la FDA aprobó este tipo de tratamiento alternativo a la pasteurización para los zumos de frutas y verduras siempre que se lograra una reducción de microorganismos y patógenos de al menos 5 unidades logarítmicas. La luz UV posee una amplia actividad antimicrobiana, proporcionando una inactivación eficaz frente a virus (*Eischeid y col., 2009*), bacterias -tanto formas vegetativas como esporas-, levaduras y coqueos (*Gómez-López y col., 2005*). Existen aplicaciones estudiadas en el campo de la industria: zumos (*Tran y Farid, 2004; Koutchma y col., 2007; Guerrero-Beltrán y col., 2009; Mansor y col., 2014*) y leche (*Krishnamurthy y col., 2007*).

## Ultrasonidos

Las condiciones habituales de trabajo oscilan entre 20-100 kHz, con intensidades de entre 10 y 1000 W·cm<sup>-2</sup>. Los mecanismos a través de los cuales los ultrasonidos inactivan microorganismos están inducidos por la cavitación, que conduce al debilitamiento o la ruptura de las células bacterianas (Joyce y col., 2003; López-Malo y col., 2005). Durante la cavitación también se forman radicales libres que atacan químicamente a las células, además de producirse peróxido de hidrógeno, un bactericida *per se* (Kadkhodae y Povey, 2008; Oyane y col., 2009). El procesamiento por ultrasonidos, por sí solo o en combinación con calor y/o presión, resulta eficaz para inactivar microorganismos y retener mejor los compuestos bioactivos de los alimentos líquidos con respecto al tratamiento térmico convencional (Cheng y col., 2007; Valero y col., 2007; O'Donnell y col., 2010). Sin embargo, ciertos atributos como el sabor y el color pueden verse negativamente afectados por el efecto oxidativo y la cavitación (Petrier y col., 2007). Sus principales aplicaciones a día de hoy se reducen a zumos, *smoothies* y leche (Tiwari y Mason, 2012).

## Ozono

Frente a los agentes desinfectantes tradicionales (cloro, dióxido de cloro, clorito sódico, hipoclorito sódico, hipoclorito cálcico, ácido peroxiacético), la ozonización ha demostrado reducir los recuentos de los microorganismos alterantes y patógenos más comunes en alimentos. Su aplicación está bastante restringida a verduras, frutas y zumos, aunque su elevada actividad oxidante repercute negativamente en los compuestos bioactivos como el ácido ascórbico (Karaca y Velioglu, 2007; Tiwari y col., 2008), si bien este inconveniente es dependiente de la matriz (Cullen y col., 2009). Los alimentos líquidos (zumos) son más susceptibles a esta oxidación por la mayor difusión del ozono con respecto a la fruta completa, ya que la penetración del ozono se limita a la zona más superficial (Tiwari y col., 2013). La ozonización ha demostrado inactivar eficazmente *E. coli* en zumos de naranja (Patil y col., 2009) y de manzana (Patil y col., 2010). La eficacia de este tratamiento depende del flujo del gas, la concentración, la temperatura, el pH del medio y la presencia de materia orgánica (Patil y Burke, 2012).

## Dióxido de carbono supercrítico

Este tratamiento incluye el CO<sub>2</sub> líquido, el CO<sub>2</sub> supercrítico y el CO<sub>2</sub> altamente presurizado (*high pressurised carbon dioxide*, HPCD) y cuenta con unas propiedades muy atractivas como método de conservación de alimentos por su elevada capacidad antimicrobiana, su actividad frente a enzimas alterantes, su baja toxicidad y su fácil eliminación -basta con despresurizar- (Damar y Balaban, 2006; Liu y col., 2008). Esta tecnología ha sido aplicada sobre todo a zumos, obteniéndose mínimas modificaciones en los parámetros de calidad (Kincal y col., 2006; Ferrentino y col., 2009; Gasperi y col., 2009). La estabilidad de la capacidad antioxidante puede explicarse por una prevención de la oxidación, al eliminarse el oxígeno disuelto, y por la inactivación de la polifenoloxidasas (Del Pozo-Insfran y col., 2006).

## Plasma frío

Se trata de un cuarto estado de la materia donde no existe equilibrio termodinámico entre los electrones y la mayor parte de átomos y moléculas gaseosas (Bursać Kovačević y col., 2016), lo que da lugar a un sistema adiabático con alto contenido de energía cinética a temperaturas ba-

jas, siempre inferiores a 70 °C (*Schluter y col., 2013*). El plasma frío se genera al someter un gas a un potente campo eléctrico, ionizándose parcialmente dicho gas (*Elež Garofulic y col., 2015*). Aparte se generan especies altamente energéticas capaces de romper los enlaces covalentes e iniciar numerosas reacciones químicas con implicaciones tecnológicas (*Arjunan y col., 2015*), entre ellas la inactivación de microorganismos (*Keener, 2008*). Las exposiciones prolongadas inevitablemente merman el contenido de polifenoles antioxidantes. Actualmente esta tecnología resulta cara y costosa y existen muy pocos sistemas comercializados, centrados en aplicaciones muy concretas (*Ehlbeck y col., 2011*).

### 4.3. La tecnología de altas presiones hidrostáticas

El potencial de las altas presiones hidrostáticas para conservar alimentos se conoce desde finales del siglo XIX, cuando en 1899 Hite esterilizó leche mediante presurización, quedando demostrada la reducción de la población microbiana mediante la aplicación de esta técnica. Años más tarde estudió los efectos de las altas presiones en frutas, hortalizas y carne (*Hoover y col., 1989*). En 1914, Bridgam sometió a la clara de huevo a 500 MPa, logrando la coagulación de la albúmina (*Hayashi y col., 1989*). Sin embargo, debido a las limitaciones en el campo de la ciencia de los materiales, esta tecnología no comenzó a desarrollarse con fines comerciales hasta finales del siglo XX en Japón (*Rastogi y col., 2007*).

#### 4.3.1. Fundamento

Las altas presiones hidrostáticas constituyen una técnica de procesado que, como ya se ha mencionado, consiste en someter al alimento sólido o líquido ya envasado en su formato final flexible a presiones de entre 100 y 1000 MPa, con agua como vehículo transmisor de la presión, a una temperatura en un rango de 0 y 100 °C durante un tiempo variable que oscila entre unos pocos segundos hasta 20 minutos (*San Martín y col., 2002*).

Existen dos principios fundamentales en los que se basa la aplicación de las altas presiones (*Valdez-Fragoso y col., 2011*):

- a) Principio de Le Chatelier. Los fenómenos acompañados de una disminución de volumen son favorecidos por un aumento de presión y viceversa. Según este principio, la aplicación de la alta presión aumenta la velocidad de las reacciones que involucran una disminución del volumen y retarda aquellas donde el volumen aumenta.
- b) Principio de Pascal. El incremento de presión aplicado en la superficie de un fluido incompresible (en este caso agua como transmisor de la presión) contenido en un recipiente indeformable se transmite con el mismo valor a cada una de las partes del mismo. La presión aplicada se transmite de manera uniforme y casi instantánea a todos los puntos del alimento, independientemente de su composición, tamaño y forma geométrica (*Oey y col., 2008*). Ello evita la deformación del producto, a pesar de estar sometido a tan altas presiones, y hace que éste sea muy homogéneo y no presente zonas sobretratadas. En consecuencia, los problemas de variaciones espaciales en los tratamientos de conservación asociados al calor, las microondas y la radiación no se observan en los productos tratados por alta presión (*Rastogi y col., 2007*).

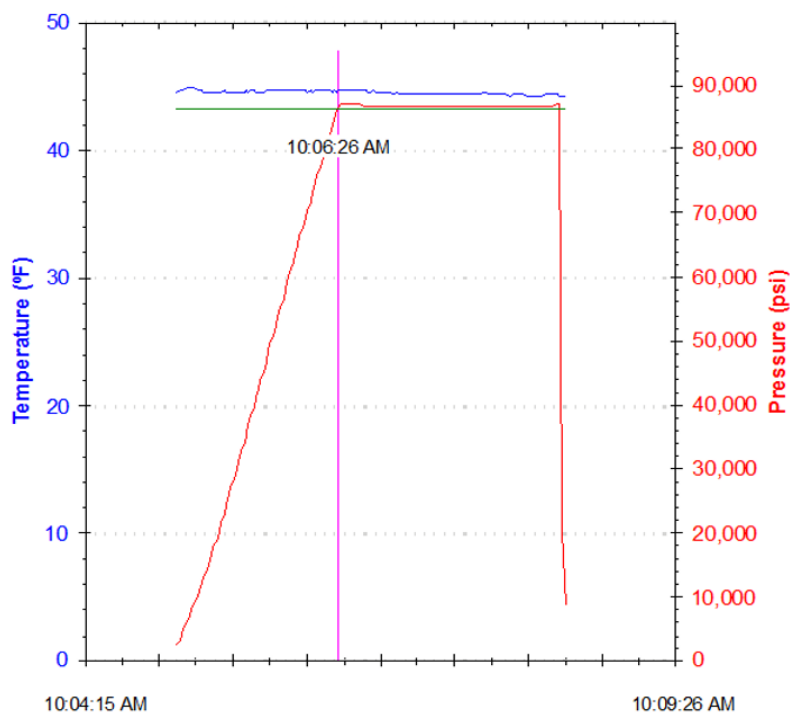
La efectividad de este tipo de tratamiento tecnológico es debida al efecto que las altas presiones tienen sobre la morfología, estructura y funcionalidad de las membranas celulares (alteraciones de la permeabilidad celular e intercambio de iones), metabolismo y mecanismos de división de los microorganismos (Sánchez y col., 2012).

### 4.3.2. Aspectos tecnológicos y equipamiento

El tratamiento por altas presiones se aplica a alimentos sólidos y líquidos en envase flexible, a vacío. No se utiliza en alimentos envasados en recipientes rígidos (cristal o lata) ni en alimentos sólidos que incluyan aire (pan y mousses, por ejemplo) (Pina Pérez, 2011).

Los tres parámetros críticos a controlar en el diseño de cualquier tratamiento por altas presiones son la presión, el tiempo y la temperatura (Fig. 7). Las presiones habituales de trabajo oscilan entre los 350 y los 800 MPa (Heinz y Buckow, 2010). Con respecto al tiempo, no sólo es importante la duración del tratamiento a la presión deseada sino también el tiempo requerido hasta lograr dicha presión y el tiempo de descompresión post-tratamiento hasta recuperar la presión atmosférica.

Fig. 7. Ciclo real de tratamiento de altas presiones aplicado a un zumo.



Condiciones de tratamiento: 87000 psi (600 MPa) / 180 s / 7 °C.

La tecnología HP puede aplicarse en un amplio rango de temperaturas. Así, temperaturas suaves (10-40 °C) pueden ser suficientes para obtener productos microbiológicamente seguros siempre que se conserven en refrigeración (Mújica-Paz y col., 2011). También al aplicar temperaturas superiores (60-90 °C) puede conseguirse la esterilización de los productos por inactivación completa de las formas vegetativas y las esporas microbianas (Black y col., 2007). Hay que considerar los cambios de temperatura que se producen durante la compresión/

descompresión (calentamiento/enfriamiento adiabático), así como controlar la temperatura inicial del producto y su distribución en el recipiente a la presión prefijada. En este sentido, cabe recalcar que la compresión aumenta uniformemente la temperatura de los alimentos aproximadamente 3 °C por cada 100 MPa, aunque en los alimentos muy grasos se produce mayor aumento de temperatura, en torno a los 8 ó 9 °C/100 MPa (Rasanayagam y col., 2003). Otros factores implicados en el proceso de conservación por altas presiones son la composición del producto, el pH, la actividad de agua y la integridad del envase que lo contiene. La efectividad de un tratamiento por altas presiones es mayor cuanto más bajo sea el pH del alimento tratado. Además, la presencia de antimicrobianos en el mismo, como puede ser el caso de la lisozima del huevo, reduce la viabilidad de los microorganismos patógenos, favoreciéndose la inactivación total (Smelt y col., 1998; Masschalck y col., 2001).

Los equipos de alta presión hidrostática (Fig. 8) empleados en el procesado de alimentos están formados, fundamentalmente, por una cámara de presurización (vasija cilíndrica de acero de elevada resistencia), un generador de presión generalmente constituido por una bomba hidráulica y un sistema multiplicador de presión, y por último un sistema de control de temperatura (Patterson y Linton, 2010).

Fig. 8. Ejemplo de un equipo comercial de altas presiones.



(Fuente: [www.hiperbaric.com/es/](http://www.hiperbaric.com/es/))

La **Tabla 2** resume las principales características de los equipos comercializados por Hiperbaric.

Tabla 2. Características técnicas de los equipos de alta presión comercializados por Hiperbaric.

Equipo	Capacidad (litros)	Dimensiones vasija (mm ø)	Intensificadores	Potencia (KW)	Tiempo total de ciclo* (min)	Productividad (Kg/hora)
Hiperbaric 55	55	220	1	55	6,2	266
Hiperbaric 120	120	200	2	100	6,5	555
Hiperbaric 135	135	300	2	100	6,9	650
Hiperbaric 300	300	300	4	190	5,6	1338
			6	280	7,4	
Hiperbaric 420	420	380	6	280	7,7	2257
			8	370	6,7	
Hiperbaric 525	525	380	8	370	7,6	2821
			10	460	6,7	

(Fuente: [www.hiperbaric.com/es/](http://www.hiperbaric.com/es/))

\*El tiempo total de ciclo incluye la carga y descarga automática de contenedores de producto envasado en bandeja al vacío, subida de presión, mantenimiento a 6000 bares durante 3 minutos, bajada de presión y tiempo de máquina (movimientos necesarios del equipo en producción).

Aunque existen distintos tipos de funcionamiento, en la mayoría de los casos las industrias de altas presiones trabajan en modo discontinuo, es decir, por lotes (*Knorr y col., 2006*). Las etapas que integran cada uno de los ciclos son (*Pina Pérez, 2011*):

- 1) Llenado de la vasija con el fluido presurizante (agua normalmente).
- 2) Introducción del producto a presurizar, ya envasado en el recipiente final.
- 3) Cerrado de la vasija y la válvula.
- 4) Incremento de la presión hasta los valores establecidos, sustituyendo el aire de la cámara por el fluido de presurización hasta su total llenado. Una vez alcanzada la presión deseada, la válvula que cierra el circuito permitirá el mantenimiento de la presión durante el tiempo requerido, sin necesidad de aporte adicional de energía. El registro de la temperatura en el interior de la vasija se realiza mediante termopares inmersos en el fluido presurizante.
- 5) Descompresión de la vasija una vez finalizado el tratamiento.
- 6) Extracción de las muestras tratadas.

La **Figura 9** esquematiza un proceso de altas presiones.

**Fig. 9. Esquema de funcionamiento de una unidad de altas presiones.**



(Fuente: [www.hiperbaric.com/es/](http://www.hiperbaric.com/es/)).

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta la técnica de altas presiones hidrostáticas es conseguir alimentos que puedan almacenarse a temperatura ambiente manteniendo la calidad organoléptica y la seguridad alimentaria. La tecnología de altas presiones por sí sola no tiene capacidad de inactivación de esporas, por lo que resultan necesarias ciertas condiciones adicionales al procesado, como son un almacenamiento en refrigeración, una disminución de pH por debajo de 4,5 o una actividad de agua reducida para evitar la germinación de las esporas bacterianas. La combinación sinérgica que se obtiene al aplicar de forma conjunta presión y temperatura permite alcanzar la inactivación de esporas bacterianas a menor temperatura, menor tiempo o una combinación de ambos. De este modo se producen alimentos que no requieren almacenamiento refrigerado o aditivos acidulantes. Las condiciones de trabajo abarcan hasta 1000 MPa de presión y 120 °C de temperatura (*García-Parra y col., 2014*).

### 4.3.3. Efectos de las altas presiones hidrostáticas

El procesado por altas presiones hidrostáticas a temperatura de refrigeración, temperatura ambiente o con calentamiento moderado, permite la reducción e incluso inactivación de microorganismos alterantes y patógenos en los alimentos, al tiempo que se evitan las con-

secuencias negativas de los tratamientos térmicos convencionales. Además, dado el carácter post-ensado de este tratamiento, el riesgo de contaminación cruzada se minimiza considerablemente (Sánchez-Moreno y col., 2009; Sampedro y Fan, 2010; Barba y col., 2012).

### Efectos microbiológicos

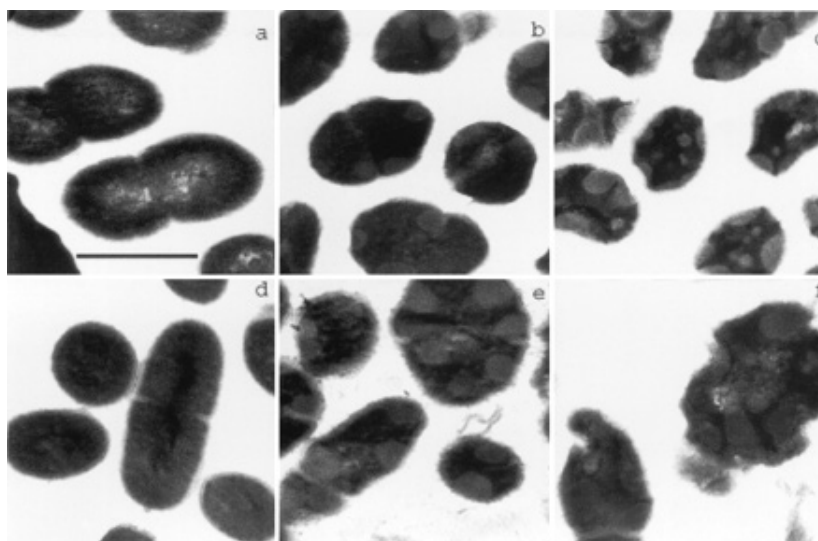
Los mecanismos de acción atribuidos a la presión e involucrados en la destrucción o inactivación de microorganismos se deben principalmente a cambios en la membrana celular, cambios bioquímicos, morfológicos y genéticos.

La membrana celular es una estructura especialmente sensible a la presión, responsable en muchos casos de la muerte de las células sometidas a condiciones suficientes de tratamiento. Basta una presión de 300 MPa para provocar la desnaturalización irreversible de las proteínas y fosfoproteínas que componen la membrana celular, modificándose la permeabilidad de la misma y viéndose alterado el intercambio iónico. Cuando las células se encuentran en división (fase logarítmica), su membrana celular es más susceptible a los factores externos, como la presión (Téllez-Luis y col., 2001).

A nivel bioquímico, las altas presiones destruyen la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas enzimáticas, que se mantienen por interacciones débiles no covalentes. Puesto que la actividad biológica de una enzima depende de la configuración tridimensional de su centro activo, cualquier modificación estructural conduce a la pérdida de actividad enzimática. Presiones superiores a 200 MPa son suficientes para lograr su inactivación (Ludikbyzje y col., 2002).

Las altas presiones producen también cambios morfológicos en las células vegetativas de los microorganismos como compresión del gas de las vacuolas, alargamiento de las células, separación de la membrana y pared celular, contracción de la pared celular con formación de poros, modificaciones del citoesqueleto, modificaciones de los núcleos y orgánulos intracelulares, coagulación de la proteína citoplasmática y liberación de constituyentes intracelulares fuera de la célula (Téllez-Luis y col., 2001) (Fig. 10).

**Fig. 10.** Micrografías de *Lactococcus lactis* subs. *cremoris* MG1363 (a, b y c) y SK11 (d, e y f) no tratadas y tratadas por alta presión. Condiciones de presión: 0,1 MPa (a y d), 300 MPa (b y e) y 800 MPa (c y f) (Malone y col., 2002).



A nivel genético, las altas presiones inactivan las enzimas implicadas en la replicación y transcripción del ADN (Linton y Patterson, 2000).

No todos los microorganismos son igualmente sensibles a los efectos de la presión; es lo que se conoce como *barorresistencia*. Esta variación existe no sólo entre especies, sino también entre cepas de las mismas especies. Casi todas las bacterias pueden crecer hasta valores de 20-30 MPa. Las levaduras y la mayoría de mohos son especialmente sensibles a la presión. Las células eucariotas son más sensibles a la presión que las procariotas, y las Gram positivas resisten mejor la presión que las Gram negativas. Presiones inferiores a 400 MPa son suficientes para inactivar la mayoría de células vegetativas. Las ascosporas, un tipo de moho, se inactivan a 400 MPa y las especies del género *Byssochlamys* (un moho importante en alimentos enlatados ácidos) resisten tratamientos de 700 MPa/15 minutos. Las esporas bacterianas son las formas de vida más resistentes a la presurización, requiriendo presiones del orden de 1000 MPa para su destrucción (Farkas y Hoover, 2000; Téllez-Luis y col., 2001; Rendueles y col., 2011).

Diversos estudios ponen de manifiesto que las altas presiones hidrostáticas dan lugar a la generación de poblaciones dañadas subletalmente que podrían recuperarse en condiciones óptimas tras el tratamiento (Bozoglu y col., 2004), lo que implica una sobreestimación incorrecta de la vida útil del producto. Este hecho debe tenerse en cuenta en lo que respecta a la seguridad del alimento por sus implicaciones en la salud pública. Por ello es deseable la combinación de ciclos de presión o de la tecnología HP con temperatura, antimicrobianos, CO<sub>2</sub>, pulsos eléctricos o ultrasonidos. Temperaturas en el rango de 45 a 50 °C parecen aumentar los ratios de inactivación en microorganismos patógenos y en levaduras. Temperaturas de procesamiento entre 90-110 °C en combinación con niveles de presión entre 700-900 MPa consiguen la inactivación de esporulados tales como *Clostridium botulinum* o *Bacillus stearothermophilus* (Rajan y col., 2006; Ramaswamy y col., 2013).

## Efectos a nivel sensorial

A diferencia de lo que ocurre con el tratamiento térmico, los componentes químicos asociados con las cualidades deseables de los alimentos (aminoácidos, vitaminas, moléculas volátiles), tales como el sabor, el color o el valor nutricional parecen no estar influidos por la acción de la presión, ya que ésta no afecta a los enlaces covalentes (McInerney y col., 2007; Oey y col., 2008). Sin embargo, la estructura de macromoléculas como proteínas, enzimas, polisacáridos y ácidos nucleicos sí puede verse afectada por la acción de las altas presiones debido a la ruptura de enlaces no covalentes, más débiles, del tipo de enlaces por puente de hidrógeno, enlace iónico e interacciones hidrofóbicas (Knorr y col., 2006). La aplicación de altas presiones hidrostáticas conduce a cambios conformacionales en la estructura terciaria de las proteínas. La posibilidad de desnaturalización o de cambios en el centro activo conducen a pérdidas de la actividad enzimática o cambios en su funcionalidad (Tson, 1986).

Los tratamientos por calor inactivan las enzimas responsables de la alteración de los zumos (pectinmetilesterasa, pectinesterasa, poligalacturonasa, polifenoloxidasas, peroxidasa, papaína, etc.) y prolongan su vida útil, pero cuentan con el inconveniente de deteriorar la calidad nutricional y sensorial de los productos así tratados. En el caso de la presión, son suficientes 500 MPa para inactivar de manera efectiva la actividad de la pectinmetilesterasa, enzima responsable de la disminución de la viscosidad de los zumos de frutas con la consiguiente afectación de la textura (Nienaber y Shellhammer, 2001; Sampedro y col., 2008). Por tanto, su inactivación es

un requisito indispensable para este tipo de productos. *Sbook y col. (2001)* estudiaron la intensidad de la presión necesaria para inactivar la lipooxigenasa y la poligalacturonasa en tomate troceado, concluyendo que la pérdida completa de la actividad de ambas se produce a partir de 800 MPa. Para conseguir la inactivación completa de la polifenoloxidasas y la peroxidasa resulta imprescindible combinar el tratamiento de altas presiones con un tratamiento térmico (*Rastogi y col., 2007*).

De acuerdo con los estudios llevados a cabo por *Tamaoka y col. (1991)*, presiones del orden de 5 a 50 MPa a 50 °C evitan la generación de radicales libres estables derivados de melanoidinas, responsables del pardeamiento no enzimático de los alimentos. Por tanto, las altas presiones hidrostáticas dificultan la reacción de Maillard en los alimentos en los que pueda darse (*Jaeger y col., 2010*). La estructura interna del tomate se endurece con la presurización y el ennegrecimiento de las cabezas de crustáceos puede evitarse por la aplicación de altas presiones (*Linton y col., 2003*). Los tejidos de la carne y filetes de pescado en *pre-rigor mortis* tratados con altas presiones se ablandan y se vuelven opacos (*Tellez-Luis y col., 2001*) y los huevos sometidos a altas presiones no tienen el sabor y el olor sulfuroso característico provocado por el calentamiento (*Hayashi, 1989*).

En cuanto al efecto de las altas presiones sobre la apariencia y la textura, los cambios que se producen dependen de las condiciones de tratamiento y del alimento en cuestión. A modo de ejemplos, la aplicación de 500 MPa apenas afecta a la microestructura y textura del pimentón dulce, obteniéndose mejores valores de firmeza, masticabilidad y gomosidad a esa presión que otras inferiores, del orden de 100 a 300 MPa (*Hernández-Carrión y col., 2014*). De acuerdo al trabajo de *Kausbick y col. (2015)*, la aplicación de 600 MPa se consideró la presión límite por encima de la cual comenzaban a verse mermados los atributos sensoriales en pulpa de mango, mientras que este efecto no se observó en zumo de lichi tratado en las mismas condiciones.

## **Efectos sobre los componentes bioactivos**

El comportamiento de los compuestos bioactivos frente a las altas presiones difiere bastante en función de la intensidad aplicada y la matriz estudiada, lo que obliga a un estudio caso por caso (*Barba y col., 2012; Oms-Olín y col., 2012*).

Los carotenoides totales permanecen estables (*Butz y col., 2002; Sánchez-Moreno y col., 2005; McInerney y col., 2007*) tras el tratamiento por altas presiones. En relación a estructuras concretas de carotenoides, los efectos de la alta presión dependen de que el producto se encuentre troceado, triturado, exprimido, etc. (*Barret y Lloyd, 2012*). Existen datos que justifican tanto la pérdida como la ganancia de  $\alpha$  y  $\beta$  carotenos,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, licopeno y zeaxantina (*Sánchez-Moreno y col., 2003; Jun, 2006; Wolbang y col., 2008*).

En el caso de las vitaminas del grupo B, la tiamina ( $B_1$ ), la riboflavina ( $B_2$ ) y el piridoxal ( $B_6$ ) parecen ser bastante resistentes al efecto de las altas presiones (*Gabrowska y col., 2005; Butz y col., 2007*), mientras que el ácido fólico ( $B_9$ ) resulta más sensible al efecto de la presión debido a la desglutamilación de los folatos (*Verlinde y col., 2008*), siendo este hecho más evidente en espárrago y zumo de zanahoria que en naranja o kiwi (*Indrawati y col., 2004*).

La vitamina C (ácido ascórbico) apenas se ve afectada por acción de la alta presión hidrostática, al menos si la aplicación se lleva a cabo a temperaturas moderadas (*Bull y col., 2004; Sánchez-Moreno y col., 2009*). Por encima de 65 °C, la aplicación de alta presión conlleva un calentamiento adiabático del producto que deriva en pérdidas de ácido ascórbico más ele-

vadas (Oey y col., 2008). Además, la oxidación tanto química como enzimática supone una importante vía de degradación del ácido ascórbico, siendo este fenómeno poco controlado en muchos de los estudios publicados (Barret y Lloyd, 2012).

Tampoco parecen existir pérdidas significativas en el contenido de tocoferoles en leche sometida a 400-600 MPa (Molto-Puigmartí y col., 2011).

El contenido en polifenoles no se ve comprometido por acción de las altas presiones, incluso en muchos estudios se ha destacado un aumento en el contenido inicial de polifenoles totales (Keenan y col., 2012) y de polifenoles individuales (Kouniaki y col., 2004; Sánchez Moreno y col., 2005; Ferrari y col., 2010; Plaza y col., 2011).

Hay muy pocos estudios relacionados con los efectos de las altas presiones hidrostáticas sobre los minerales, los lípidos y la fibra alimentaria (Barret y Lloyd, 2012).

#### 4.3.4. Aplicación de las altas presiones hidrostáticas

La tecnología de altas presiones constituye probablemente la tecnología no térmica más desarrollada comercialmente. En la actualidad son ya muchas las aplicaciones, alimentarias o no, donde se emplea esta técnica.

Los productos cárnicos y sus derivados listos para el consumo han sido los principales beneficiados de esta tecnología durante los últimos años. La tecnología HP permite aumentar la vida útil del producto manteniendo su frescura, calidad sensorial y nutricional y postulándose como una alternativa eficaz a los conservantes y aditivos artificiales para garantizar la seguridad alimentaria (Kruk y col., 2011).

Los pescados y mariscos son también ejemplos de productos que actualmente se procesan por alta presión. En este caso las principales aplicaciones son la apertura de moluscos por la desnaturalización de las proteínas del músculo aductor (200-350 MPa) produciéndose además la inactivación de *Vibrio*, *Norovirus* y otros patógenos (Kingsley y col., 2007) o la extracción de carne de crustáceos como langostas y cangrejos.

En los zumos, la aplicación de altas presiones mejora la calidad del producto final, obteniéndose bebidas con cualidades sensoriales, nutricionales y funcionales similares a las del producto fresco y con una mayor vida útil (Lin y col., 2013). El procesado de determinados zumos como los de granada, manzana, zanahoria, brócoli o remolacha se verían seriamente comprometidos con un tratamiento térmico.

En el sector de lácteos, el procesado por altas presiones ofrece varias posibilidades de mejora en aspectos como la seguridad, funcionalidad y posibilidades de exportación e innovación de productos. El procesado por alta presión de queso fresco puede modular la maduración y puede ser una gran opción también para la pasteurización en frío de queso elaborado con leche fresca. En el caso de los yogures, 100 MPa son suficientes para frenar la fermentación láctica, aunque el crecimiento microbiano se restablece al volver a la presión atmosférica (Mota y col., 2015). La diferente sensibilidad de los microorganismos a la presión puede ser utilizada para seleccionar las cepas probióticas o inactivar microorganismos no deseables mediante esta tecnología, lo que supone una ventaja muy importante en la fabricación de yogures (Nomura e Imahashi, 2014).

Las altas presiones hidrostáticas constituyen una técnica válida para los platos preparados en envase flexible y sellado (barquetas, bandejas termoformadas, tarrinas y bolsas), las salsas, los aderezos para ensaladas y los *dips* (salsas para untar snacks y aperitivos), ya que consiguen una extensa vida útil del producto en refrigeración al minimizar el deterioro microbiano y las contaminaciones cruzadas. Al tratarse de un proceso no térmico, no se modifican las propiedades de la emulsión (*Antón y col., 2001*). Los productos listos para consumo con una base de verdura o proteína y que además lleven un aliño, una mayonesa o un base láctea tienen limitaciones muy importantes en cuanto a deterioro microbiológico (recontaminaciones y contaminaciones cruzadas al mezclarse muchos ingredientes), vida útil, y calidad organoléptica durante su vida en refrigeración. Salsas de tomate frescas, guacamoles, *hummus* o *taboulé* cambian sensiblemente de sabor al ser sometidos a pasteurización térmica tradicional y cuando se formulan con acidulantes y otros aditivos conservadores (*Pandurangi y col., 2014*).

La aplicación de altas presiones hidrostáticas se puede utilizar con fines distintos a la conservación, como por ejemplo en la obtención de distintos tipos de geles de pescado, carne, huevo y leche. Así mismo, esta tecnología acelera la difusión de solutos en diversos alimentos, la solubilización de gases y los procesos de extracción. La posibilidad de utilizar altas presiones para mantener alimentos a temperaturas inferiores a 0 °C en estado líquido o para inducir una congelación y descongelación ultra-rápida constituyen un nuevo y prometedor campo de estudio y aplicación en la industria alimentaria.

### 4.3.5. Evaluación económica y percepción social

La tecnología de altas presiones requiere una maquinaria específica, de elevado coste, lo que conlleva una elevada inversión inicial por parte de la industria que no siempre puede asumir, además de unos gastos anuales de mantenimiento, superficie utilizada y consumo de electricidad y agua. Las cámaras de tratamiento tienen capacidades entre 35 y 700 L, con un coste que oscila generalmente entre los 300.000 y 2 millones de euros, según el tamaño (*Patterson y Linton, 2010*). Esto da lugar a un encarecimiento del producto final con respecto al producto convencional (entre 0,05 y 0,2 €/Kg).

Sin embargo, pese a esta limitación, hay que considerar que la innovación tecnológica en la industria alimentaria es uno de los pilares en los que se sustenta el incremento de la competitividad. La imagen de empresa innovadora que otorga el empleo de la tecnología de altas presiones permite el desarrollo de productos innovadores, seguros y funcionales, de alto valor añadido (productos *premium*, de IV y V gama, etc.), facilitando así la expansión y exportación a mercados exigentes como Estados Unidos y Japón.

Los consumidores europeos tienden a ser reticentes y arriesgarse poco a la hora de consumir (*Nelson, 2001*) y a pesar de los esfuerzos para proporcionar seguridad alimentaria, la difusión de las nuevas tecnologías en la sociedad resulta complicada (*Ronteltap y col., 2007*). La aceptación por parte de los consumidores parece un proceso a largo plazo y requiere de mensajes concisos desde fuentes de información fidedignas: profesionales sanitarios, universidades y organizaciones de consumidores, fundamentalmente (*Rollin y col., 2011*). La aplicación de nuevas tecnologías en productos tradicionales puede modificar su percepción entre los consumidores, así como su valor de mercado. En un estudio llevado a cabo por *Chaya-Romero y col. (2012)* para evaluar un producto innovado (jamón serrano) entre 229 consumidores, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en la aceptación, ni en el precio que estarían dispuestos a pagar por el jamón tratado frente al no tratado.

## 2. OBJETIVOS





## Objetivo general

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral consiste en la evaluación del efecto de la tecnología emergente de conservación de altas presiones hidrostáticas sobre los parámetros nutricionales, sensoriales, funcionales y microbiológicos de *smoothies* elaborados con leche de vaca o leche de soja, así como su modificación durante la vida comercial. El objetivo general incluye la caracterización previa de bebidas mixtas comerciales.

El desarrollo de *smoothies* de alto potencial saludable y la búsqueda de tecnologías alternativas que minimicen la pérdida de compuestos bioactivos puede suponer una aportación de gran valor en el ámbito de la alimentación y la salud. Profundizar en el conocimiento de la calidad global de estos productos y procesos se podrá tomar como base para el establecimiento futuro de guías de normalización.

## Objetivos específicos

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Caracterización de bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y leche o soja comercializadas en España desde un punto de vista sensorial, nutricional y funcional.
2. Desarrollo de una bebida mixta de tipo *smoothie* con leche de vaca y con leche de soja, seleccionando las materias primas por su interés desde el punto de vista funcional.
3. Aplicación de distintas condiciones de altas presiones hidrostáticas a dichas bebidas como tecnología emergente de conservación.
4. Evaluación comparativa de las distintas intensidades de presión aplicadas en relación a la calidad global del producto.
5. Puesta a punto y validación de las metodologías analíticas empleadas para la caracterización química de los componentes de los *smoothies*.
6. Evaluación de los parámetros nutricionales, sensoriales, funcionales y microbiológicos de los *smoothies*.
7. Comparación del efecto del procesado por altas presiones con respecto al tratamiento térmico de pasteurización y al producto fresco sobre los parámetros analizados.
8. Evaluación del efecto del almacenamiento en refrigeración (4 °C) durante un periodo de 45 días sobre dichos parámetros y la vida útil del producto.



# 3. DISEÑO EXPERIMENTAL



1. Muestras .....	77
1.1 Muestras comerciales .....	77
1.2 Desarrollo de <i>smoothies</i> .....	81
2. Tratamientos y almacenamiento .....	81

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado fundamentalmente en el Departamento de Nutrición y Bromatología II: Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, si bien ciertas metodologías se han realizado en laboratorios de otros Organismos de investigación y control de alimentos. Los análisis microbiológicos y de elementos minerales por ICP-AES se han llevado a cabo en el Laboratorio de Salud Pública de Madrid Salud y la caracterización de polifenoles individuales por HPLC, en el Centro para la Calidad de los Alimentos del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) de Soria.

El trabajo experimental se divide en dos fases. En primer lugar, se ha llevado a cabo un estudio de mercado de un amplio número de bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y leche o soja comercializadas en España. Los análisis en estas muestras han ido encaminados a su caracterización desde un punto de vista general, nutricional, sensorial y funcional y han dado lugar a las publicaciones 1, 2 y 3.

Una vez evaluados los resultados, se han desarrollado dos bebidas de tipo *smoothie* ricas en componentes bioactivos y bien valoradas organolépticamente por consumidores potenciales, conservadas por la tecnología de altas presiones hidrostáticas. En ambos casos, la mezcla de frutas fue similar y mientras que una de ellas incorporaba leche de vaca en su composición, la otra se elaboró con leche de soja orientada al consumo por la población intolerante a la lactosa o con alergia a la proteína de vaca.

La razón de la elección de un *smoothie* radica en la mayor concentración de bioactivos y nutrientes con respecto a los zumos, ya que al incorporar trozos de fruta entera o purés de frutas, esto se traduce en un menor contenido acuoso y una concentración relativa de solutos. Además, al elaborarse por trituración, tampoco se producen los residuos que se desechan cuando se exprime el zumo y que pueden retener componentes de interés. Por otra parte, el hecho de utilizar varios productos vegetales en la elaboración del *smoothie* contribuye al consumo de una diversidad de frutas y hortalizas deseable en una alimentación equilibrada. La técnica de conservación seleccionada persigue la optimización en la retención de los fitoquímicos, especialmente los más lábiles, sin limitar la vida útil del producto desarrollado.

Las muestras fueron ampliamente caracterizadas, desde el punto de vista nutricional, sensorial, funcional y microbiológico. Además del efecto del tratamiento por altas presiones en comparación con el respectivo producto fresco y pasteurizado, se investigaron también los cambios derivados del almacenamiento durante 45 días en refrigeración (4 °C) sobre dichos parámetros. Los resultados obtenidos se incluyen en las publicaciones 4, 5 y 6.

La **Tabla 3** resume los parámetros que han sido analizados en cada tipo de muestra.

Tabla 3. Relación de parámetros evaluados en las bebidas mixtas comerciales y los *smoothies*.

Bebida	Análisis	Parámetro	Publicación
Bebidas refrescantes mixtas	Parámetros generales	°Brix	1
		pH	1
		Color (CIELab)	1
	Análisis nutricional	Azúcares	3
		Ácidos orgánicos	3
		Elementos minerales	3
		Aniones	3
	Análisis sensorial	Panel de cata	3
	Análisis funcional	Carotenoides	1
		Tocoferoles	2
		Ácido ascórbico	1
		Polifenoles totales (Folin)	1
		Capacidad antioxidante (FRAP)	1
	Smoothies	Parámetros generales	°Brix
pH			4-6
Color (CIELab)			4-6
Acidez total			4-6
Densidad			4-6
Análisis nutricional		Azúcares	5
		Ácidos orgánicos	5
		Elementos minerales	5
Análisis sensorial		Panel de cata	5
Análisis funcional		Carotenoides	4-6
		Ácido ascórbico	4-6
		Polifenoles individuales (HPLC)	6
		Polifenoles totales (Folin)	4-6
		Capacidad antioxidante (FRAP y DPPH)	4-6
Análisis microbiológico	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	
	Bacterias aerobias mesófilas	5	
	Mohos y levaduras	5	
	<i>Escherichia coli</i> β-glucuronidasa positivo	5	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	

## 1. Muestras

### 1.1. Muestras comerciales

Se han analizado un total de 24 muestras representativas del grupo comercial “bebidas refrescantes mixtas” a base de fruta y leche o soja. Las muestras se adquirieron en varios establecimientos de Madrid, tanto marcas de fabricante como marcas blancas, y se agruparon inicialmente en cinco categorías en función del propio etiquetado: Mediterráneo, Tropical, Multifrutas, Caribe y Soja, con objeto de analizar el color, los compuestos bioactivos y la capacidad antioxidante cuyos datos se encuentran en la publicación nº 1. La **Tabla 4** recoge el etiquetado de cada una de ellas: denominación comercial, porcentaje de fruta, ingredientes, proporción de leche o semillas de soja y aditivos.

La denominación comercial no proporciona información clara con respecto a la composición de las bebidas, ya que en algunos casos se daba la circunstancia de que productos con distinta denominación respondían a una incorporación de los mismos ingredientes, de modo que el etiquetado de una bebida mixta “Caribe” podía ser una réplica de otra etiquetada como “Mediterráneo”. Por esta razón, para el análisis de los parámetros nutricionales y atributos sensoriales en las bebidas refrescantes mixtas se planteó una agrupación más coherente de las muestras atendiendo a los ingredientes como factor diferencial determinante de su composición. De este modo se restringió el muestreo a un total de 19 muestras que fueron enumeradas y clasificadas tomando como criterios de agrupación la presencia de leche y naranja como fruta principal (Grupo A), la presencia de leche y otras frutas distintas de la naranja como ingrediente principal (Grupo B) y por último la presencia de soja (grupo C). La **Tabla 5** recoge la numeración y características de las muestras comerciales utilizadas para el análisis nutricional y sensorial objeto de la publicación nº 2.

Por último, a la hora de poner a punto, validar y evaluar el contenido en tocoferoles, retinol y  $\beta$ -caroteno utilizados como aditivos en estas bebidas, se planteó una nueva selección de bebidas mixtas comerciales, escogiendo un total de 16 muestras correspondientes a aquellas en las que figuraba la incorporación de tales aditivos en el etiquetado. En la **Tabla 6** figuran las muestras utilizadas para este fin, con la codificación correspondiente, así como los datos correspondientes a la cantidad de cada componente adicionado. Estas muestras se han utilizado en la publicación nº 3.

Tabla 4. Relación y etiquetado de las bebidas refrescantes mixtas objeto del análisis de color, compuestos bioactivos y capacidad antioxidante.

Muestra	Categoría	Marca	% fruta	Ingredientes	% leche desnatada	Aditivos
1	Mediterráneo	Biofrutas	33,7	Naranja, limón, zanahoria, melocotón, maracuyá, acerola y piña	10	Pectina, aroma, citrato trisódico, vitaminas C (9 mg), E (1,5 mg) y A (120 ug), sucralosa y carotenos
2		Don Simón	15	Naranja, zanahoria y melocotón	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, β-caroteno y aromas
3		Minute Maid	30	Naranja (20%), manzana (5%), uva (2%), limón (2%) y melocotón (1%)	10	Pectina, citrato sódico, ácido cítrico, aromas, ácido ascórbico, β-caroteno y vitamina E (1,8 mg)
4		Hacendado	20	Naranja, piña, manzana, zanahoria, mango, guayaba y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas C (30 mg) y E (1,5 mg), β-caroteno (120 ug) y aromas
5		Carrefour	25	Naranja, manzana, piña y limón	10	Pectina, acidulante (ácido cítrico), vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug) y aromas
6	Tropical	Biofrutas	7	Piña y mango	10	Pectina, aroma, ácido cítrico, vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug), sucralosa y β-caroteno
7		Don Simón	15	Piña, mango y manzana	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, β-caroteno y aromas
8		Minute Maid	10	Naranja (8%), mango (1%) y piña (1%)	10	Pectina, ácido cítrico, citrato sódico, aromas, ácido ascórbico, β-caroteno y vitamina E (1,8 mg)
9		Hacendado	7,2	Piña (3%), uva, mango (2%) y manzana	10	Pectina, ácido cítrico, sucralosa, vitaminas C (9 mg), y E (1,5 mg), β-caroteno (120 ug) y aromas
10		Super-Sol	15	Manzana, mango y piña	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, β-caroteno y aromas
11	Multifrutas	Don Simón	15	Naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, β-caroteno y aromas
12		Trina	30	Manzana, naranja, uva y melocotón	10	Pectina, ácido cítrico, citrato trisódico, β-caroteno (120 ug), C (9 mg) y E (1,5 mg), aromas, aspartamo y acesulfamo K
13		Corte Inglés	25	Naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas A (120 ug), C (30 mg) y E (1,5 mg) y aromas
14		Día	15	Piña, zanahoria, uva y mango	10	Pectina, ácido cítrico, vitamina C, aroma y β-caroteno
15	Caribe	Don Simón	15	Naranja, manzana, piña y limón	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico y aromas
16		Biofrutas	42,5	Manzana, kiwi, naranja y lima	10	Pectina, aroma, vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug), sucralosa, clorofila y cúrcuma
17		Hacendado	15	Uva, manzana, naranja y piña	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas C (30 mg), E (1,5 mg) y A (120 ug), aromas y provitamina A
18		Carrefour	25	Naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug) y aromas
19		Corte Inglés	25	Naranja, manzana, piña y limón	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas A (120 ug), C (30 mg) y E (1,5 mg) y aromas
20	Soja	Vive Soy	11	7% papaya y 4% mango	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico y carotenos
21		Vive Soy	11	Naranja	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico y β-caroteno
22		Vive Soy	11	Melocotón	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico, β-caroteno y curcumina
23		Hacendado	50	Manzana, uva, plátano (1%), fresa (1%) y arándanos	Semillas soja (3%)	Pectina, aromas, ácido cítrico, citrato cálcico, ácido ascórbico, carotenos y ácido carnínico
24		Hacendado	50	Manzana, piña (15%), naranja (10%) y uva. Leche de coco	Semillas soja (3%)	Pectina, aromas, ácido cítrico, citrato cálcico, ácido ascórbico y carotenos

Tabla 5. Relación y etiquetado de las bebidas refrescantes mixtas objeto del análisis nutricional y sensorial.

Muestra	Categoría	Marca	% fruta	Ingredientes	% leche desnatada	Aditivos
A1	M	Biofrutas	33,7	Naranja, limón, zanahoria, melocotón, maracuyá, acerola y piña	10	Pectina, aroma, citrato trisódico, vitaminas C (9 mg), E (1,5 mg) y A (120 ug), sucralosa y carotenos
A2	M	Don Simón	15	Naranja, zanahoria y melocotón	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, β-caroteno y aromas
A3	M	Minute Maid	30	Naranja (20%), manzana (5%), uva (2%), limón (2%) y melocotón (1%)	10	Pectina, citrato sódico, ácido cítrico, aromas, ácido ascórbico, β-caroteno y vitamina E (1,8 mg)
A4	M	Hacendado	20	Naranja, piña, manzana, zanahoria, mango, guayaba y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas C (30 mg) y E (1,5 mg), β-caroteno (120 ug) y aromas
A5	T	Minute Maid	10	Naranja (8%), mango (1%) y piña (1%)	10	Pectina, ácido cítrico, citrato sódico, aromas, ácido ascórbico, β-caroteno y vitamina E (1,8 mg)
A6	F	Don Simón	15	Naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, β-caroteno y aromas
A7	C	Corte Inglés	25	Naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas A (120 ug), C (30 mg) y E (1,5 mg) y aromas
A8	C	Corte Inglés	25	Naranja, manzana, piña y limón	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas A (120 ug), C (30 mg) y E (1,5 mg) y aromas
B1	T	Biofrutas	7	Piña y mango	10	Pectina, aroma, ácido cítrico, vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug), sucralosa y β-caroteno
B2	T	Don Simón	15	Piña, mango y manzana	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, β-caroteno y aromas
B3	T	Hacendado	7,2	Piña (3%), uva, mango (2%) y manzana	10	Pectina, ácido cítrico, sucralosa, vitaminas C (9 mg), y E (1,5 mg), β-caroteno (120 ug) y aromas
B4	T	Super-Sol	15	Manzana, mango y piña	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, β-caroteno y aromas
B5	F	Día	15	Piña, zanahoria, uva y mango	10	Pectina, ácido cítrico, vitamina C, aroma y β-caroteno
B6	C	Hacendado	15	Uva, manzana, naranja y piña	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas C (30 mg), E (1,5 mg) y A (120 ug), aromas y provitamina A
C1	S	Vive Soy	11	7% papaya y 4% mango	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico y carotenos
C2	S	Vive Soy	11	Naranja	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico y β-caroteno
C3	S	Vive Soy	11	Melocotón	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico, β-caroteno y curcumina
C4	S	Hacendado	50	Manzana, uva, plátano (1%), fresa (1%) y arándanos	Semillas soja (3%)	Pectina, aromas, ácido cítrico, citrato cálcico, ácido ascórbico, carotenos y ácido carmínico
C5	S	Hacendado	50	Manzana, piña (15%), naranja (10%) y uva. Leche de coco (0,5%)	Semillas soja (3%)	Pectina, aromas, ácido cítrico, citrato cálcico, ácido ascórbico y carotenos

Codificación: muestras con leche y naranja como ingrediente principal (Grupo A). Muestras con leche y otras frutas distintas a la naranja como ingrediente principal (Grupo B). Muestras con soja (grupo C). Categorías comerciales: Mediterráneo (M), Tropical (T), Multifrutas (F), Caribe (C) y Soja (S).

Tabla 6. Relación y etiquetado de las bebidas refrescantes mixtas objeto del análisis de tocoferoles, retinol y  $\beta$ -caroteno.

Muestra	Categoría	Marca	% fruta	Ingredientes	% leche desnatada	Aditivos
1	M	Biofrutas	33,7	Naranja, limón, zanahoria, melocotón, maracuyá, acerola y piña	10	Pectina, aroma, citrato trisódico, vitaminas C (9 mg), E (1,5 mg) y A (120 ug), sucralosa y carotenos
2	M	Minute Maid	30	Naranja (20%), manzana (5%), uva (2%), limón (2%) y melocotón (1%)	10	Pectina, citrato sódico, ácido cítrico, aromas, ácido ascórbico, $\beta$ -caroteno y vitamina E (1,8 mg)
3	M	Hacendado	20	Naranja, piña, manzana, zanahoria, mango, guayaba y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas C (30 mg) y E (1,5 mg), $\beta$ -caroteno (120 ug) y aromas
4	M	Carrefour	25	Naranja, manzana, piña y limón	10	Pectina, acidulante (ácido cítrico), vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug) y aromas
5	T	Biofrutas	7	Piña y mango	10	Pectina, aroma, ácido cítrico, vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug), sucralosa y $\beta$ -caroteno
6	T	Don Simón	15	Piña, mango y manzana	10	Pectina, ácido cítrico, ácido ascórbico, $\beta$ -caroteno y aromas
7	T	Minute Maid	10	Naranja (8%), mango (1%) y piña (1%)	10	Pectina, ácido cítrico, citrato sódico, aromas, ácido ascórbico, $\beta$ -caroteno y vitamina E (1,8 mg)
8	T	Hacendado	7,2	Piña (3%), uva, mango (2%) y manzana	10	Pectina, ácido cítrico, sucralosa, vitaminas C (9 mg), y E (1,5 mg), $\beta$ -caroteno (120 ug) y aromas
9	C	Biofrutas	42,5	Manzana, kiwi, naranja y lima	10	Pectina, aroma, vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug), sucralosa, clorofila y cúrcuma
10	C	Hacendado	15	Uva, manzana, naranja y piña	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas C (30 mg), E (1,5 mg) y A (120 ug), aromas y provitamina A
11	C	Carrefour	25	Naranja, zanahoria, piña, maracuyá, mango, guayaba, albaricoque y papaya	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas C (12 mg), E (1,8 mg) y A (120 ug) y aromas
12	C	Corte Inglés	25	Naranja, manzana, piña y limón	10	Pectina, ácido cítrico, vitaminas A (120 ug), C (30 mg) y E (1,5 mg) y aromas
13	S	Vive Soy	11	7% papaya y 4% mango	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico y carotenos
14	S	Vive Soy	11	Naranja	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico y $\beta$ -caroteno
15	S	Vive Soy	11	Melocotón	Semillas soja (2,7%)	Pectina, ácido cítrico, aroma, ácido ascórbico, $\beta$ -caroteno y curcumina
16	S	Hacendado	50	Manzana, piña (15%), naranja (10%) y uva. Leche de coco (0,5%)	Semillas soja (3%)	Pectina, aromas, ácido cítrico, citrato cálcico, ácido ascórbico y carotenos

Categorías comerciales: Mediterráneo (M), Tropical (T), Caribe (C) y Soja (S).

## 1.2. Desarrollo de *smoothies*

Se han desarrollado dos prototipos de *smoothies* mixtos con productos vegetales a los que se les ha añadido leche de vaca o leche de soja. En su elaboración se mezclaron 500 mL de zumo de naranja (*Citrus sinensis* cv Valencia Late), 135 mL de puré de papaya (*Carica papaya* cv Maradol), 135 mL de puré de melón (*Cucumis melo* L. Cantaloup), 130 mL de puré de zanahoria (*Daucus carota* L. cv Nantes) y 100 mL de leche desnatada (Leche Pascual, Burgos) o leche desnatada de soja (Vivesoy, Leche Pascual, Burgos). Los melones fueron suministrados por la empresa Syngenta (Syngenta Seeds, Puebla de Vúcar, Almería) y el resto de los ingredientes fueron adquiridos en varios supermercados de Madrid, seleccionando en el caso de los productos vegetales el adecuado grado de madurez. Las naranjas fueron exprimidas en un blender Z14 (Zummo Mechanical Innovaciones S.A., Valencia) y los demás, en un Vitamix VI-5086 (Ripex, Naucalpan de Juárez, Mexico). Una vez elaborada la mezcla, se adicionó ácido ascórbico (200 mg/L) y se procedió al envasado en frascos de polietileno.

## 2. Tratamientos y almacenamiento

Las 24 muestras comerciales no sufrieron ningún tratamiento puesto que al estar comercializadas ya se encontraban pasteurizadas.

Los *smoothies*, una vez envasados, fueron sometidos a un proceso de altas presiones hidrostáticas. Las bebidas elaboradas con leche de vaca fueron sometidas a dos intensidades de presión: 450 y 600 MPa, y a las formuladas con leche de soja se les aplicaron presiones de 550 y 650 MPa. En los cuatro casos, las variables de tiempo y temperatura se mantuvieron constantes con objeto de evaluar tan solo el efecto de la presión: 3 minutos y 20 °C. Los envases fueron pesados antes y después del tratamiento por altas presiones para comprobar que no se había producido variación del volumen por una posible apertura durante el procesado o por la entrada de agua (líquido transmisor de la presión) en los mismos. La tecnología de altas presiones se llevó a cabo en un presurizador modelo Hiperbaric-55 (Hiperbaric, Burgos).

Para comparar el impacto del tratamiento y del almacenamiento sobre las características evaluadas, los *smoothies* se sometieron también a un proceso convencional de tratamiento térmico, por ser la tecnología habitualmente aplicada para conservar los zumos. Estos ensayos se llevaron a cabo a 80 °C durante 3 minutos en un baño de agua a escala de laboratorio. Tras el procesado, las muestras se enfriaron en un baño de hielo y cuando alcanzaron la temperatura ambiente, se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta el momento de los análisis.

Las condiciones de temperatura y presión fueron seleccionadas con fines comparativos, ya que se trata de condiciones de pasteurización y presurización equivalentes (Vervoort y col., 2011).

Junto con los *smoothies* tratados por altas presiones y por tratamiento térmico, se reservaron ciertos envases a los que no se aplicó ningún tratamiento de conservación (muestras control) que se utilizaron como referencia para poder comparar los efectos de los tratamientos aplicados.

Para evaluar el efecto que producía el almacenamiento sobre las características generales, nutricionales, funcionales y microbiológicas, los *smoothies* de ambos tipos de sabores -y tanto

los tratados térmicamente como los HPP- se mantuvieron en refrigeración a 4 °C durante 45 días. En el caso de los zumos control (no tratados), el almacenamiento se estudió hasta un total de 30 días, ya que a partir de ese momento los resultados impedían una prolongación de la vida útil del producto en condiciones de seguridad para un consumidor potencial. Los puntos de muestreo se establecieron cada 15 días desde el momento de aplicación de la tecnología de conservación correspondiente (día 0).

# 4. MÉTODOS ANALÍTICOS



1. Validación de los métodos analíticos .....	85
2. Métodos analíticos .....	88
2.1. Parámetros generales.....	88
2.2. Parámetros nutricionales .....	89
2.3. Análisis sensorial.....	91
2.4. Parámetros funcionales.....	91
2.4.1. Compuestos bioactivos .....	91
2.4.2. Capacidad antioxidante .....	96
2.5. Análisis microbiológico .....	96
3. Tratamiento estadístico .....	97

## 1. Validación de los métodos analíticos

Los métodos empleados fueron validados con objeto de demostrar que eran idóneos para el fin previsto. Los parámetros de validación evaluados fueron sensibilidad, linealidad, exactitud y precisión (**Tabla 7**). Inicialmente fueron validados los protocolos analíticos para las bebidas refrescantes mixtas. Dado que los *smoothies* presentan una consistencia mayor y esto podía derivar en problemas de extracción, se llevaron a cabo ciertos ajustes que obligaron a adaptar los métodos y revalidarlos.

Para el cálculo de la linealidad de los métodos se emplearon al menos 5 niveles de calibración. La linealidad se expresó como una función lineal, ajustada por mínimos cuadrados, de tipo

$$y = mx + b$$

de manera que la función de calibrado quedara delimitada entre el límite de cuantificación (al menos en el caso de los compuestos minoritarios) y un nivel superior como máximo en dos órdenes de magnitud. En ningún caso se extrapoló fuera de dichos límites, sino que se optó por partir de menor cantidad de muestra o diluirla al final. El tipo de cuantificación fue por patrón externo, excepto en el caso de los elementos minerales por ICP-AES, donde se empleó una disolución de itrio como patrón interno. En todos los casos se partió de patrones comerciales de elevada pureza que se manipularon de acuerdo a sus características especiales (sensibilidad a la luz, oxígeno, etc.). Como criterios de aceptación de resultados se estableció un coeficiente de correlación,  $r^2$ , igual o superior a 0,99 y un coeficiente de linealidad mayor del 95%.

La sensibilidad de los métodos se estableció con el cálculo de los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ). En el caso de los métodos cromatográficos, estos parámetros se establecieron según la concentración a la cual la relación señal/ruido del analito era de 3 y 10, respectivamente. En el caso de los métodos espectrométricos, el LOD y el LOQ se establecieron de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{LOD o LOQ} = \frac{k \times m}{SD}$$

siendo  $k=3$  para el LOD y  $k=10$  para el LOQ,  $m$ = pendiente de la recta de calibrado y  $SD$  la desviación estándar de la respuesta de 10 blancos.

La exactitud se estimó mediante el análisis de muestras preparadas en el laboratorio por adición de disoluciones patrón sobre las propias muestras de estudio a tres niveles de concentración, cubriendo todo el rango de trabajo y sobretodo la concentración habitual de analito hallada en las muestras. Las muestras reforzadas fueron sometidas a todo el proceso analítico y los resultados se expresaron en términos de recuperación según la fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Valor obtenido} \times 100}{\text{Valor de referencia}}$$

Como criterio de aceptación de resultados se estableció un intervalo de recuperación entre el 80 y el 120%.

La precisión se estudió en condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad siguiendo la misma sistemática que en el caso de la exactitud (muestras reforzadas). Para la repetibilidad se analizaron 5 réplicas para cada uno de los 3 niveles de concentración. Con los 15 resultados

obtenidos se calculó el promedio, la desviación estándar de repetibilidad ( $S_p$ ) y el coeficiente de variación ( $RSD_p$ ). La estimación de reproducibilidad permitió evaluar las variaciones debidas a ciertos factores como la temperatura ambiental, la utilización de nuevos envases de reactivos y disolventes, la preparación de nuevas soluciones de trabajo, curvas de calibración diferentes, etc. La sistemática fue similar a la de repetibilidad, a lo largo de 3 días distintos. Con los 45 datos se calculó el valor promedio global, la desviación estándar de reproducibilidad ( $S_R$ ) y el coeficiente de variación ( $RSD_R$ ). Como criterio de aceptación de resultados se estableció una RSD inferior al 10%.

Tabla 7. Resumen de los parámetros de validación.

Análito	Linealidad		Sensibilidad		Exactitud		Precisión		
	Rango de trabajo	r <sup>2</sup>	CL (%)	LOD	LOQ	Concentración reforzada	Recuperación (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	RSD <sub>R</sub> (%)
Glucosa	2-20 g/L	0,999	99	1,7 mg/L	4 mg/L	0,5-5 g/L	93	2	5
Fructosa	2-20 g/L	0,999	99	5 mg/L	12 mg/L	0,5-5 g/L	95	2	2
Lactosa	2-20 g/L	0,999	99	7 mg/L	18 mg/L	0,5-5 g/L	88	3	4
Sacarosa	2-20 g/L	0,999	99	5 mg/L	15 mg/L	0,5-5 g/L	95	1	3
Ácido cítrico	30-1000 mg/L	0,993	98	10 mg/L	30 mg/L	50-500 mg/L	101	4	4
Ácido málico	25-1000 mg/L	0,994	98	10 mg/L	20 mg/L	25-100 mg/L	111	1	3
Ácido tartárico	30-500 mg/L	0,995	97	10 mg/L	25 mg/L	25-100 mg/L	108	3	5
Ácido oxálico	1-20 mg/L	0,991	95	0,5 mg/L	1 mg/L	2,5-10 mg/L	106	3	5
Ácido quínico	30-1500 mg/L	0,996	95	10 mg/L	30 mg/L	30-500 mg/L	102	4	6
Na	10-500 mg/L	0,996	99	nc	10 mg/L	100-250 mg/L	94	4	5
K	50-500 mg/L	0,998	98	nc	50 mg/L	100-250 mg/L	92	2	3
Ca	1-500 mg/L	0,991	98	nc	1 mg/L	100-250 mg/L	102	4	7
Mg	1-500 mg/L	0,999	97	nc	1 mg/L	100-250 mg/L	98	3	6
Fe	0,2-10 mg/L	0,989	99	nc	0,2 mg/L	0,05-10 mg/L	97	1	3
Cu	0,05-10 mg/L	0,992	98	nc	0,05 mg/L	0,05-10 mg/L	100	5	5
Zn	0,2-10 mg/L	0,992	99	nc	0,2 mg/L	0,05-10 mg/L	108	1	2
Mn	50-5000 µg/L	0,998	99	nc	50 mg/L	50-5000 µg/L	99	1	2
Cd	5-500 µg/L	0,990	98	nc	5 µg/mL	10-50 µg/L	98	2	2
Pb	10-500 µg/L	0,991	98	nc	10 µg/mL	10-50 µg/L	98	2	2
Licopeno	2,5-150 µg/mL	0,994	99	1,5 µg/mL	2,5 µg/mL	10-40 µg/mL	99	5	6
β-caroteno	1-100 µg/mL	0,999	99	0,5 µg/mL	1 µg/mL	5-100 µg/mL	96	5	6
Luteína	1,5-100 µg/mL	0,995	97	1 µg/mL	1,5 µg/mL	1,5-10 µg/mL	104	4	6
Retinol	0,5-10 µg/mL	0,999	na	0,05 µg/mL	0,1 µg/mL	0,5-5 µg/mL	91	4	5
Palmitato de retinol	1-100 µg/mL	0,998	na	0,6 µg/mL	1 µg/mL	1-25 µg/mL	101	1	1
Acetato de α-tocoferol	50-250 µg/mL	0,997	na	0,7 µg/mL	2 µg/mL	50-100 µg/mL	103	1	1
α-tocoferol	2-40 µg/mL	0,994	na	0,6 µg/mL	2 µg/mL	2,5-10 µg/mL	95	1	4
γ-tocoferol	2,5-20 µg/mL	0,998	na	0,6 µg/mL	1,5 µg/mL	2,5-10 µg/mL	95	1	3
δ-tocoferol	2,5-20 µg/mL	0,995	na	0,5 µg/mL	1,8 µg/mL	2,5-10 µg/mL	93	1	1
Ácido ascórbico	0,15-150 µg/mL	0,995	97	0,05 µg/mL	0,15 µg/mL	5-50 µg/mL	94	4	5
Polifenoles totales	15-200 µg/mL	0,995	98	5 µg/mL	15 µg/mL	25-100 µg/mL	92	4	5
FRAP	0,05-0,8 mM	0,998	98	0,01 mM	0,02 mM	0,05-0,5 mM	94	5	9
DPPH	na	na	na	na	na	na	na	6	10

na: no aplica, nc: no calculado.

## 2. Métodos analíticos

### 2.1. Parámetros generales

#### Densidad

La densidad se determinó mediante el uso de un picnómetro y una balanza analítica ML204 (Mettler Toledo, Barcelona) calculándose de acuerdo a la siguiente ecuación:

Donde M1 corresponde al peso del picnómetro vacío, M2 corresponde al peso del picnómetro lleno con agua destilada y M3 es el peso del picnómetro lleno con la muestra cuya densidad se desea medir. El resultado se expresó como la media aritmética de 3 repeticiones.

$$\text{Densidad} = \frac{M3 - M1}{M2 - M1}$$

#### Acidez

Para medir la acidez se centrifugaron por triplicado 30 mL de cada una de las bebidas a 7000 rpm durante 15 minutos. Se tomaron 10 mL del sobrenadante y se diluyeron con 10 mL de agua destilada. Dicha disolución se valoró con NaOH 0,1N hasta pH 8,2. El resultado se expresó como la media aritmética del triplicado, en g de ácido cítrico/L.

#### pH

En el mismo sobrenadante obtenido para la determinación de la acidez se midió el pH de las muestras con un pH-metro Microph 2000 (Crison, Barcelona, España) previamente calibrado con patrones de pH 4,0, 7,1 y 9,3 a 25 °C. El resultado se expresó como la media aritmética del triplicado.

#### Sólidos solubles totales (°Brix)

La determinación de sólidos solubles totales se llevó a cabo disponiendo 2-3 gotas de cada muestra en el lector del refractómetro Atago RX-1000 (Tokyo, Japón) a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron como la media aritmética de 5 repeticiones, en °Brix.

#### Color

El color se analizó mediante un colorímetro Minolta CR-200 (Osaka, Japón) introduciendo las muestras en unas cubetas de vidrio de aproximadamente 50 ml de capacidad para su lectura. Los parámetros analizados fueron L\* (luminosidad), a\* (verde-rojo) y b\* (azul-amarillo). El aparato se calibró frente a una placa blanca patrón (Y= 86,3, x= 0,3165, y= 0,3240) y los resultados obtenidos correspondieron a la media aritmética de 5 réplicas.

En el caso de las muestras tipo *smoothie*, se evaluó también la diferencia de color entre las muestras tratadas (pasteurizadas y HPP) con respecto a la muestra control sin procesar y durante todo el período de almacenamiento estudiado. Para ello se aplicó la siguiente ecuación:

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

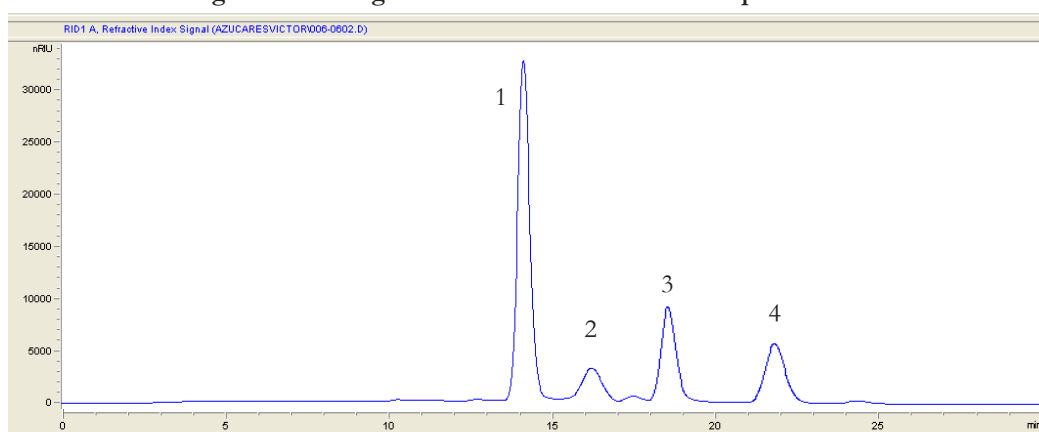
donde  $\Delta L^*$ ,  $\Delta a^*$  y  $\Delta b^*$  son las diferencias de las muestras tratadas con respecto al *smoothie* control a tiempo inicial de almacenamiento (día 0) para esos tres parámetros.

## 2.2. Parámetros nutricionales

### Azúcares

El método descrito se basó en el propuesto por Mateos-Aparicio y col. (2010) con algunas modificaciones. En la etapa preanalítica, las muestras (10 mL) se diluyeron con agua ultrapura y se centrifugaron (7000 rpm, 10 min). El sobrenadante se purificó haciéndolo pasar por un cartucho de SPE Strata-X 33 $\mu$ m (Phenomenex, Torrance, CA, USA) previamente activado con metanol. Los analitos se eluyeron con agua. El procedimiento analítico se llevó a cabo en un HPLC Agilent 1100 acoplado a un detector de índice de refracción con una columna cromatográfica Rezex RPM-Monosaccharide Pb<sup>2+</sup> de 8  $\mu$ m (300 x 7,8 mm) (Phenomenex). El volumen de inyección fue de 5  $\mu$ L y la temperatura del horno se fijó en 85 °C. La separación cromatográfica se llevó a cabo en modo isocrático con agua ultrapura como fase móvil a un flujo de 0,5 mL/min. Los azúcares identificados fueron sacarosa, lactosa, glucosa y fructosa. El método se validó, obteniéndose datos que confirman una buena linealidad ( $r^2 > 0,996$  y  $CL > 99\%$ ), sensibilidad (LOD entre 1,7 y 7 mg/L y LOQ entre 4 y 19 mg/L), exactitud (89-102%) y precisión ( $RSD_r < 3\%$  y  $RSD_R < 6\%$ ) (Tabla 7).

Fig. 11. Cromatograma de azúcares identificados por HPLC.

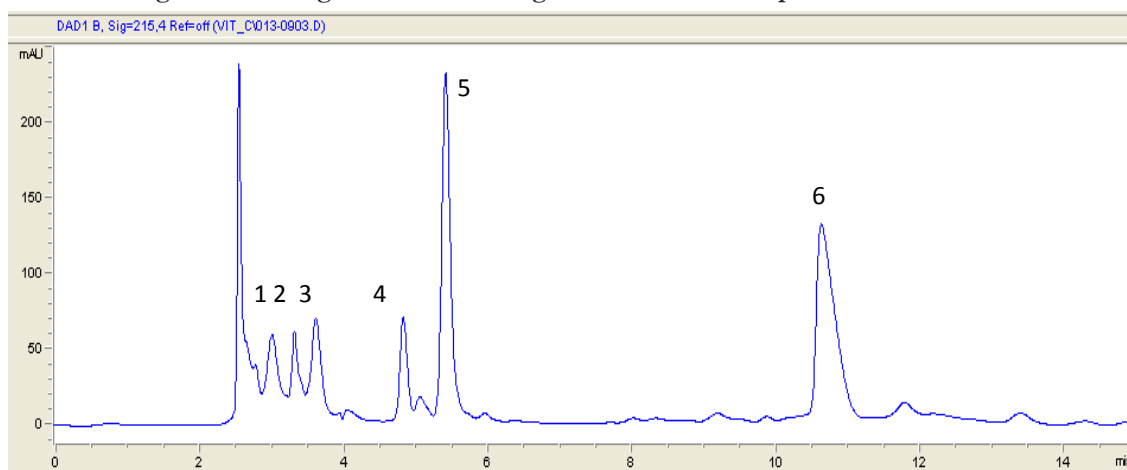


1: sacarosa; 2: lactosa; 3: glucosa; 4: fructosa

### Ácidos orgánicos

El procedimiento utilizado para el análisis de ácidos orgánicos permitió el análisis simultáneo del ácido ascórbico (Vázquez-Odériz y col. 1994). Las muestras (5 mL) se diluyeron con ácido metafosfórico al 4,5% facilitando la extracción mediante baño de ultrasonidos durante 15 minutos y posterior centrifugación (7000 rpm, 10 min) hasta obtener una concentración intermedia del rango de trabajo de la recta de calibrado. El sobrenadante se purificó haciéndolo pasar por un filtro de membrana de nylon de 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro previo al análisis. El equipo empleado fue un HPLC Agilent 1100 acoplado a un detector de diodos array (DAD) a 215 nm. El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L. La separación se llevó a cabo isocráticamente a 25 °C en una columna Kinetex C18 5  $\mu$ m (250 x 4,60 mm) (Phenomenex) con agua ultrapura acidificada con ácido sulfúrico 12M hasta pH 2,55  $\pm$  0,05. Para evitar el solapamiento de los primeros picos entre sí y con el frente del cromatograma, el flujo de trabajo elegido fue de 0,4 mL/min. Los ácidos orgánicos analizados fueron el L-tartárico, L-málico, láctico, cítrico, oxálico y quínico. Las muestras se analizaron por triplicado. Los resultados de validación fueron adecuados:  $r^2 > 0,991$ ,  $CL > 95\%$ , LOD entre 0,5 y 10 mg/L, LOQ entre 1 y 30 mg/L, recuperaciones entre el 94 y el 103%,  $RSD_r < 4\%$  y  $RSD_R < 9\%$  (Tabla 7).

Fig. 12. Cromatograma de ácidos orgánicos identificados por HPLC a 215 nm.



1: ácido quínico, 2: ácido oxálico, 3: ácido tartárico, 4: ácido málico, 5: ácido ascórbico, 6: ácido cítrico.  
 NOTA: Aunque el ácido ascórbico se pueda identificar a 215 nm, la longitud de onda utilizada para su cuantificación es 245 nm.

### Elementos minerales (cationes)

Para el análisis de los elementos minerales en las bebidas refrescantes mixtas se partió de 20 g de muestra, que fueron incinerados en horno mufla Thermo M110 (Thermo Scientific Heraeus, Waltham, MA, USA) alcanzando 450 °C en pasos de 7 horas. Una vez atemperadas, la digestión se completó añadiendo 1 mL de ácido nítrico concentrado, se dejó evaporar y las muestras permanecieron a 450 °C durante 24 horas más. Las cenizas se disolvieron en 10 mL de agua destilada y fueron filtradas por papel Whatman No. 44. Se llevaron a cabo diluciones adicionales para las determinaciones de Ca y Mg con  $\text{La}_2\text{O}_3$  (hasta concentración final de 10 g/L) y de Na y K con CsCl (hasta concentración final de 2 g/L). Los elementos analizados fueron Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn, Cd y Pb haciendo uso de un espectrofotómetro de absorción atómica de llama AA 280 FS (Varian, Palo Alto, CA, USA). Las muestras se analizaron por triplicado. Este método fue validado en términos de exactitud y precisión, obteniéndose recuperaciones entre el 93 y el 99%, desviaciones estándar de repetibilidad ( $\text{RSD}_p$ ) inferiores al 2% y desviaciones estándar de reproducibilidad ( $\text{RSD}_R$ ) inferiores al 5%.

En el caso de los *smoothies*, se siguió un procedimiento interno del Laboratorio de Salud Pública de Madrid de acuerdo a los criterios de la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Se partió de 0,5 g de muestra liofilizada (Telstar LyoQuest, Terrasa, Barcelona), se adicionaron 4 mL de ácido nítrico 6M y 1 mL de agua oxigenada 33% (p/v). Las muestras se digirieron por microondas (ETHOS One, Milestone, Sorisole, Italia) en una rampa de temperatura programada, alcanzándose 180 °C en 20 minutos. A continuación, el contenido se transfirió a un matraz de 10 mL y se completó el volumen con agua hasta el enrase. El multianálisis de los elementos Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Cd y Pb se llevó a cabo por ICP-AES (Varian 720-ES, Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) con una solución de itrio (5 mg/L) como patrón interno. Las muestras se analizaron por duplicado. Cada serie analítica se acompañó de un blanco de muestra, un control interno (muestras adicionadas) por duplicado y/o un material de referencia certificado como controles de calidad. La linealidad del método quedó demostrada al obtenerse coeficientes de correlación y de linealidad superiores a 0,989 y al 97%, respectivamente. En este caso no se determinó el límite de detección del método sino

el de cuantificación, que se estableció entre 0,005 mg/L (cadmio) y 50 mg/L (potasio). La exactitud resultó satisfactoria al obtenerse recuperaciones entre el 92 y el 108%, así como la precisión, con  $RSD_r$  inferiores al 3% y  $RSD_R$  inferiores al 6% (Tabla 7).

## Aniones

Tras la dilución de las muestras con agua destilada se procedió al análisis de cloruros, nitratos, fosfatos y sulfatos por cromatografía de intercambio iónico (Metrohm Advanced IC-861, Metrohm AG, Suiza) de acuerdo al procedimiento descrito y validado por Gómez-Ordóñez y col. (2010). El polímero de intercambio aniónico empleado fue alcohol polivinílico con grupos amonio cuaternarios. La separación se llevó a cabo con la columna Metrosep A Supp 5–250 (5  $\mu$ m; 250 x 4mm) y la detección se realizó con un detector de conductividad (Metrohm Advanced IC-819, Metrohm AG, Suiza). Todas las medidas se realizaron a 32 °C y flujo de 0,7 mL/min. La fase móvil estaba constituida por una mezcla de carbonato sódico 3,2 mM/ hidrogenocarbonato sódico 1 mM. Las muestras se analizaron por triplicado.

## 2.3. Análisis sensorial

El análisis sensorial de las muestras se realizó a través de un test descriptivo con la colaboración de 50 panelistas no entrenados que eran consumidores habituales o potenciales de las bebidas objeto de estudio. Los atributos evaluados en el panel de cata fueron: intensidad del color, dulzor, acidez, aroma, consistencia y aceptabilidad general. Se hizo uso de una escala 1-9 para puntuar cada parámetro, donde 1 correspondía al valor más bajo y 9 al más alto. Para minimizar la posible alteración organoléptica, las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta su análisis, momento en el cual se procedió a la apertura de los envases. Se sirvieron 20 ml de cada muestra en vasos pequeños de plástico transparente. Las muestras se presentaron codificadas a los catadores y se sirvieron en rondas de no más de 8 muestras. Los panelistas disponían de agua y galletas no saladas para limpiar el paladar entre muestra y muestra. Los resultados se expresaron como la media aritmética de todas las puntuaciones.

## 2.4. Parámetros funcionales

### 2.4.1. Compuestos bioactivos

#### Ácido ascórbico

El método de análisis de ácido ascórbico fue similar al descrito anteriormente para ácidos orgánicos, a excepción del flujo (0,9 mL/min) y la longitud de onda del DAD, que en este caso se fijó en 245 nm. Este método demostró una buena linealidad ( $r^2$  de 0,995 y CL del 97%), además de ser sensible (LOD y LOQ de 0,05 y 0,15 mg/L, respectivamente), exacto (recuperación media del 94%) y preciso ( $RSD_r$  inferior al 4% y  $RSD_R$  inferior al 5%) (Tabla 7).

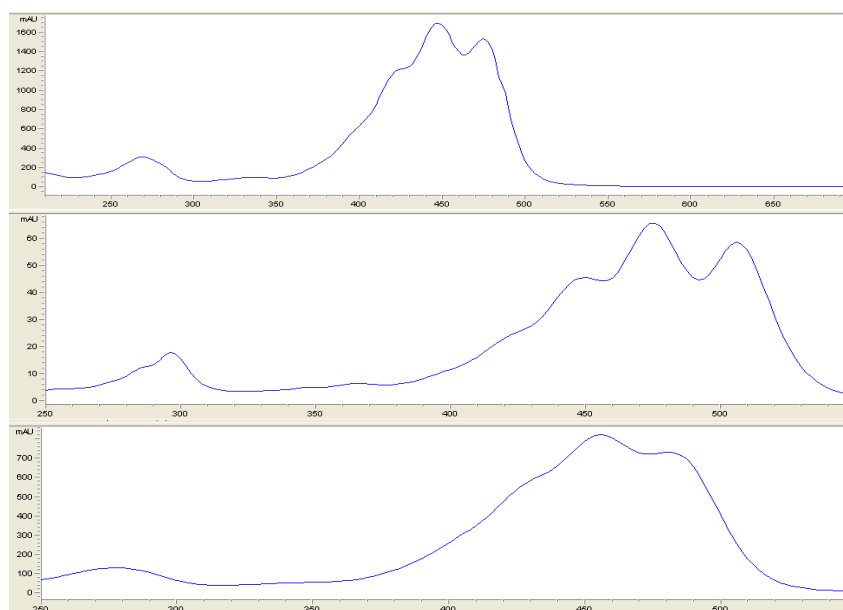
#### Carotenoides

En el caso de las muestras comerciales, el análisis de carotenoides se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Tenorio y col. (2004). Las muestras (20 mL) se trataron con 10 mg de carbonato de magnesio y una punta de espátula de ácido ascórbico para evitar la oxida-

ción durante la extracción y se extrajeron con una mezcla de hexano:metanol (3:4). En el caso de la muestra 16, por tratarse de una muestra de color verde por la presencia de kiwi y clorofilinas como aditivos, el extractante utilizado fue acetona, seguido de éter de petróleo. En cualquier caso, los extractos se llevaron a evaporación hasta sequedad y se reconstituyeron en fase móvil A. La separación cromatográfica se realizó con la columna Luna RP-C18 5  $\mu\text{m}$  (250 x 4,60 mm) de Phenomenex (Torrance, CA, USA) en un HPLC Agilent 1100 a 30  $^{\circ}\text{C}$  y 2 mL/min. El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$  y las fases móviles utilizadas fueron acetonitrilo:diclorometano:metanol (96.5:1.75:1.75) (fase A) y acetonitrilo:acetato de etilo (50:50) (fase B). El gradiente de separación fue 100% fase A entre 0 y 6 minutos y 100% fase B desde 6 hasta 13 minutos. El detector (DAD) se configuró a tres longitudes de onda: 290 nm (carotenoides incoloros: fitoeno y fitoflueno), 440 nm (carotenoides coloreados) y 660 nm (clorofilinas). La identificación se llevó a cabo por adición estándar y por comparación espectral de las longitudes de onda máximas de los espectros UV/Vis con los datos característicos de cada estructura (Tabla 8). Normalmente aparecen 3 máximos de absorción cuyas longitudes de onda dependen del número de dobles enlaces conjugados y del disolvente empleado (Meléndez-Martínez y col. 2007). Además, la relación %III/II da idea de la estructura fina del compuesto (Cortés y col. 2004). La cuantificación se llevó a cabo por los patrones puros de  $\beta$ -caroteno y luteína. El método demostró adecuada linealidad ( $r^2 > 0,999$ ), exactitud (recuperaciones entre el 95 y el 103%) y precisión ( $\text{RSD}_r < 5\%$ ).

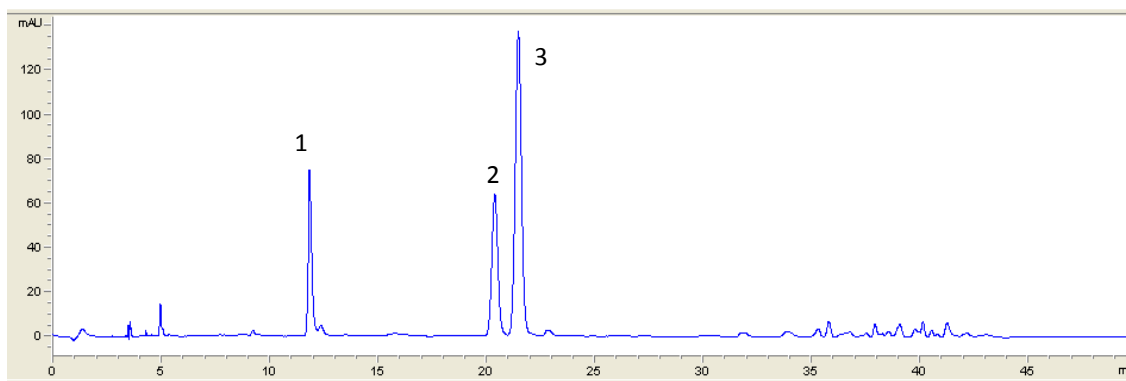
Tabla 8. Características espectrales de los carotenoides analizados.

Carotenoide	$\lambda_{\text{máx}}$	$\lambda_1$ (nm)	$\lambda_2$ (nm)	$\lambda_3$ (nm)	%III/II
Anteraxantina	440	(424)	448	474	59
Auroxantina	440	380	402	428	91
Cis epóxido de luteína	440	416	442	470	43
Clorofilina 1	660	-	404	620	-
Clorofilina 2	660	(388)	402	620	-
Clorofilina 3	440	(388)	402	616	-
Clorofilina 4	440	(408)	426	612	-
Clorofilina Na-Cu	440	(392)	406	626	-
Fitoeno	290	277	287	298	8
Licopeno	475	448	476	506	65
Luteína	440	424	448	476	55
Mutatoxantina	440	406	428	454	45
Valencixantina	440	352	370	390	65
Zeaxantina	475	-	454	480	24
$\alpha$ -caroteno	440	424	445	473	38
$\beta$ -caroteno	475	-	454	480	18
$\beta$ -criptoxantina	440	(429)	452	478	24
$\epsilon$ -caroteno	402	380	402	426	91

Fig. 13. Espectros de luteína (arriba), licopeno (centro) y  $\beta$ -caroteno (abajo).

En el caso de los *smoothies* se modificó el protocolo analítico para adaptarlo a la mayor consistencia de este tipo de muestras. Se partió de 5 g de producto y la extracción se llevó a cabo con tetrahidrofurano, favorecida por ultrasonidos 15 minutos. El extracto se centrifugó (6500 rpm, 10 min) y sobre el residuo se añadieron nuevos volúmenes de THF hasta decoloración ( $n=3-4$  repeticiones). Tras la purificación de las fases acuosa y orgánica (con éter de petróleo y con una solución de NaCl saturada, respectivamente) en ampolla de decantación, la fase orgánica se evaporó a sequedad y se reconstituyó en 5 mL de una mezcla de hexano:metanol:acetonitrilo:diclorometano (40:20:20:20). En esta ocasión, se emplearon tres fases móviles: metanol (A), hexano:diclorometano 50:50 (B) y acetonitrilo (C), de acuerdo al siguiente gradiente de separación: 0-10 min, lineal, 15:10:75%; 10-36 min, gradiente, 15:35:50%; 36-41 min, gradiente, 15:10:75 para retomar las condiciones iniciales. El volumen de inyección fue de 10  $\mu$ L y la temperatura del horno se mantuvo a 30 °C al igual que en el protocolo anteriormente expuesto. Sin embargo, la columna Luna® se sustituyó por su equivalente de núcleo rígido (Kinetex®), con las mismas dimensiones y el flujo se redujo hasta 0,5 mL/min. Los compuestos se monitorizaron a 402, 440 y 475 nm, con un barrido espectral entre 200 y 600 nm. Los carotenoides identificados fueron licopeno,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\epsilon$ - carotenos. Las modificaciones llevadas a cabo con respecto al método anterior obligaron a una completa validación que dio lugar a los siguientes resultados: coeficientes de correlación ( $r^2$ ) y linealidad (CL) mayores de 0,9939 y del 99%, respectivamente; LOD entre 0,5 y 1,5 mg/L; LOQ entre 1 y 2,5 mg/L; recuperaciones entre el 96 y el 99%;  $RSD_r$  inferior al 5% y  $RSD_R$  inferior al 6% (Tabla 7).

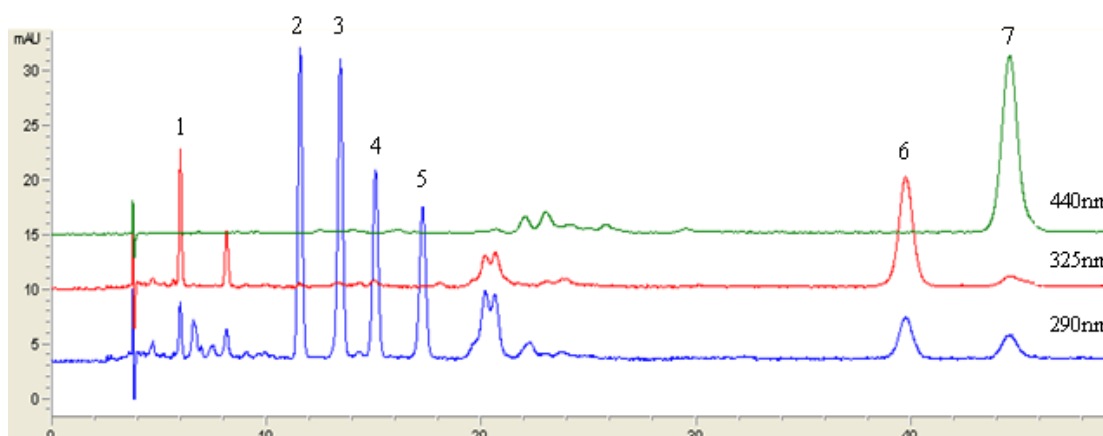
Fig. 14. Cromatograma de carotenoides identificados por HPLC a 475 nm.



1: licopeno, 2: α-caroteno, 3: β-caroteno.

### Tocoferoles y retinol

Se desarrolló y validó un método simple para la determinación simultánea de tocoferoles, retinol, derivados esterificados y β-caroteno en bebidas mixtas de fruta y leche o soja. A 20 mL de muestra se añadieron 25 mL de una mezcla de hexano:acetona 1:1. Tras agitación y sonicación durante 15 minutos, la mezcla se centrifugó a 6500 rpm, 15 minutos. El sobrenadante se llevó a ampolla de decantación, donde la fase acuosa se lavó con hexano ( $n=4$ ) y la fase orgánica se lavó con una solución saturada de NaCl ( $n=4$ ). Se juntaron las fases orgánicas de los sucesivos lavados, se eliminaron los restos de agua añadiendo sulfato sódico anhidro, se filtró el extracto final y se evaporó a sequedad en corriente de nitrógeno. El residuo se redisolvió en 5 mL de fase móvil, con ayuda de ultrasonidos (15 min) para favorecer el proceso. Las muestras se filtraron por filtros de nylon de  $0,45\ \mu\text{m}$  antes de la inyección en el equipo ( $40\ \mu\text{L}$ ). La separación cromatográfica se hizo en modo isocrático a temperatura ambiente con columna Luna RP-C18  $5\ \mu\text{m}$  ( $250 \times 4,60\ \text{mm}$ ) acoplada a una precolumna C18 de  $5\ \mu\text{m}$ . La fase móvil empleada fue metanol:THF:agua (67:27:6) a  $0,8\ \text{mL}/\text{min}$ . Este método permitió el análisis simultáneo de los tocoferoles y acetato de tocoferol (DAD a  $290\ \text{nm}$ ), así como de retinol y palmitato de retinol ( $325\ \text{nm}$ ) y de β-caroteno ( $440\ \text{nm}$ ). Toda la manipulación se llevó a cabo en material topacio, en habitación con luz amarilla y sin calentar la muestra por encima de  $40\ ^\circ\text{C}$ . El método empleado resultó ser adecuado para el fin previsto ya que se obtuvieron resultados muy satisfactorios de linealidad ( $r^2 > 0,994$ ), sensibilidad ( $\text{LOD} = 0,05\text{--}0,7\ \text{mg}/\text{L}$  y  $\text{LOQ} = 0,07\text{--}2\ \text{mg}/\text{L}$ ), exactitud (recuperación =  $101\text{--}103\%$ ) y precisión ( $\text{RSD}_r < 1,4\%$  y  $\text{RSD}_R < 3,6\%$ ) (Tabla 7).

Fig. 15. Cromatograma de retinol, tocoferoles y sus ésteres y  $\beta$ -caroteno identificados por HPLC.


1: retinol, 2:  $\delta$ -tocoferol, 3:  $\gamma$ -tocoferol, 4:  $\alpha$ -tocoferol, 5: acetato de  $\alpha$ -tocoferol, 6: palmitato de retinol, 7:  $\beta$ -caroteno.

### Polifenoles individuales

El protocolo analítico se basó en el trabajo de Rostagno y col. (2007). 1 g de muestra liofilizada (Telstar LyoQuest, Terrassa, España) se extrajo con 5 mL de metanol a 60 °C durante 20 minutos en un baño de ultrasonidos (Transsonic TI-H-55, Alemania) a 25 KHz, por triplicado. El extracto se centrifugó (4000 rpm, 10 min, 10 °C) y filtró por filtro de nylon 0,45  $\mu$ m y se inyectó un volumen de 10  $\mu$ L en un HPLC Alliance 2695 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) acoplado a un DAD a 280 y 320 nm. La separación se llevó a cabo con una columna Nova-Pak C18 (4  $\mu$ m, 4,6 x 250 mm; Waters) a 35 °C. El gradiente de fases móviles A (ácido acético 0,1% en agua) y B (acetonitrilo) empleado fue el siguiente: a tiempo 0 el eluyente utilizado fue 100% de A y se estabilizó hasta 5% B en 2 minutos, 40% B a los 22 min, 80% B a los 24 min y 100% B a los 26 min. El flujo de trabajo se estableció en 1 mL/min. Los polifenoles estudiados pertenecían a la familia de los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, *p*-cumárico y clorogénico), flavanonas (hesperidina, narirutina), flavan-3-oles (catequina, epicatequina) e isoflavonas (daidzina, daidzeína, genisteína). Se obtuvieron buenos coeficientes de linealidad ( $r^2 \geq 0,992$ ) para todos ellos.

### Polifenoles solubles totales (Folin)

La extracción de polifenoles se llevó a cabo a partir de las muestras liofilizadas con una mezcla de metanol:agua (50:50) acidificada hasta pH=2 con HCl 2M y acetona:agua (70:30) hasta un volumen final de 50 mL (Bravo y Saura-Calixto, 1998). Una vez obtenidos los extractos, los polifenoles totales se midieron con el reactivo de Folin–Ciocalteu siguiendo el método propuesto por Singleton y col. (1999). La cuantificación se llevó a cabo espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 750 nm (UV/Vis Lambda EZ210, Perkin-Elmer, Jügesheim, Alemania). El calibrado se realizó con una curva de ácido gálico. Los resultados de la validación fueron:  $r^2 = 0,995$ , CL > 98%, LOD = 5 mg/L, LOQ = 15 mg/L, exactitud = 92% de recuperación, repetibilidad ( $RSD_p$ ) < 4% y reproducibilidad ( $RSD_R$ ) < 5% (Tabla 7).

## 2.4.2. Capacidad antioxidante

### FRAP

La cuantificación de la capacidad antioxidante desarrollada por los compuestos bioactivos presentes en las muestras mediante el mecanismo FRAP se llevó a cabo a partir de los mismos extractos que los utilizados para polifenoles solubles totales. La metodología seguida fue la desarrollada por Pulido y col. (2000). El aumento de absorbancia debido a la formación de un complejo coloreado entre el TPTZ y el  $\text{Fe}^{2+}$  se monitorizó espectrofotométricamente a 595 nm (Perkin–Elmer Lambda EZ210, Jügesheim, Alemania). El calibrado se realizó con una curva de Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E. Este método mostró buena linealidad ( $r^2 > 0,997$  y  $\text{CL} > 98\%$ ), sensibilidad ( $\text{LOD} = 0,01 \text{ mg/L}$  y  $\text{LOQ} = 0,02 \text{ mg/L}$ ), exactitud (recuperación media del 94%) y precisión ( $\text{RSD}_r < 5\%$  y  $\text{RSD}_R < 9\%$ ) (Tabla 7).

### DPPH

Al igual que en el caso anterior, los extractos empleados para medir la capacidad antioxidante de las muestras por el mecanismo DPPH fueron los de polifenoles totales. El método empleado fue el descrito por Chen y col. (2009). La absorbancia se midió espectrofotométricamente tras 60 minutos de incubación a 37 °C a 517 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de neutralización o atrapamiento (*scavenging*) de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\% \text{ Scavenging} = \frac{(\text{Ab} - \text{Am}) \times 100}{\text{Ab}}$$

donde  $A_b$  es la absorbancia del blanco y  $A_m$  es la absorbancia de la muestra. Dado que los resultados del método de DPPH se expresan como % de atrapamiento del radical y no en unidades de concentración, no procede la validación del método en términos de exactitud. Además, puesto que la absorbancia disminuye a medida que la concentración de los componentes bioactivos aumenta en la muestra (la absorbancia más alta siempre corresponde al blanco), la sensibilidad depende del espectrofotómetro y no del método en sí. Es por esto que se ha validado el método en términos de precisión a partir de quintuplicados, obteniéndose una  $\text{RSD}_r$  inferior al 6% y una  $\text{RSD}_R$  inferior al 10% (Tabla 7).

## 2.5. Análisis microbiológico

La detección y recuento de los microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* se llevó a cabo según la Norma ISO 21528-2: 2004 con VRBG (cristal violeta - agar rojo bilis neutro) como medio de cultivo e incubación a 37 °C durante 24 horas. Las colonias positivas se sembraron en agar nutritivo para obtener cultivos puros a los que poder realizar las pruebas bioquímicas confirmativas (oxidasa y fermentación de la glucosa).

El recuento de bacterias aerobias mesófilas se hizo en medio PCA (*plate count agar*) con incubación a 30 °C durante 72 horas de acuerdo a la Norma ISO 4833-1: 2013.

En el caso de los mohos y las levaduras, el medio de cultivo seleccionado fue el agar DRBC (diclorán - rosa de bengala - cloranfenicol). Las placas se incubaron a 25 °C durante 5 días de acuerdo a la Norma ISO 21527: 2008.

El recuento de *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidasa positivo se hizo por siembra en profundidad en medio TBX (triptona - bilis - glucurónido X) y posterior recuento de las colonias características en un medio selectivo cromogénico tras incubación a 44 °C durante 18-24 horas (Norma ISO 16649- 1: 2013).

El método de identificación de *Listeria monocytogenes* se llevó a cabo en agar ALOA en aerobiosis a 37 °C durante 24 horas. Las colonias sospechosas de presencia de este microorganismo se aislaron en cultivo puro en agar TSYEA (triptona - levadura de soja) para posterior confirmación mediante pruebas bioquímicas: producción de hemólisis, test de la catalasa, prueba CAMP, tinción de Gram y utilización de carbohidratos de acuerdo al protocolo descrito en la Norma ISO 11290-1: 1996/A1: 2004).

### 3. Tratamiento estadístico

Todas las determinaciones se llevaron a cabo al menos por triplicado, excepto en el caso del análisis sensorial, donde los resultados provenían de las puntuaciones del total de panelistas. Los resultados están expresados como media aritmética  $\pm$  desviación estándar. El análisis de varianza (ANOVA) se aplicó para comparar los valores procedentes de los distintos grupos comerciales de bebidas mixtas comerciales. Asimismo se utilizó para conocer la incidencia de los diferentes tratamientos y del tiempo de almacenamiento en el caso de los *smoothies*. Para determinar si las diferencias eran significativas ( $p < 0,05$ ) se utilizó el test de Duncan. Los coeficientes de correlación entre variables se determinaron mediante el test de Pearson.

En el caso de las bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y leche o soja, se llevó a cabo un análisis discriminante con el fin de evaluar si las denominaciones comerciales respondían a los parámetros evaluados o si por el contrario eran arbitrarias. En el análisis sensorial se compararon también los atributos organolépticos con los resultados de los parámetros químicos mediante una matriz de correlaciones de Spearman. El software empleado para el análisis estadístico fue Statgraphics, versiones 5.1 y Centurion XVI (StatPoints Technologies, Warrenton, Virginia, USA).



# 5. PUBLICACIONES



**Publicación 1**

*Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity of mixed beverages based on fruit juices with milk or soya* ..... 101

**Publicación 2**

*Simultaneous determination of tocopherols, retinol, ester derivatives and  $\beta$ -carotene in milk- and soy-juice based beverages by HPLC with diode array detection*..... 102

**Publicación 3**

*Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages*.....  
..... 103

**Publicación 4**

*The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage*..... 104

**Publicación 5**

*Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk- and soy-smoothies* ..... 105

**Publicación 6**

*High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: colour, bioactive compounds and antioxidant capacity*..... 106

## PUBLICACIÓN 1

### Colour, bioactive compounds and antioxidant capacity of mixed beverages based on fruit juices with milk or soya

V. Andrés, M. J. Villanueva\*, I. Mateos-Aparicio, M. D. Tenorio

Journal of Food and Nutrition Research, 53(1), 2014, 71–80.

Received: 1 July 2013

1st revised: 30 July 2013

Accepted: 13 August 2013

Published online: 21 February 2014

ISSN 1336-8672

#### ABSTRACT

Fruit beverages are a source of phytochemicals, vitamins and minerals, with a high hydration capacity. The aim of this study was to evaluate mixed beverages based on fruit juices with milk or soya regarding their colour ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), antioxidant compounds (carotenoids, ascorbic acid and polyphenols) and antioxidant activity. The  $b^*$  parameter, which is associated with a yellow-orange colour, presented a positive correlation with  $\beta$ -carotene concentration ( $r=0,917$ ).  $\beta$ -Carotene was the main carotenoid ( $58\text{--}3547\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ), followed by zeaxanthin ( $37\text{--}97\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) and lutein ( $5\text{--}15\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). The concentration of deliberately added ascorbic acid ranged between  $78\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  and  $993\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . The HPLC methods used proved to be suitable for the analysis of carotenoids and vitamin C in these mixed beverages. Polyphenols are naturally present in these mixed beverages ( $151\text{--}503\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). The antioxidant capacity of each mixed beverage was assessed in vitro by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method and ranged from  $65\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  to  $376\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  (expressed as Trolox equivalents). The antioxidant capacity of these beverages was mainly due to the vitamin C (97,7%) and, in a minor proportion, due to polyphenols (2,3%). Discriminant analysis was applied to these samples of mixed beverages and samples from 'tropical' and 'soyjuice' groups were found to be the best classified into their commercial denominations.

**Keywords:** fruit juice; milk; soya; mixed beverage; colour; carotenoids, ascorbic acid; antioxidant activity.

## PUBLICACIÓN 2

### Simultaneous determination of tocopherols, retinol, its derivatives and $\beta$ -carotene in milk- and soy-juice based beverages by HPLC with diode-array detection

Víctor Andrés, María José Villanueva, María Dolores Tenorio\*

LWT – Food Science and Technology, 58, 2014, 557-562.

Received: 30 July 2013

Accepted: 22 March 2014

Available online: 1 April 2014

doi:10.1016/j.lwt.2014.03.025

#### ABSTRACT

A simple, sensitive and accurate HPLC method has been developed and validated for the simultaneous determination of  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol,  $\delta$ -tocopherol,  $\alpha$ -tocopherol acetate, retinol palmitate, retinol and  $\beta$ -carotene in milk- and soy-juice based beverages. The assay was performed using a Luna RP-C18 column with methanol: THF: water (67:27:6, v/v/v) as mobile phase, at a flow rate of 0,8 mL·min<sup>-1</sup> during 47 min. Diode-array detector was set at 290 nm for tocopherols, 325 nm for retinols and 440 nm for  $\beta$ -carotene. The method developed and validated is simple and shows good linearity, precision, accuracy and sensitivity and was applied to the analysis of different commercial mixed beverages. The profile of these compounds was different in milk- or soy-juice. Acetate  $\alpha$ -tocopherol, and retinol palmitate are added in all milk-juice and free  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol are characteristic of soy-juice samples.  $\beta$ -carotene is present in both types of mixed beverages.

**Keywords:** mixed based beverages; tocopherols; retinyl palmitate;  $\beta$ -carotene; HPLC-DAD.

## PUBLICACIÓN 3

### Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages

Víctor Andrés\*, M. Dolores Tenorio, M. José Villanueva

Food Chemistry, 173, 2015, 1100–1106

Received: 5 September 2014

Revised: 20 October 2014

Accepted: 24 October 2014

Available online: 3 November 2014

doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.136

#### ABSTRACT

The juice industry has undergone a continuous innovation to satisfy the increasing healthy food demand by developing, among others, beverages based on fruits and milk or soybeans. The comparison among the sensory attributes between nineteen commercial mixed beverages showed significant differences in colour, sweetness, acidity, and consistency. Sucrose and citric acid were found in large proportion due to their natural presence or their addition. Potassium was the major macromineral (148–941 mg/L), especially in soy beverages. The low concentration of sodium in soy drinks is a healthy characteristic. The profile of inorganic anions has been included for the first time. Sulphate (39–278 mg/L) and phosphate (51–428 mg/L) were the predominant anions. High correlations were found between the percentage of fruit and consistency, fructose, malic acid, potassium and phosphate content ( $r^2 > 0,790$ ). Based on the data obtained, these beverages show pleasant organoleptic characteristics and constitute a good source of essential nutrients for regular consumers.

**Keywords:** fruit–milk beverages; soy; sensory; sugars; organic acids; minerals.

## PUBLICACIÓN 4

### The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage

Víctor Andrés\*, María J. Villanueva, María D. Tenorio

Food Chemistry, 192, 2016, 328–335

Received: 11 March 2015

Revised: 2 July 2015

Accepted: 6 July 2015

Available online: 8 July 2015

doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.031

#### ABSTRACT

The effects of high-pressure processing – HPP – (450 and 600 MPa/3 min/20 °C) on the colour, carotenoids, ascorbic acid, polyphenols and antioxidant activity (FRAP and DPPH) of a smoothie were compared to thermal processing (80 °C/3 min). Stability during 45 days at 4 °C was also evaluated. HPP samples showed slight differences ( $p < 0,05$ ) in colour compared to untreated smoothies. Both HPP significantly increased the extractability of lycopene,  $\beta$ -carotene and polyphenols compared to untreated samples. After HPP, ascorbic acid was retained by more than 92% of the initial content. The best results for antioxidant activity were obtained when HPP was applied at 600 MPa. FRAP and DPPH showed a high correlation with ascorbic acid ( $r= 0,7135$  and  $0,8107$ , respectively) and polyphenolic compounds ( $r= 0,6819$  and  $0,6935$ , respectively), but not with total carotenoids. Changes in bioactive compounds during the storage period were lower in the HPP smoothie than in the thermal-treated sample.

**Keywords:** smoothie; HPP; thermal treatment; colour; bioactive compounds; FRAP; DPPH.

## PUBLICACIÓN 5

### Influence of high pressure processing on microbial shelf life, sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content of milk- and soy-smoothies

Víctor Andrés, María-José Villanueva\*, María-Dolores Tenorio

LWT - Food Science and Technology, 65, 2016, 98–105

Received: 18 June 2015

Revised: 22 July 2015

Accepted: 23 July 2015

Available online: 1 August 2015

doi:10.1016/j.lwt.2015.07.066

#### ABSTRACT

Smoothies are an excellent way to intake nutrients and bioactive compounds from both the fruits and the milk or soymilk with which they are made. High pressure processing (HPP) is an efficient alternative to traditional thermal pasteurization (TP), obtaining microbiologically-safe smoothies with minimum impact on nutritional and sensorial properties. Untreated, pasteurized (80 °C/3 min) and HPP (450–650 MPa for 3 min at 20 °C) milk- and soy-smoothies were compared. Milk- and soy-smoothies showed a total reduction in microorganisms after pasteurization and HPP at the pressure conditions applied. HPP maintained microbial stability until the end of the storage period (45 days at 4 °C). Soluble sugars (glucose and fructose), organic acids (citric, malic, tartaric, oxalic and quinic) and minerals (sodium, potassium, calcium, magnesium, iron, copper, zinc and manganese) showed no significant changes after the treatments and storage. No significant differences were found in sensorial attributes between untreated and HPP samples, although the aroma and acceptability scores decreased significantly for pasteurized smoothies. Based on the data obtained, 450 MPa are sufficient to obtain safe smoothies whose organoleptic properties are equally acceptable to consumers as freshly-made smoothies.

**Keywords:** High pressure processing; smoothies shelf-life; sensory profile; sugars and organic acids; minerals.

## PUBLICACIÓN 6

### High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: colour, bioactive compounds and antioxidant capacity

Andrés V\*, Mateo-Vivaracho L, Guillamón E, Villanueva MJ, and Tenorio MD

LWT – Food Science and Technology

Received: 5 October 2015

Under review

#### ABSTRACT

Bioactive compounds: lycopene,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\epsilon$ -carotenes, ascorbic acid, chlorogenic, p-coumaric, caffeic, hesperidin, narirutin, genistein, daidzin, daidzein, catechin and epicatechin were quantified in order to provide new information on high pressure (HP) processing (550 and 650 MPa/3 min/20 °C) compared to pasteurization (80 °C/3 min) in a multifruit-soymilk smoothie. Antioxidant activity (FRAP and DPPH), colour differences and storage effects (45 days/4 °C) were also investigated. HP maintained better original colour ( $\Delta E < 2,82$ ) than pasteurization ( $\Delta E = 3,70$ ), and did not modify the content of bioactive components ( $\alpha$ - and  $\epsilon$ - carotenes, ascorbic acid, total polyphenols); it even increased the concentration of lycopene and  $\beta$ -carotene and had higher antioxidant capacity than in heat-treated samples. Most remained quite stable under cold storage. About 55% of the ascorbic acid, the main compound relating to antioxidant capacity ( $r = 0,7399$  for FRAP and  $r = 0,8944$  for DPPH), was retained at the end of the storage period.

**Keywords:** colour; bioactive compounds; antioxidant activity; high pressure; pasteurization; storage.

## 6. DISCUSIÓN



1. Muestras comerciales .....	109
1.1. Parámetros generales.....	109
1.2. Parámetros nutricionales .....	112
1.3. Análisis sensorial.....	120
1.4. Parámetros funcionales.....	122
2. Efecto de los tratamientos y el almacenamiento de una bebida tipo <i>smoothie</i> .....	131
2.1. Parámetros generales.....	131
2.2. Parámetros nutricionales .....	137
2.3. Análisis sensorial.....	143
2.4. Parámetros funcionales.....	144
2.5. Parámetros microbiológicos .....	159

## 1. Muestras comerciales

Todos los aspectos relativos a esta primera parte de la Tesis Doctoral están tratados en las publicaciones P-1, P-2 y P-3. A continuación se expone la discusión de resultados sistematizada de acuerdo con los objetivos de la presente Tesis, de tal manera que se abordarán los parámetros en el orden lógico de estudio, considerando inicialmente los aspectos generales y particularizando posteriormente en los aspectos relativos a la evaluación nutricional, sensorial y funcional. Aunque el esquema que se sigue no coincide plenamente con el orden de las publicaciones, en cada apartado se remitirá a la publicación correspondiente para facilitar su comprensión y seguimiento.

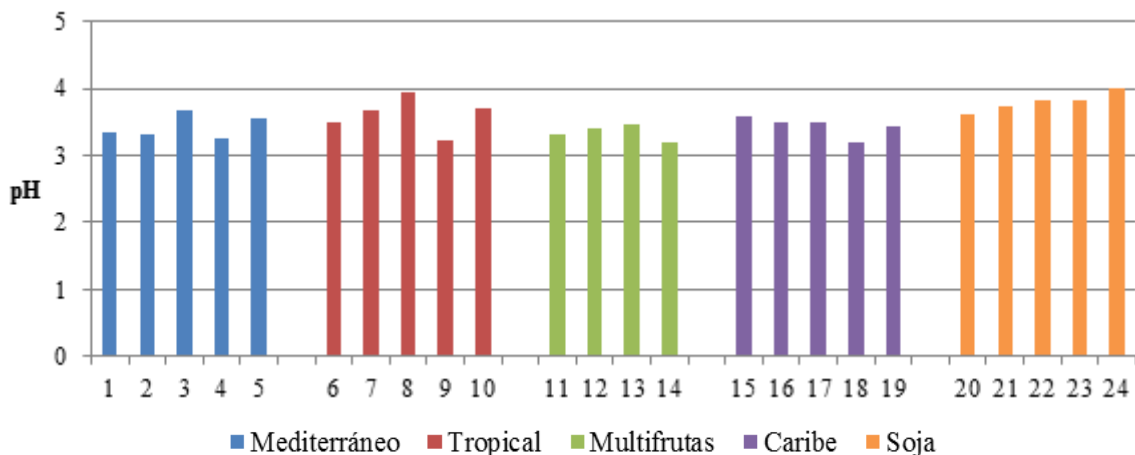
### 1.1. Parámetros generales

Los resultados de esta sección forman parte de la publicación nº 1.

#### pH

El pH tiene una influencia importante en el sabor y en la estabilidad de las bebidas. En las muestras comerciales el pH osciló entre 3,15 (18C -Caribe-) y 4,01 (24S -Soja-). Las categorías “Tropical” y “Soja” presentaron valores significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los del resto de los grupos comerciales (**Fig. 16**).

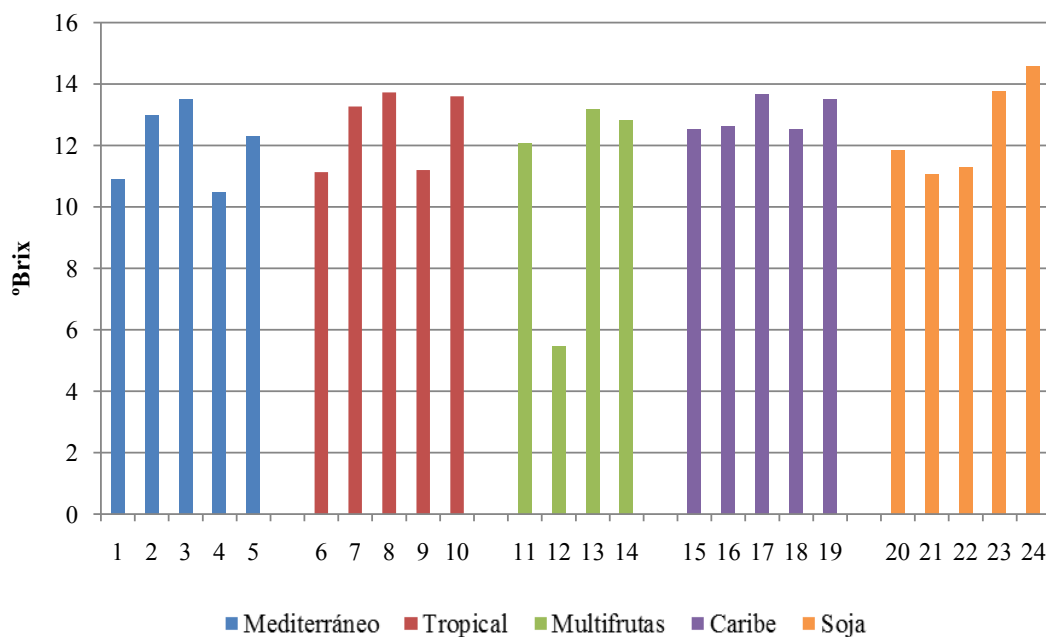
Fig. 16. Valores de pH de las bebidas refrescantes mixtas agrupadas por categoría comercial.



#### Sólidos solubles totales (°Brix)

Los grados Brix en las bebidas refrescantes mixtas oscilaron entre 10,5 °Brix (4M -Mediterráneo-) y 14,6 °Brix (24S -Soja-), a excepción de 12F (Multifrutas), que mostró un valor menor, 5,4 °Brix, por no contener azúcares añadidos (**Fig. 17**). El contenido medio para la categoría comercial “Multifrutas” fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que para las otras cuatro denominaciones comerciales. Aunque los valores obtenidos fueron superiores a los especificados en la etiqueta de cada producto, sí pudo observarse una fuerte correlación entre ellos ( $r= 0,884$ ).

Fig. 17. Contenido en sólidos solubles totales (°Brix) de las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial.

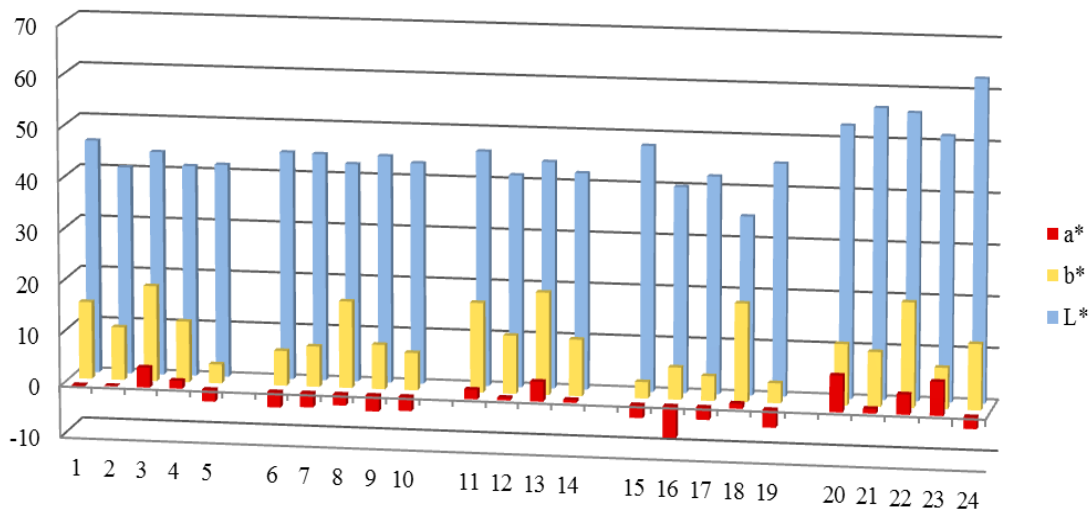


### Color

Los parámetros CIE Lab de color se encuentran reflejados en la **Figura 18**. Los valores de luminosidad ( $L^*$ ) no presentaron diferencias significativas entre los cuatro grupos comerciales de bebidas refrescantes mixtas elaboradas con leche; sin embargo, en las bebidas de soja fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ). Teniendo en cuenta que la soja se añadió en menores cantidades (2,7-3% de semillas de soja) que la leche desnatada (10%), las diferencias encontradas entre unas y otras parecen indicar que la soja proporciona mayor intensidad de  $L^*$  que la leche desnatada de vaca.

Con respecto al CIE  $a^*$ , la muestra 23 (Soja) mostró el valor más alto (color más rojizo) debido a la presencia de fresa como ingrediente y de ácido carmínico (E120) como aditivo. Por su parte, la muestra 16 (Caribe) presentó un valor de  $a^*$  negativo debido a su color verde, proporcionado por el kiwi y la adición deliberada de clorofilina. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para este parámetro entre las bebidas con leche pero sí con las de soja ( $p < 0,05$ ).

Fig. 18. Parámetros CIE Lab de las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial.



Categorías comerciales: Mediterráneo (M, 1-5), Tropical (T, 6-10), Multifrutas (F, 11-14), Caribe (C, 15-19) y Soja (S, 20-24).

Con respecto al parámetro CIE b\* en las bebidas refrescantes mixtas, el mayor valor encontrado correspondió a la muestra 22 (Soja), debido a la adición de  $\beta$ -caroteno y curcumina para imitar el color del melocotón. El valor más bajo correspondió a la muestra 15 (Caribe), sin coloración naranja y sin adición de  $\beta$ -caroteno. La comparación estadística entre los grupos mostró que el grupo de Caribe presentó los valores más bajos de b\* en comparación con las otras denominaciones comerciales. Existen algunas muestras cuya fabricación responde al mismo concentrado de frutas pese a pertenecer a grupos con diferente denominación (5M, 15C y 19C) y, como era de esperar, presentaron valores de b\* similares (3,1-3,8). Este mismo caso se dio en las muestras 11F, 13F (Multifrutas) y 18C (Caribe) con valores de b\* entre 17,1 y 19,9. En conclusión, la denominación comercial no proporciona información clara sobre las bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y leche con respecto al perfil de frutas que forma parte de los ingredientes y el color como característica sensorial relacionada con esa información al consumidor, lo que sugiere que los fabricantes no siguen criterios uniformes para esta clasificación.

Zulueta y col. (2007b) analizaron las correlaciones entre los parámetros de color y el perfil de concentrado de fruta en las bebidas mixtas y concluyeron que valores positivos de a\* se asocian con la zanahoria, el albaricoque y la fruta de la pasión y los negativos, con la manzana, el kiwi y la lima; mientras que los valores positivos de b\* correlacionan bien con el albaricoque y el melocotón. En el presente estudio las categorías “Mediterráneo” y “Multifrutas” presentaron una buena correlación con los colores amarillo-naranja asociados con la presencia de la naranja, la zanahoria, el melocotón y el mango, excepto la muestra 5 (Mediterráneo) que mostró una tonalidad blanco-amarillenta, probablemente debido a la presencia significativa de frutas con poca coloración como manzana, piña y limón, y la ausencia de  $\beta$ -caroteno como aditivo, tal como se pudo deducir de la etiqueta.

Las bebidas mixtas incluidas en este estudio fueron tratadas térmicamente para su comercialización. De acuerdo a lo descrito por Sampedro y col. (2009), el tratamiento térmico no va

asociado a diferencias en luminosidad y saturación, pero sí a una disminución significativa de los valores de  $a^*$  y  $b^*$ , obteniéndose una bebida menos brillante y menos amarillenta con respecto al producto fresco. *Hsu y col. (2008)* observaron una modificación significativa en el color marrón en zumo de tomate pasteurizado debido a la descomposición del licopeno y la formación de productos de reacción de Maillard causados por el tratamiento térmico intenso.

## 1.2. Parámetros nutricionales

Los parámetros nutricionales en las bebidas refrescantes mixtas se estudiaron tomando como criterios de agrupación de las muestras la presencia o ausencia de naranja como ingrediente incorporado en mayor proporción en las bebidas mixtas elaboradas con leche (grupos A y B respectivamente) o la presencia de soja (grupo C) en la formulación, dado que en principio constituyen factores diferenciales determinantes de su diferente composición. Este estudio se restringió a 19 muestras, cuya codificación se refleja en la **Tabla 5** (capítulo 3, apartado 1.1) y corresponde a los resultados de la publicación nº 3.

### Azúcares

El contenido total de azúcar en las muestras osciló entre 87,9 g/L (A1) y 119,7 g/L (B6) (**Tabla 9**). Las cantidades de sacarosa, glucosa y fructosa dependieron del tipo de frutas utilizadas en la preparación, el porcentaje de concentrado y el resto de los ingredientes empleados. La **Figura 19** refleja los valores medios para los tres grupos. El principal azúcar encontrado fue la sacarosa, con un contenido medio de 72 g/L (grupo A), 83 g/L (grupo B) y 62 g/L (grupo C). La glucosa y fructosa se determinaron en menor concentración y en cantidades promedio similares entre sí en los tres grupos analizados. En el caso de las muestras elaboradas con leche, los valores medios de glucosa y fructosa fueron inferiores (13 y 14 g/L -grupo A- y 9 y 11 g/L -grupo B-) a los encontrados en las muestras de soja (22 y 20 g/L -grupo C-, respectivamente). La lactosa sólo se detectó en las bebidas en las que figuraba la leche como ingrediente, con un contenido medio de 5 g/L.

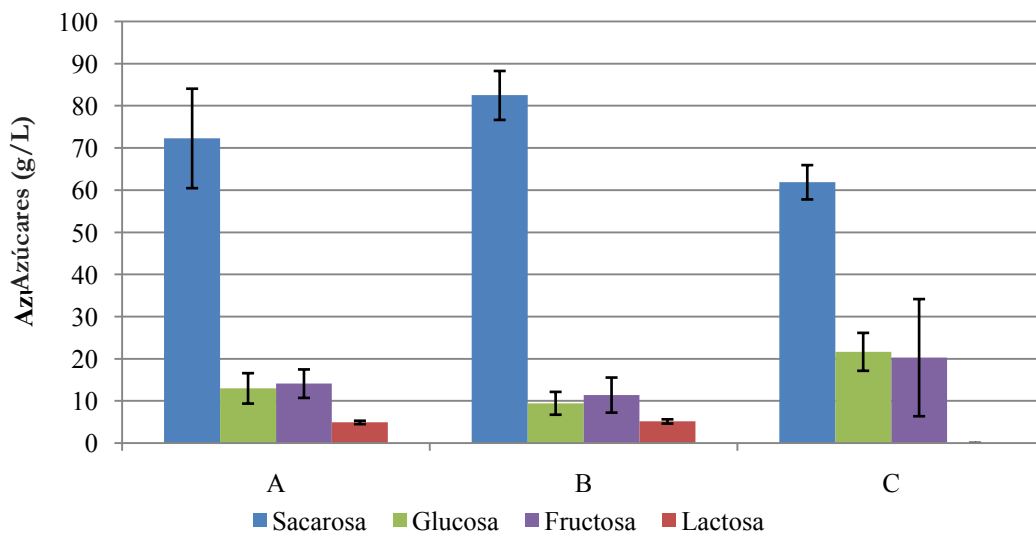
El análisis de varianza aplicado para cada azúcar reflejó menores valores de sacarosa para el grupo de soja (C), que mostró significación únicamente con el grupo B ( $p < 0,01$ ). La glucosa en el grupo de soja mostró valores estadísticamente superiores ( $p < 0,001$ ) a los otros dos grupos de bebidas. Por su parte, no se encontraron diferencias significativas para la fructosa entre los grupos establecidos debido a la alta fluctuación de concentraciones entre las muestras, atribuibles a la presencia de manzana o de uva en diferentes concentraciones en todos los grupos. El análisis de correlación de Pearson aplicado a todas las muestras reveló una alta correlación positiva entre la fructosa y el porcentaje de concentrado de frutas ( $r = 0,913$ ). Las bebidas preparadas con la manzana como primer ingrediente presentaron una mayor proporción de fructosa, especialmente en algunas muestras del grupo C (C4 y C5). La sacarosa no correlacionó con el porcentaje de concentrado de fruta al ser añadida artificialmente por el fabricante.

La cantidad total de azúcares en las bebidas refrescantes representó aproximadamente el 93% del total de sólidos solubles expresados como °Brix sobre el etiquetado. Este valor coincide con lo publicado por *Kelebek y col. (2009)*.

Tabla 9. Contenido de sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa y azúcares totales (en g/L) y datos de los °Brix reflejados en la etiqueta de las bebidas mixtas comerciales.

Muestra	Sacarosa	Lactosa	Glucosa	Fructosa	Azúcares totales	°Brix
A1	58,0 ± 3,3	5,2 ± 1,0	18,5 ± 0,7	16,2 ± 1,6	87,9 ± 6,6	9,4
A2	78,2 ± 4,1	4,5 ± 0,4	11,9 ± 0,8	12,2 ± 0,8	106,8 ± 6,1	12,3
A3	71,1 ± 4,9	4,9 ± 0,2	16,0 ± 0,7	19,0 ± 0,9	111 ± 6,7	12,4
A4	64,0 ± 4,2	4,8 ± 0,2	10,6 ± 1,0	11,5 ± 0,6	90,9 ± 6,0	9,6
A5	86,6 ± 3,7	5,0 ± 0,2	7,4 ± 0,5	8,8 ± 0,3	107,8 ± 4,7	12
A6	74,1 ± 2,5	4,7 ± 0,2	15,0 ± 0,9	16,7 ± 0,7	110,5 ± 4,3	12,3
A7	77,0 ± 2,6	4,5 ± 0,2	14,3 ± 0,8	16,0 ± 0,4	111,8 ± 4,0	12,3
A8	79,4 ± 2,3	5,7 ± 0,3	10,2 ± 0,6	12,5 ± 0,8	107,8 ± 4,0	12,3
B1	76,5 ± 3,7	5,3 ± 0,2	11,4 ± 2,8	8,1 ± 0,3	101,3 ± 6,0	10,2
B2	87,3 ± 5,4	4,9 ± 0,2	8,3 ± 0,8	9,1 ± 0,6	109,6 ± 7,0	12,3
B3	77,8 ± 2,2	4,6 ± 0,2	5,5 ± 0,5	6,3 ± 0,7	94,2 ± 3,6	9,9
B4	82,9 ± 4,0	4,8 ± 0,4	12,8 ± 2,6	16,9 ± 1,9	117,4 ± 8,9	12,3
B5	79,3 ± 5,0	5,3 ± 0,4	10,9 ± 0,3	13,4 ± 0,5	108,9 ± 6,2	11,6
B6	91,3 ± 1,5	6,0 ± 0,3	7,8 ± 0,5	14,6 ± 1,1	119,7 ± 3,4	12,8
C1	66,9 ± 3,0	nd	22,7 ± 1,0	8,5 ± 0,3	98,1 ± 4,3	10
C2	64,4 ± 2,3	nd	13,9 ± 1,2	11,9 ± 0,5	90,2 ± 4,0	10
C3	61,9 ± 3,2	nd	24,4 ± 1,3	10,1 ± 1,6	96,4 ± 6,1	10
C4	56,3 ± 0,4	nd	25,2 ± 0,7	37,0 ± 0,8	118,5 ± 1,9	12,1
C5	60,0 ± 1,3	nd	22,1 ± 1,4	33,9 ± 2,1	116 ± 4,8	12

Fig. 19. Contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y lactosa de las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes.

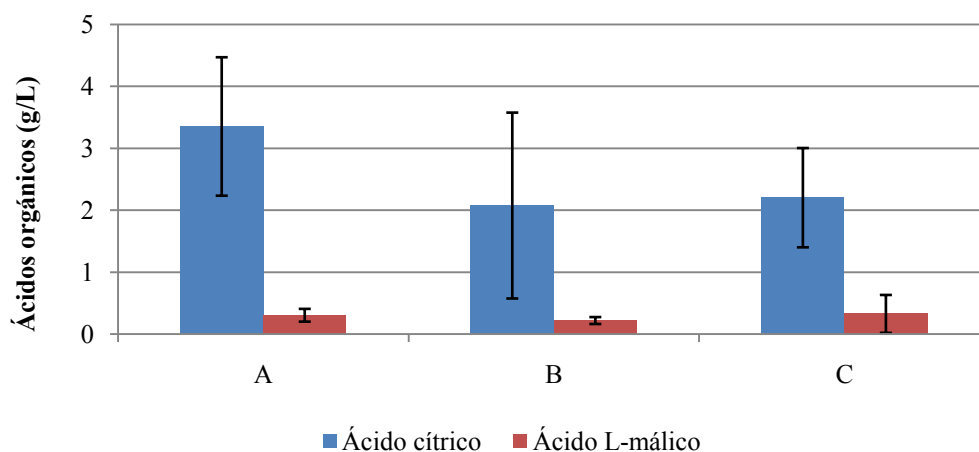


Grupo A (leche y naranja como ingrediente principal), Grupo B (leche y otras frutas distintas a la naranja como ingrediente principal), Grupo C (leche de soja con diferentes frutas).

## Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos identificados y cuantificados en las bebidas refrescantes mixtas fueron cítrico, L-málico y tartárico (**Tabla 10**). El ácido cítrico fue el ácido orgánico más abundante, cuya concentración fluctuó extensamente entre 0,41 y 5,05 g/L. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos debido a la adición de ácido cítrico y sus sales como acidulantes (**Fig. 20**). Estos resultados coinciden con los proporcionados por *Scherer y col. (2012)* en zumos de manzana comerciales. Con respecto al ácido L-málico, cuya concentración se encontró en órdenes de magnitud muy diferentes, con oscilaciones entre 74,5 y 719,5 mg/L, tampoco dio lugar a diferencias significativas entre los grupos. Sí se observó sin embargo una fuerte correlación entre el porcentaje de frutas y el ácido L-málico ( $r= 0,899$ ), no así en el caso del ácido cítrico, ya que si bien este ácido se encuentra de forma natural en muchas frutas, su presencia en estos productos se debe mayoritariamente a su adición. El ácido tartárico se cuantificó en las muestras que contenían uva, independientemente del grupo al que pertenecieran (A3, B3, B5, B6, C4 y C5), como era de esperar (*Mato y col., 2005*), en un intervalo de 43,2 a 165,4 mg/L.

**Fig. 20.** Contenido de ácido cítrico y L-málico de las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes.



Grupo A (leche y naranja como ingrediente principal). Grupo B (leche y otras frutas distintas a la naranja como ingrediente principal). Grupo C (leche de soja con diferentes frutas).

Tabla 10. Contenido de ácido cítrico (g/L), L-málico y tartárico (mg/L) de las bebidas mixtas comerciales.

Muestra	Ácido cítrico	Ácido L-málico	Ácido tartárico
A1	4,49 ± 0,07	302,9 ± 15,7	nd
A2	3,20 ± 0,03	252,5 ± 7,2	nd
A3	5,05 ± 0,06	534,1 ± 14,4	67,9 ± 2,7
A4	3,33 ± 0,03	326,0 ± 0,5	nd
A5	2,62 ± 0,02	248,1 ± 10,9	nd
A6	1,38 ± 0,03	181,0 ± 11,4	nd
A7	3,14 ± 0,03	292,5 ± 3,8	nd
A8	3,62 ± 0,04	308,8 ± 10,4	nd
B1	1,81 ± 0,02	128,3 ± 4,7	nd
B2	0,51 ± 0,09	263,9 ± 17,4	nd
B3	3,14 ± 0,09	242,1 ± 9,7	127,1 ± 28,6
B4	0,41 ± 0,03	266,3 ± 10,1	nd
B5	4,26 ± 0,03	252,7 ± 9,2	43,2 ± 11,0
B6	2,33 ± 0,02	180,0 ± 2,4	104,7 ± 4,3
C1	2,01 ± 0,03	112,3 ± 2,4	nd
C2	2,46 ± 0,10	74,5 ± 10,2	nd
C3	2,06 ± 0,03	131,7 ± 6,7	nd
C4	1,14 ± 0,03	598,3 ± 11,9	165,4 ± 7,9
C5	3,35 ± 0,07	719,5 ± 13,8	71,2 ± 14,5

nd: no detectado.

## Elementos minerales

### Macroelementos

Estos resultados se pueden observar en la **Tabla 11** y en la **Figura 21**. El potasio fue el elemento mayoritario en las bebidas mixtas, con concentraciones entre 148,0 y 941,3 mg/L. Las bebidas de soja (grupo C) contenían los niveles más altos, mostrando diferencias significativas en especial en comparación con el grupo B. Las muestras C4 y C5 (Soja) tenían niveles particularmente altos atribuibles a la mayor concentración de fruta (50%) y la presencia de leche de coco y plátano, respectivamente. Las bebidas integradas por una mayor variedad y cantidad de frutas fueron las que presentaron mayores niveles de potasio. De acuerdo con las tablas de composición, los valores medios de este mineral en zanahoria, plátano, guayaba o fruta de la pasión son del orden de 2,7 a 3,7 g/Kg (*Souci y col., 2008; Wall 2006*), y suponen el doble del contenido de potasio con respecto a frutas como naranja, manzana, fresa, uva o piña (*Bao y col., 1999; Souci y col., 2008*). La correlación entre los niveles de potasio y concentración de fruta en las bebidas mixtas fue muy alta ( $r= 0,871$ ).

Los niveles más altos de sodio se encontraron en las muestras del grupo A (bebidas con leche y naranja como ingrediente principal) y en aquellas que incorporaban zanahoria en su composición, concordante con los mayores niveles de este elemento reflejados en las tablas de composición para esta hortaliza (*Souci y col., 2008*).

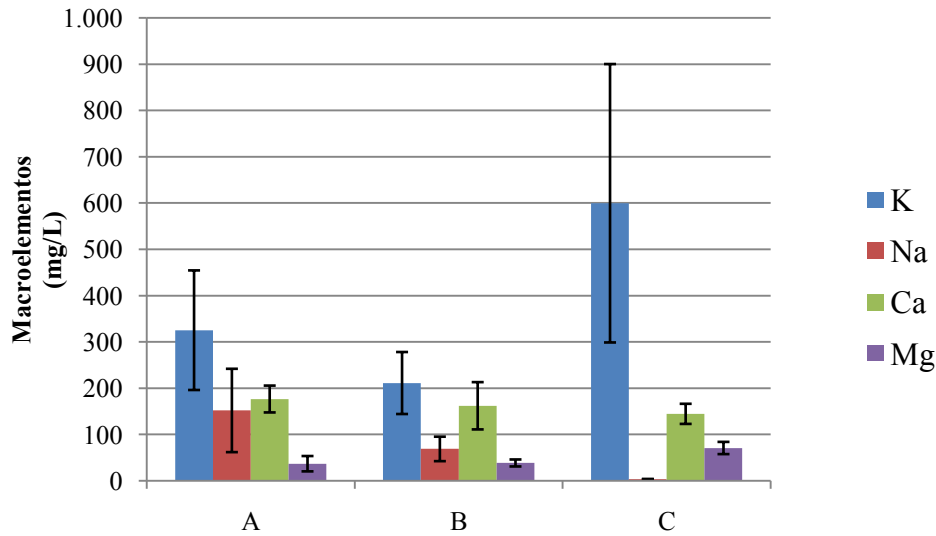
Tres de las muestras pertenecientes al grupo A mostraron el contenido de sodio más alto debido a la adición de citrato trisódico como regulador de la acidez, según se especifica en la etiqueta. Los niveles más bajos de sodio se encontraron en las bebidas de soja (2,96 a 4,45 mg/L). Los niveles actuales de consumo de sodio como cloruro de sodio se han relacionado como uno de los principales factores de aumento de la presión arterial. Por esta razón, las organizaciones internacionales han establecido objetivos para la reducción del consumo de sodio en la dieta (EFSA, 2005). Las bebidas refrescantes mixtas no contribuyen a la ingesta de sodio y podrían ser etiquetadas como “muy bajas en sodio” ya que contienen menos de 0,4 g/L, de acuerdo con el Reglamento sobre declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos (Reglamento CE nº 1924/2006). Las bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y soja podrían etiquetarse incluso como “sin sodio” por contener menos de 0,05 g/Kg.

El contenido de calcio osciló entre 72,0 y 218,8 mg/L. Estos niveles fueron similares a los obtenidos por otros autores en bebidas mixtas (Cilla y col., 2011; Morales de la Peña y col., 2011). La leche utilizada como ingrediente en estas bebidas (grupos A y B) se añadió en la misma proporción (10%), lo que supondría teóricamente una concentración de calcio de 12,3 mg/L (Souci y col., 2008). Por tanto, el factor determinante que explica esas diferencias es la matriz vegetal. La piña y la guayaba son frutas con gran contenido en calcio. En menor proporción se encuentran la naranja y la zanahoria (Bao y col., 1999; Souci y col., 2008). La menor concentración de calcio en las bebidas a base de soja dependió básicamente de esta leguminosa, que proporciona menos calcio que la leche de vaca (Chainanon y col., 2000). Los niveles encontrados en las muestras C1 a C3 concuerdan con los observados por Morales de la Peña y col., (2011) en bebidas similares. Debido al mayor porcentaje de fruta empleado y a la adición de citrato de calcio en las muestras C2 y C3, las concentraciones medias eran del mismo orden que en las muestras con leche.

**Tabla 11. Contenido de macroelementos (sodio, potasio, calcio y magnesio) y microelementos (hierro y zinc) de las bebidas mixtas comerciales (mg/L).**

Muestra	K	Na	Ca	Mg	Fe	Zn
A1	587,5 ± 12,1	204,4 ± 4,1	191,0 ± 5,0	72,3 ± 5,0	0,38 ± 0,02	0,60 ± 0,05
A2	279,0 ± 1,8	118,5 ± 8,7	187,4 ± 5,5	35,9 ± 3,0	0,37 ± 0,01	0,46 ± 0,04
A3	395,0 ± 4,6	303,0 ± 11,0	169,0 ± 4,0	43,2 ± 2,6	0,39 ± 0,01	0,41 ± 0,02
A4	312,3 ± 13,6	99,3 ± 7,5	218,8 ± 7,0	42,3 ± 3,7	0,39 ± 0,01	0,82 ± 0,07
A5	150,3 ± 2,1	254,0 ± 8,2	131,0 ± 6,0	31,0 ± 3,0	0,20 ± 0,02	0,36 ± 0,03
A6	254,7 ± 3,5	85,1 ± 4,0	183,0 ± 7,0	20,8 ± 0,3	0,35 ± 0,02	0,42 ± 0,04
A7	361,1 ± 16,0	94,0 ± 8,0	192,7 ± 8,5	21,7 ± 2,5	0,43 ± 0,02	0,45 ± 0,03
A8	262,3 ± 1,5	57,0 ± 3,6	140,0 ± 2,0	28,2 ± 2,6	0,33 ± 0,02	0,48 ± 0,03
B1	148,0 ± 1,0	68,4 ± 3,2	173,0 ± 3,0	44,0 ± 5,0	0,22 ± 0,03	0,49 ± 0,03
B2	169,3 ± 6,7	30,1 ± 4,0	183,0 ± 0,6	33,1 ± 3,0	0,20 ± 0,02	0,39 ± 0,02
B3	148,0 ± 2,0	50,8 ± 7,55	186,7 ± 3,3	41,0 ± 4,0	0,40 ± 0,04	0,47 ± 0,04
B4	235,0 ± 2,0	68,3 ± 5,5	72,0 ± 1,0	25,7 ± 2,1	0,35 ± 0,03	0,45 ± 0,03
B5	312,3 ± 6,7	99,3 ± 11,1	218,8 ± 1,0	42,3 ± 3,8	0,39 ± 0,05	0,82 ± 0,02
B6	254,7 ± 4,5	96,1 ± 2,1	138,8 ± 4,6	44,9 ± 5,6	0,44 ± 0,03	0,47 ± 0,02
C1	472,0 ± 7,9	3,00 ± 1,00	118,7 ± 0,6	64,3 ± 0,6	1,23 ± 0,01	0,80 ± 0,04
C2	224,7 ± 8,5	3,16 ± 0,77	139,7 ± 6,0	62,0 ± 4,0	0,72 ± 0,06	0,49 ± 0,03
C3	485,7 ± 3,5	3,00 ± 2,00	130,7 ± 0,6	57,7 ± 1,5	0,85 ± 0,04	1,04 ± 0,02
C4	941,3 ± 35,0	4,45 ± 1,50	165,4 ± 0,4	84,1 ± 4,0	1,71 ± 0,05	1,06 ± 0,09
C5	873,7 ± 6,7	2,96 ± 0,89	168,4 ± 0,9	85,9 ± 5,0	2,19 ± 0,07	1,21 ± 0,10

Fig. 21. Contenido de macroelementos (sodio, potasio, calcio y magnesio) de las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes.



Grupo A (leche y naranja como ingrediente principal). Grupo B (leche y otras frutas distintas a la naranja como ingrediente principal). Grupo C (leche de soja con diferentes frutas).

En relación al magnesio los niveles oscilaron desde 20,8 hasta 85,9 mg/L. Según datos bibliográficos, las concentraciones de magnesio en zumos de fruta son muy variadas: 30-32 mg/L en zumos de naranja y manzana, 63 mg/L en zumo de piña o 84-154 mg/L en zumos comerciales (Cindric y col., 2011; Szymczycha-Madeja y Welna, 2013). Por tanto, la variedad de frutas utilizadas en la preparación de las muestras es un factor importante a tener en cuenta. Niu y col. (2008) analizaron diferentes variedades de zumos de naranja y encontraron un contenido de magnesio entre 20,6 y 125,3 mg/Kg. En las muestras analizadas en esta Tesis, la concentración de magnesio fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) en las bebidas de fruta y leche (grupos A y B) con respecto a las de fruta y soja (grupo C), pero la diferencia estriba no sólo en la soja, sino también en las frutas que se incorporan en las bebidas de este grupo. Principalmente el plátano y la papaya presentes en dichas bebidas son frutas con alto contenido de magnesio (Souci y col., 2008).

### Microelementos esenciales y elementos tóxicos

Dentro de los microelementos predominó el hierro con niveles muy variables entre 0,20 y 2,19 mg/L (Tabla 11). Los valores de zinc también oscilaron ampliamente entre 0,36 y 1,21 mg/L. En ambos casos los niveles más elevados se determinaron en bebidas de soja (grupo C). Sánchez-Segarra y col. (2000) detectaron cantidades de hierro sustancialmente más altas en la soja (8 g/Kg) que en la leche (1,2 g/Kg), lo que avala las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) encontradas en nuestro estudio entre los contenidos de hierro del grupo C frente a los de los grupos A y B. Además, el coco y la fresa presentes en algunas muestras del grupo C son frutas ricas en hierro (Souci y col., 2008; Szymczycha-Madeja y Welna, 2013). En relación al zinc también se observaron diferencias significativas entre las bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y soja y las elaboradas con fruta y leche.

Los niveles de los metales tóxicos, plomo y cadmio, en las bebidas comerciales estudiadas se situaron por debajo de sus límites de detección (0,02 y 0,01 mg/Kg, respectivamente). Su ausencia resulta positiva desde el punto de vista de la seguridad alimentaria por los efectos tóxicos asociados a estos metales.

### Aniones

Los aniones evaluados han sido sulfatos, fosfatos, cloruros y nitratos (**Tabla 12**). Los resultados constituyen una aportación de gran interés dado que por el momento no se han encontrado datos bibliográficos que proporcionen el perfil aniónico de las bebidas mixtas. Los aniones predominantes fueron los sulfatos y los fosfatos, con niveles de concentración que oscilaron entre 39 y 278 mg/L y 51 y 428 mg/L, respectivamente. Los márgenes tan amplios responden a la presencia o ausencia de soja y al porcentaje y tipo de frutas utilizado en cada bebida. Así, las bebidas a base de soja (grupo C) mostraron cantidades significativamente superiores de ambos aniones ( $p < 0,05$ ) con respecto a los cloruros (**Fig. 22**). Los fosfatos se relacionaron estrechamente ( $r = 0,797$ ) con el porcentaje de concentrado de frutas. *Szymczycha-Madeja y Welna (2013)* analizaron el fósforo en zumos de frutas comerciales (manzana, piña, naranja) y encontraron concentraciones en un intervalo de 84 a 108 mg/L en función del tipo de fruta.

Los cloruros se hallaron en un intervalo de 8 a 157 mg/L. Los niveles de cloruros fueron en general menores en el grupo de bebidas de soja, aunque no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos debido al elevado contenido de la muestra C4 (**Tabla 12**). Aunque se vio una correlación moderada con el porcentaje de concentrado de frutas ( $r = 0,593$ ), el tipo de hortaliza o fruta utilizada influyó en los resultados: el plátano, la piña o la zanahoria contribuyen en mayor medida al valor de cloruros (*Souci y col., 2008*).

Los nitratos, como era de esperar, mostraron los valores más bajos en las bebidas mixtas (0,22-1,14 mg/L), debido a su origen como fertilizante. El nitrito no se detectó en ninguna muestra (LOD = 0,052 mg/L), lo que resulta positivo, dadas las implicaciones negativas de estos compuestos en la salud humana.

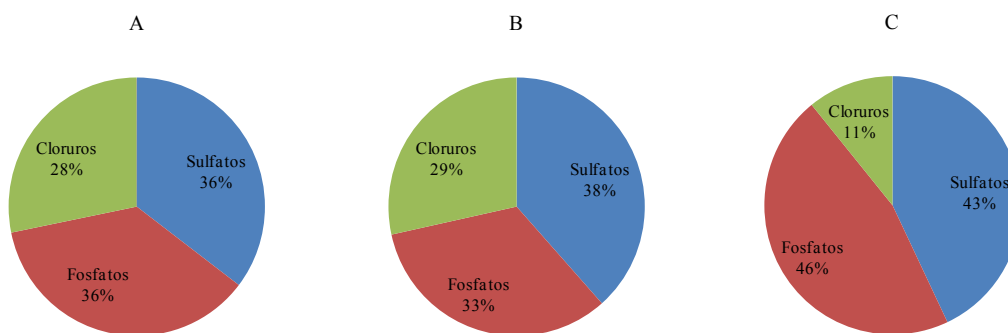
La relación calcio:fósforo constituye un parámetro de interés ya que orienta sobre la mayor o menor posibilidad de absorción de calcio en el organismo. Las bebidas elaboradas con leche (grupos A y B) presentaron una proporción en torno a 2, mientras que en las de soja la proporción fue inferior a 1 ( $p < 0,05$ ). Esta significación es debida al mayor contenido de fósforo en las muestras con soja. Este balance en las muestras con soja repercute negativamente en la absorción y eliminación del calcio. Un balance inadecuado en la dieta se relaciona en general con problemas de hipocalcemia y deficiente densidad mineral ósea (*Tojo Sierra, 2003*).

El consumo de 330 mL, correspondiente a un envase individual, por los consumidores diana de estas bebidas (población infantil entre 6 y 13 años) contribuye a las ingestas recomendadas de minerales en los siguientes porcentajes medios de cada elemento: 6% de Ca, 10% Mg, 9% K, 4% de Fe, 4% Zn y 13% de P de las IDR (*FESNAD, 2010*).

Tabla 12. Contenido de aniones (mg/L) y relación calcio:fósforo de las bebidas mixtas comerciales.

Muestra	Cloruros	Nitratos	Fosfatos	Sulfatos	Ratio Ca:P
A1	137,0 ± 8,9	1,14 ± 0,05	168,1 ± 28,4	199,3 ± 1,8	1,16
A2	92,9 ± 4,2	0,57 ± 0,02	93,0 ± 6,7	142,0 ± 14,2	2,02
A3	75,7 ± 0,3	0,36 ± 0,04	128,7 ± 1,5	99,7 ± 3,9	1,31
A4	54,3 ± 0,3	0,25 ± 0,04	52,1 ± 1,3	44,8 ± 0,5	4,2
A5	82,6 ± 4,4	0,39 ± 0,06	93,7 ± 10,3	92,6 ± 5,2	1,41
A6	67,1 ± 0,9	0,55 ± 0,08	112,5 ± 14,9	64,2 ± 5,9	1,65
A7	62,7 ± 2,3	0,75 ± 0,08	105,8 ± 17,7	86,8 ± 3,4	1,85
A8	79,6 ± 3,5	0,22 ± 0,03	84,8 ± 3,8	88,2 ± 3,3	1,65
B1	57,2 ± 7,5	0,81 ± 0,09	83,3 ± 4,5	129,7 ± 8,6	2,08
B2	63,2 ± 5,9	0,24 ± 0,04	90,8 ± 12,2	73,5 ± 7,9	2,04
B3	53,2 ± 0,7	0,35 ± 0,08	51,8 ± 6,0	39,1 ± 1,1	3,65
B4	93,3 ± 4,4	0,61 ± 0,04	59,2 ± 6,6	142,9 ± 11,3	1,23
B5	54,3 ± 6,2	0,25 ± 0,03	52,1 ± 6,0	44,8 ± 17,0	4,2
B6	35,5 ± 1,0	0,94 ± 0,03	76,0 ± 5,4	51,6 ± 1,2	1,83
C1	13,1 ± 1,3	0,35 ± 0,04	145,4 ± 19,8	173,3 ± 24,5	0,83
C2	42,4 ± 0,9	0,60 ± 0,04	153,9 ± 5,5	250,9 ± 18,5	0,91
C3	8,2 ± 2,6	0,32 ± 0,03	164,8 ± 20,8	178,7 ± 6,5	0,8
C4	157,4 ± 10,7	0,38 ± 0,05	318,8 ± 10,4	245,7 ± 11,5	0,52
C5	62,3 ± 1,0	0,84 ± 0,07	428,3 ± 21,1	278,5 ± 7,3	0,39

Fig. 22. Distribución de cloruros, sulfatos y fosfatos en las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes.



Grupo A (leche y naranja como ingrediente principal). Grupo B (leche y otras frutas distintas a la naranja como ingrediente principal). Grupo C (leche de soja con diferentes frutas).

### 1.3. Análisis sensorial

Los resultados de este apartado se encuentran recogidos en la publicación n° 3. Las bebidas refrescantes mixtas fueron evaluadas por un panel de cata no entrenado de acuerdo a los siguientes atributos sensoriales: color, dulzor, acidez, aroma, consistencia y aceptabilidad general (**Fig. 23**). Las bebidas en este caso se agruparon tal como se ha especificado en el apartado anterior en función de la presencia (grupo A) o ausencia (grupo B) de naranja entre los ingredientes o la presencia de soja (grupo C). La comparación entre los grupos dio lugar a diferencias significativas en cuanto al color ( $p < 0,05$ ), dulzor ( $p < 0,05$ ), acidez ( $p < 0,05$ ) y consistencia ( $p < 0,001$ ).

La intensidad del color naranja fue notablemente mayor en el grupo A (7,1) que en el B (4,6) como era de esperar por la presencia de naranja como ingrediente principal y no hubo diferencias significativas entre A y C (6,5). Este atributo presentó una gran variabilidad en el grupo de soja -C- debido a las diferentes frutas utilizadas como ingredientes en su preparación. De esta manera, las bebidas de soja que contenían papaya o melocotón presentaron una puntuación más alta de color (7,7-9,0) que las preparadas con manzana o naranja (3,7-6,2). Este aumento significativo en la puntuación del color en la cata se aproxima a los resultados objetivos de medición de color (CIE Lab, apartado 1.1), donde se correlacionaba el parámetro  $b^*$  con el contenido de  $\beta$ -caroteno.

Las puntuaciones otorgadas al dulzor fueron significativamente más altas y homogéneas en las bebidas del grupo B (6,2) en comparación con las del C (5,0), debido a la influencia en el sabor de las semillas de soja contenidas en la formulación de estas bebidas. Los panelistas no encontraron diferencias pronunciadas en la intensidad de dulzor entre los grupos A (5,6) y B.

Con respecto a la acidez, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, aunque las bebidas del grupo A mostraron mayores niveles que los otros grupos, con un valor medio de 4,3 frente a los 3,4 tanto para el grupo B como para el C. *Laaksonen y col. (2012)* describieron que el contenido de azúcares, ácidos y la relación entre ambos están relacionados con el dulzor y la acidez de los zumos de grosella. En las bebidas analizadas, la relación azúcares:ácidos fue menor en las muestras con naranja como primer ingrediente (grupo A) con respecto a los otros grupos (B y C), lo que explica la mayor acidez percibida por los panelistas. El bajo pH del ácido cítrico hace que sea adecuado para su uso en bebidas refrescantes con el fin de aumentar los niveles de acidez y potenciar los sabores de frutas (*Soccol y col., 2006*). La etiqueta de todas las muestras analizadas mencionaba la adición de ácido cítrico, pero las concentraciones más altas se encontraron en el grupo A, probablemente por la presencia de naranja como fruta principal.

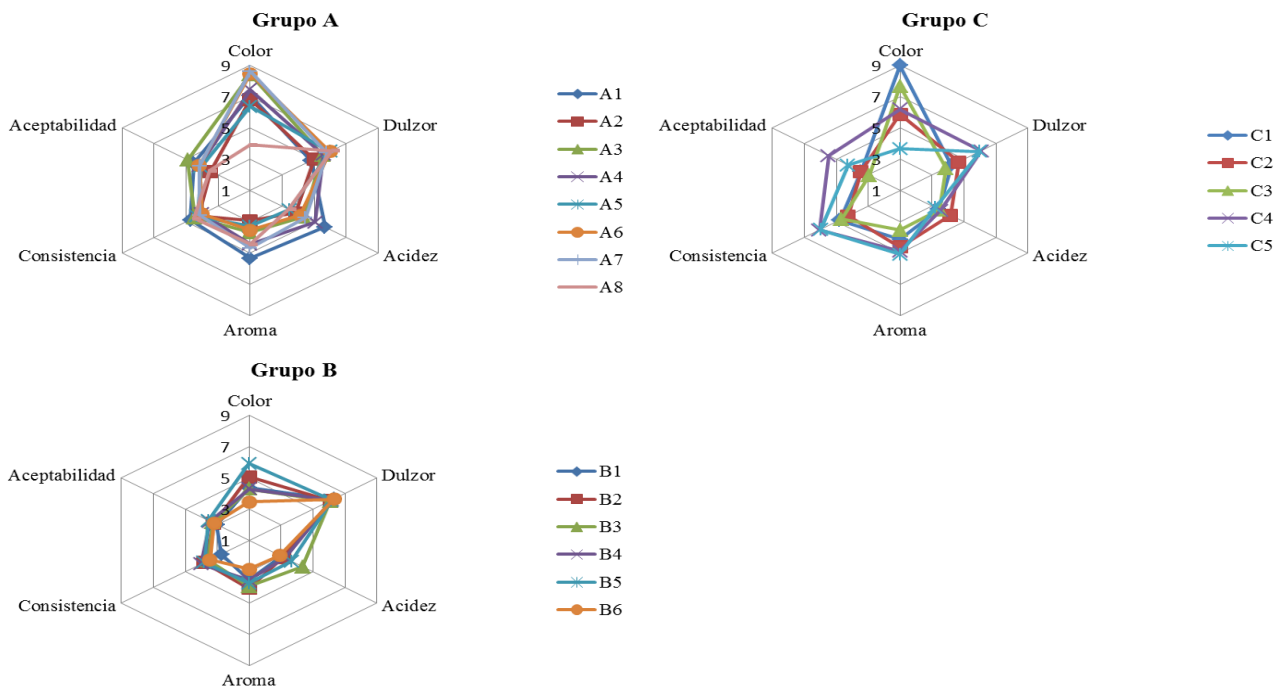
Las bebidas refrescantes mixtas no destacan por presentar un aroma intenso, lo que queda demostrado por las bajas puntuaciones (entre 3,6 y 4,4) otorgadas por los panelistas al evaluar este atributo. No se detectó ninguna diferencia significativa en la intensidad del aroma afrutado entre los grupos. *King y col. (2006)* demostraron que al aumentar la concentración de sacarosa en un sistema acuoso con sabor a frutas aumentaba la percepción retronasal del aroma afrutado.

La consistencia difirió significativamente entre los tres grupos, con valores medios de 4,3 (grupo A), 3,6 (grupo B) y 5,2 (grupo C). La adición de soja, así como la concentración empleada, pueden tener una influencia en la consistencia de la bebida. En este grupo, la puntuación más alta se obtuvo para las muestras C4 y C5 debido al mayor porcentaje de concentrado (50%) con respecto a las muestras restantes de soja (11%).

En relación a la aceptabilidad general, el grupo A fue significativamente mejor valorado (4,1) que el grupo B (3,3), lo que concuerda con los datos publicados por *Kale y col. (2012)*, donde las mezclas realizadas con la mayor concentración de naranja fueron las que obtuvieron mejor aceptabilidad general. En el caso del grupo C, los valores presentaron una amplia dispersión (2,9 a 5,5), obteniéndose puntuaciones más altas en las bebidas elaboradas con mayor porcentaje de fruta. De acuerdo con *Yadav y col. (2010)*, las bebidas con plátano resultan organolépticamente deseables, lo que explica también la alta puntuación de la muestra C4 (5,5). Curiosamente, las bebidas mixtas con mayor consistencia tuvieron una aceptabilidad buena ( $r= 0,788$ ), tal vez porque la textura cremosa está asociada con bebidas más naturales y, por lo tanto, el consumidor lo asocia con el concepto más saludable.

El análisis entre los componentes químicos y el perfil sensorial de bebidas comerciales mixtas dio lugar a correlaciones notables. Existe una elevada correlación entre el porcentaje de concentrado de frutas usado en la preparación de las bebidas mixtas y su consistencia ( $r= 0,829$ ). También se encontraron altos coeficientes de correlación ( $r > 0,79$ ) con fructosa, ácido málico, potasio y fosfato debido a que todos ellos son compuestos naturales de las frutas y dependen del porcentaje de concentrado empleado. Los azúcares son intrínsecamente responsables del dulzor de los zumos, por lo que su contenido es un importante atributo de calidad (*Vervoort y col., 2011*). Se pudo observar una correlación negativa entre el contenido total de azúcar y el sabor ácido ( $r= -0,790$ ). Las muestras peor evaluadas en términos de dulzor (A1 y C3) mostraron menor contenido de fructosa que de glucosa, lo que concuerda con las afirmaciones de *Niu y col. (2008)*, quienes indicaron que contenidos de fructosa ligeramente superiores a los de glucosa dan lugar a una percepción de mayor dulzor en el zumo.

**Fig. 23. Gráfico radial de los resultados del análisis sensorial para los atributos estudiados (color, dulzor, acidez, aroma, consistencia y aceptabilidad) en las bebidas mixtas comerciales agrupadas según la composición de ingredientes.**



Grupo A (leche y naranja como ingrediente principal). Grupo B (leche y otras frutas distintas a la naranja como ingrediente principal). Grupo C (leche de soja con diferentes frutas).

## 1.4. Parámetros funcionales

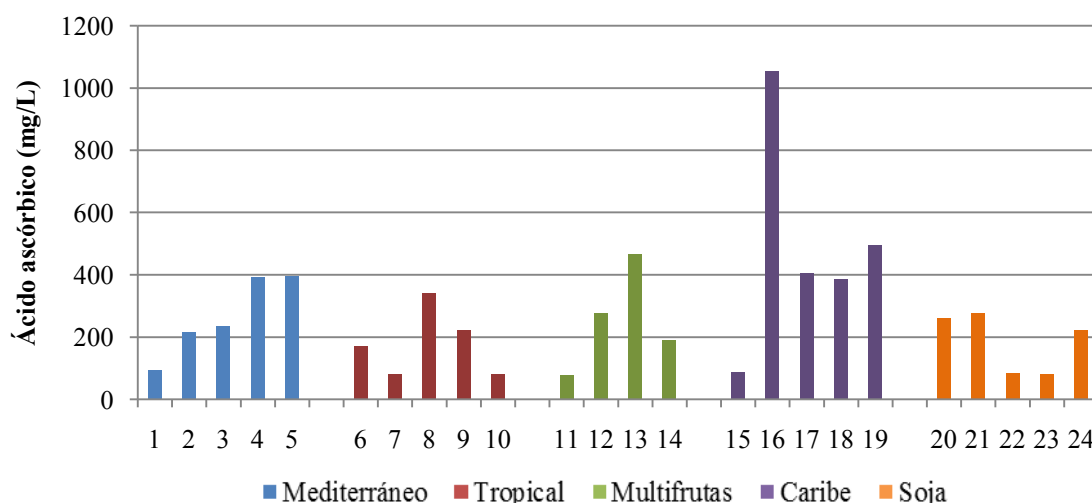
Los compuestos bioactivos: ácido ascórbico, carotenoides y polifenoles, así como la capacidad antioxidante, fueron determinados en la totalidad de las muestras comerciales (24) que figuran en la **Tabla 4** del capítulo 3 (apartado 1.1). Los resultados figuran en la publicación 1. Las vitaminas A (retinol y ésteres) y E (tocoferoles) se agregan como aditivos en las bebidas estudiadas, por lo que para su ensayo concreto se seleccionaron las 16 muestras en cuya etiqueta se mencionaba tal adición. La codificación y descripción de estas muestras se detalla en la **Tabla 6** del capítulo 3 (apartado 1.1) y los resultados figuran en la publicación n° 2.

### Compuestos bioactivos

#### Ácido ascórbico

En las bebidas mixtas el ácido ascórbico se encontró en un amplio rango de valores, entre 78,8 y 993 mg/L (**Fig. 24**). La mayor concentración se observó en la muestra 16, considerada atípica dentro de las bebidas mixtas de fruta y leche analizadas, por ser la única que contenía kiwi y por su color verde. Dicha muestra se integraba dentro de la denominación comercial “Caribe”, grupo con niveles significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los demás. No se encontró una correlación clara entre la concentración de ácido ascórbico y el porcentaje del concentrado de fruta, lo que sugiere que la principal fuente de esta vitamina es su inclusión como aditivo. La razón de su adición reside en la labilidad del ácido ascórbico, que se degrada fácilmente durante el almacenamiento (*Cortés y col., 2005*) y, además, los fabricantes a menudo añaden cantidades más elevadas de las que mencionan en la etiqueta, para garantizar la cantidad de ácido ascórbico declarada durante toda la vida útil de la bebida. Esto explicaría por qué, en general, las cantidades determinadas por HPLC fueron superiores a las indicadas en el envase y no correlacionaban bien entre sí.

Fig. 24. Contenido de ácido ascórbico en las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial.



### Tocoferoles y retinol

La separación, identificación y cuantificación de las distintas estructuras de tocoferoles forma parte de la publicación n° 2. El objetivo de dicha publicación consistió en el desarrollo y validación de un método de HPLC con detección DAD sencillo y rápido que permitiese no sólo la aplicación a la determinación de esta fracción, sino también y de forma simultánea a la determinación de retinol y derivados responsables de la actividad vitamínica A. Dado que su presencia en estas bebidas se debe en gran parte a su incorporación como aditivo, se planteó una selección de 16 muestras comerciales correspondientes a aquellas en las que figuraba la incorporación de tales aditivos en el etiquetado (**Tabla 6**).

El  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol y el acetato de  $\alpha$ -tocoferol se separaron satisfactoriamente y fueron cuantificados en las bebidas refrescantes mixtas comerciales a base de leche y/o soja. En las muestras mixtas elaboradas con leche se encontraron cantidades notables de acetato de tocoferol y niveles bajos de  $\alpha$ -tocoferol, mientras que en las bebidas mixtas con soja sólo se identificaron los diferentes isómeros de tocoferoles (**Tabla 13**).

De acuerdo con el etiquetado, en las bebidas con soja no se adicionó vitamina E. Por el contrario, en las muestras con leche, el fabricante sí declaró la inclusión de este aditivo. Los niveles de acetato de  $\alpha$ -tocoferol encontrados oscilaron entre 4,3 y 21,2 mg/L. Estas concentraciones eran similares a las menciones del etiquetado, salvo en tres muestras donde experimentalmente se detectaron menores cantidades. Esto puede ser debido a la labilidad de esta vitamina frente a la temperatura, el pH y la luz. *Barba y col. (2011)* en bebidas de frutas determinaron un contenido superior de vitamina E al declarado en la etiqueta, mientras que en el caso de alimentos infantiles, el contenido era menor probablemente como consecuencia de la pasteurización.

El  $\alpha$ -tocoferol se cuantificó en el 75% de las muestras de fruta-leche, en un rango entre 115 y 975  $\mu\text{g/L}$ . Su presencia puede ser debida a la propia hidrólisis del éster (acetato de  $\alpha$ -tocoferol) durante la fabricación o el almacenamiento, favorecida por el bajo pH de las bebidas mixtas (*Schieber y col., 2002*) o puede formar parte de manera natural de las frutas que componen las bebidas, lo que se confirmaría por su presencia en la muestra 6, en la que no consta la adición de acetato de  $\alpha$ -tocoferol. *Chun y col. (2006)* detectaron  $\alpha$ -tocoferol como la principal forma de vitamina E en la mayoría de frutas y verduras. Aunque el  $\alpha$ -tocoferol está presente en la leche entera (*Barba y col., 2011; Esteve y Frígola, 2011; Meglia y col., 2006; Salo-Väänänen y col., 2000*), no se detectó en la leche desnatada empleada como ingrediente de las bebidas de fruta y leche. En el caso de las bebidas con soja se detectaron los diferentes isómeros:  $\gamma$ -tocoferol (695-2100  $\mu\text{g/L}$ ),  $\alpha$ -tocoferol (94-2011  $\mu\text{g/L}$ ) y en menor proporción  $\delta$ -tocoferol (108-1113  $\mu\text{g/L}$ ). De acuerdo a *Monge-Rojas y Campos (2011)* y *Slavin y Yu (2012)*, las semillas de soja podrían aportar el contenido de  $\gamma$ -tocoferol (**Fig. 25**).

El método desarrollado permitió el análisis simultáneo de retinol y palmitato de retinol, sin embargo la forma libre no se detectó en ninguna de las muestras analizadas (**Tabla 13**). En el caso del palmitato de retinol, las concentraciones oscilaron entre 1,6 y 2,8 mg/L. Estos valores son algo superiores a los indicados en la etiqueta, lo que puede atribuirse a una adición en exceso con el fin de compensar las pérdidas que pudieran derivarse a lo largo de la vida útil. En las muestras 3 y 12 no se detectó palmitato de retinol, pese a lo indicado en la etiqueta.

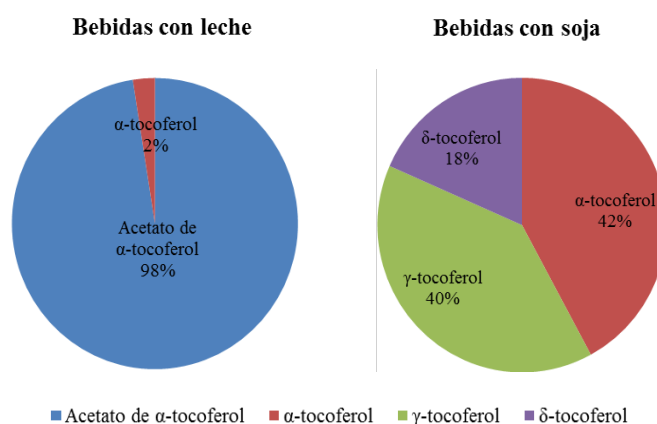
Aunque el  $\beta$ -caroteno también fue analizado por este método, los resultados de este compuesto están discutidos en el siguiente apartado con los datos obtenidos del método analítico específico de carotenoides. No obstante, los datos obtenidos con ambas metodologías son muy similares entre sí.

Tabla 13. Datos de etiquetado de las vitaminas A y E y contenido en tocoferoles y palmitato de retinol (mg/L) analizados en las bebidas mixtas comerciales.

Muestra	Vit. E (etiqueta)	Acetato de $\alpha$ -tocoferol	$\alpha$ -tocoferol	$\gamma$ -tocoferol	$\delta$ -tocoferol	Vit. A (etiqueta)	Palmitato de retinol
1	15	8,5 ± 0,3	0,16 ± 0,02	nd	nd	1,2	1,79 ± 0,13
2	18	4,8 ± 0,1	0,30 ± 0,03	nd	nd	1,2	nd
3	15	13,8 ± 3,1	0,98 ± 0,10	nd	nd	1,2	nd
4	18	14,8 ± 0,6	nd	nd	nd	1,2	2,27 ± 0,16
5	18	17,7 ± 0,1	0,67 ± 0,01	nd	nd	1,2	1,79 ± 0,14
6	ni	nd	0,12 ± 0,02	nd	nd	ni	nd
7	18	4,3 ± 0,5	0,15 ± 0,03	nd	nd	ni	nd
8	15	14,7 ± 0,1	0,29 ± 0,02	nd	nd	1,2	2,26 ± 0,61
9	18	13,2 ± 0,3	0,41 ± 0,05	nd	nd	1,2	2,79 ± 0,62
10	15	14,5 ± 2,3	nd	nd	nd	1,2	1,87 ± 0,20
11	18	21,2 ± 0,2	0,27 ± 0,02	nd	nd	1,2	1,62 ± 0,14
12	15	14,0 ± 1,0	nd	nd	nd	1,2	nd
13	ni	nd	0,17 ± 0,02	0,70 ± 0,02	0,11 ± 0,02	ni	nd
14	ni	nd	5,00 ± 0,57	2,10 ± 0,10	1,08 ± 0,19	ni	nd
15	ni	nd	1,01 ± 0,16	1,62 ± 0,04	0,48 ± 0,02	ni	nd
16	ni	nd	0,09 ± 0,01	1,39 ± 0,01	1,11 ± 0,02	ni	nd

ni: no indicado; nd: no detectado.

Fig. 25. Distribución de los isómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\gamma$ - de tocoferol y acetato de  $\alpha$ -tocoferol en las bebidas mixtas comerciales.



## Carotenoides

Los principales carotenoides identificados y cuantificados en las bebidas comerciales fueron  $\beta$ -caroteno, zeaxantina y luteína. A nivel trazas se reconocieron otras xantofilas (valencia-xantina, anteraxantina, *cis*- epóxido de luteína, auroxantina, mutatoxantina,  $\beta$ -criptoxantina) y carotenos ( $\alpha$ -caroteno y  $\epsilon$ -caroteno). La **Tabla 14** recoge el contenido de todos ellos y la **Figura 26** ilustra el contenido total de carotenoides en estas muestras.

La categoría “Multifrutas” presentó valores de  $\beta$ -caroteno más uniformes y significativamente superiores ( $p < 0,005$ ) a los cuantificados en el resto de los grupos. Estos resultados concuerdan con los aportados por *Zulueta y col. (2007b)* para la misma matriz, donde se obtuvieron niveles entre 16 y 2990  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , expresados como suma de *cis*- y *trans*-  $\beta$ -caroteno. En bebidas de fruta y soja, *Morales de la Peña y col. (2011)* analizaron una concentración de 430  $\mu\text{g}/\text{L}$ . En las muestras de la presente Tesis, la presencia de naranja como primer ingrediente, así como la zanahoria y el mango, puede asociarse a una mayor concentración de  $\beta$ -caroteno (muestras 3, 8, 11, 13 y 18). Sin embargo, no se ha detectado correlación entre los niveles de este caroteno y el porcentaje de concentrado de fruta, lo que sugiere que la principal fuente de este compuesto es la adición deliberada por los fabricantes, al igual que ocurría con el ácido ascórbico, el acetato de tocoferol y el palmitato de retinol. Pese a que el 75% de las muestras indicaron en la etiqueta la adición de  $\beta$ -caroteno, sólo en tres (muestras 4, 5 y 9) se especificó la cantidad adicionada (120  $\mu\text{g}$  por cada 100 mL). Aunque esta información no es obligatoria, resulta de gran ayuda para determinar la ingesta a partir de este tipo de bebidas. El  $\beta$ -caroteno correlacionó fuertemente ( $r = 0,917$ ) con el parámetro de color  $b^*$ , asociado al color amarillo-naranja.

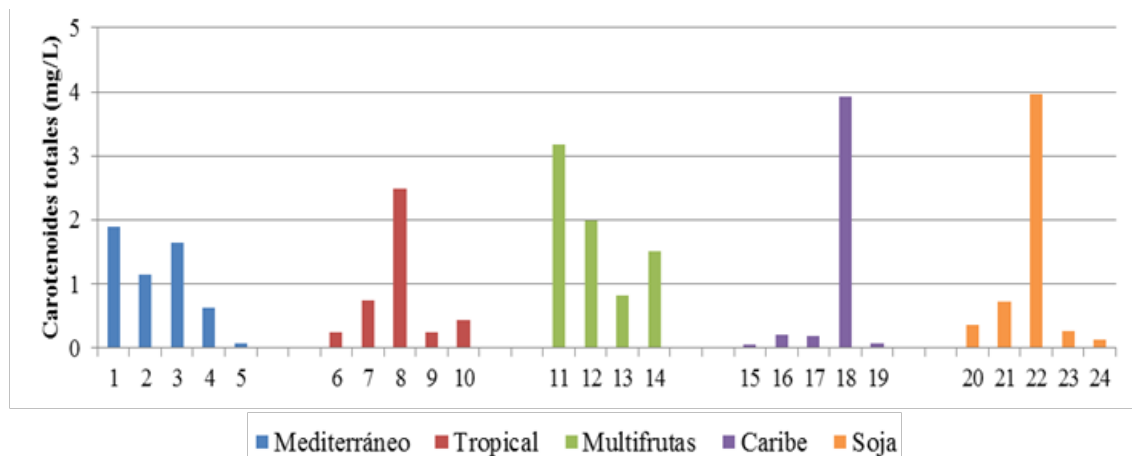
La zeaxantina se cuantificó en las muestras “Mediterráneo” (a excepción de la muestra 5), “Multifrutas” y en muestras individuales de los otros grupos “Tropical” y “Caribe”, pero no en las de “Soja”. Esta xantofila se encuentra principalmente en frutas tales como naranja, mango, zanahoria y piña. Por su parte, la luteína se detectó en muestras con naranja y con una elevada proporción de concentrado de frutas (30% a 50%). Dentro de los carotenoides minoritarios identificados destacan el *cis*-epóxido de luteína, proveniente de la degradación de la misma, los  $\alpha$ - y  $\epsilon$ - carotenos y la  $\beta$ -criptoxantina, formada por hidroxilación del  $\beta$ -caroteno. Esta xantofila está presente en la pulpa de cítricos, melocotón, papaya y albaricoque (*Rodríguez-Amaya, 2001; Zulueta y col., 2007b*) y se puede hidroxilar a su vez para dar la zeaxantina, que por epoxidación origina la anteraxantina. Por otra parte, la mutatoxantina y la auroxantina se sintetizan mediante reacciones de tipo epoxi-furanósido, lo que explica su presencia en bebidas que contienen zeaxantina. Las clorofilinas, identificadas en la muestra 16 (Caribe), fueron responsables del color verde de la bebida. Según *Mortensen y Geppel (2007)*, las clorofilinas derivan de la hidrólisis de clorofila, que rinde una mezcla de una amplia variedad de compuestos genéricamente conocidos como clorinas, con estructura de ácido carboxílico. Sus sales sódicas son solubles en agua y en la actualidad está permitido el uso de clorofilina de sodio-cobre como aditivo alimentario (E141).

Tabla 14. Carotenoides cuantificados e identificados y equivalentes de retinol de las bebidas mixtas comerciales.

Muestra	Luteína µg/L	Zeaxantina µg/L	β-caroteno mg/L	Carotenoides totales mg/L	Vitamina A* (ER, µg/L)	Trazas
1M	12,3 ± 0,6	53,5 ± 5,1	1,82 ± 0,06	1,89 ± 0,08	152 ± 7	Valenciaxantina, anteraxantina, α- y ε-caroteno, β-criptoxantina
2M	nd	73,0 ± 6,9	1,08 ± 0,02	1,16 ± 0,02	90 ± 4	α- y ε- caroteno
3M	7,0 ± 0,2	97,5 ± 6,2	2,55 ± 0,03	2,66 ± 0,04	213 ± 9	
4M	nd	47,0 ± 1,9	1,20 ± 0,01	1,24 ± 0,02	100 ± 2	
5M	nd	nd	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	6,0 ± 0,2	ε-caroteno, valenciaxantina
6T	nd	nd	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01	21 ± 0,6	
7T	nd	37,0 ± 2,0	0,69 ± 0,02	0,73 ± 0,02	58 ± 1	Auroxantina
8T	nd	89,5 ± 1,5	2,40 ± 0,05	2,49 ± 0,05	200 ± 9	Auroxantina
9T	nd	nd	0,24 ± 0,02	0,24 ± 0,02	20 ± 0,2	
10T	nd	nd	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,01	36 ± 0,1	
11F	nd	74,0 ± 1,0	3,10 ± 0,04	3,17 ± 0,04	258 ± 12	ε-caroteno, isómero de mutatoxantina
12F	5,0 ± 0,2	41,0 ± 2,2	1,99 ± 0,05	2,03 ± 0,05	166 ± 6	ε-caroteno, fitoeno
13F	nd	54,2 ± 4,4	2,77 ± 0,03	2,83 ± 0,04	231 ± 13	β-criptoxantina, α-caroteno
14F	nd	38,0 ± 2,1	1,51 ± 0,02	1,54 ± 0,02	16 ± 0,2	
15C	nd	nd	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	4,9 ± 0,5	
16C	5,0 ± 0,1	nd	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01	18 ± 0,2	Clorofilinas, anteraxantina
17C	nd	nd	0,19 ± 0,01	187 ± 0,01	16 ± 0,1	
18C	nd	76,2 ± 4,0	3,55 ± 0,03	3,62 ± 0,04	296 ± 15	β-criptoxantina, ε-caroteno
19C	nd	nd	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	5,7 ± 0,1	
20S	nd	nd	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,01	30 ± 0,3	
21S	nd	nd	0,92 ± 0,01	0,92 ± 0,01	76 ± 2	
22S	nd	nd	2,60 ± 0,02	2,60 ± 0,02	216 ± 14	
23S	0,75 ± 0,01	nd	0,30 ± 0,01	0,35 ± 0,01	29 ± 0,2	Cis epóxido de luteína
24S	1,50 ± 0,02	nd	0,72 ± 0,01	0,73 ± 0,01	60 ± 3	

nd: no detectado. ER: equivalentes de retinol

Fig. 26. Contenido total de carotenoides (expresados como suma de luteína, zeaxantina y β-caroteno) en las bebidas mixtas agrupadas por categoría comercial.



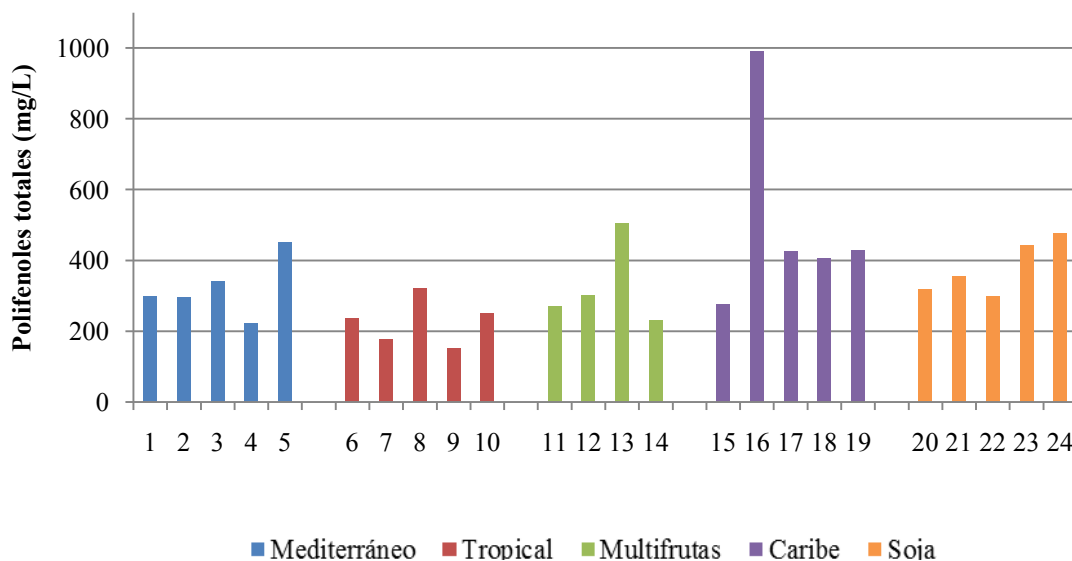
La actividad pro-vitamina A derivada del contenido de  $\beta$ -caroteno en las bebidas comerciales se encontró en un rango muy amplio. El consumo de una ración individual (330 mL) podría aportar hasta un máximo del 15% de la cantidad diaria recomendada: 450–900  $\mu\text{g}/\text{día}$  (FES-NAD, 2010).

### Polifenoles solubles totales

Las concentraciones de polifenoles totales (TPC) en las bebidas refrescantes mixtas comerciales analizadas mostraron una gran variabilidad (152 a 791 mg/L) (Fig. 27). Estos resultados fueron inferiores a los publicados por Zulueta y col., (2007) y Gardner y col. (2000) en bebidas comerciales. Morales de la Peña y col. (2010) encontraron también mayores concentraciones de polifenoles en formulaciones elaboradas mezclando distintas frutas con leche de soja. Este hecho podría estar relacionado con la menor proporción de leche de soja en las muestras comerciales analizadas en esta Tesis.

Los grupos “Mediterráneo”, “Multifrutas” y “Soja” presentaron valores estadísticamente similares ( $p > 0,05$ ). Los niveles más altos de polifenoles se encontraron en las bebidas “Caribe” ( $p < 0,05$ ) y los más bajos en la denominación de “Tropicales” ( $p < 0,05$ ). Esta categoría contaba con los porcentajes más bajos de concentrado de frutas (15,7%), mientras que el grupo “Caribe” constituyó el de las bebidas con mayores porcentajes de concentrado de frutas (15-42,5%). De hecho, la concentración de polifenoles y el porcentaje de concentrado de frutas mostraron una correlación razonable ( $r= 0,425$ ), lo que sugiere que los polifenoles se relacionan principalmente con la cantidad de fruta utilizada y el perfil de frutas empleadas en la elaboración de las bebidas. La naranja, la manzana, la piña, la zanahoria y la uva son frutas responsables de la contribución al elevado contenido de polifenoles totales (Mélo y col., 2006). La pasteurización convencional (90 °C/30 s) del zumo de naranja parece tener efectos insignificantes en los compuestos fenólicos, según concluyen Sentandreu y col. (2007). Las condiciones de tiempo y de almacenamiento tampoco parecen influir significativamente en el perfil de polifenoles de las muestras debido a la inactivación enzimática de la polifenoloxidasas que tiene lugar durante el procesado térmico (Morales de la Peña y col., 2011b).

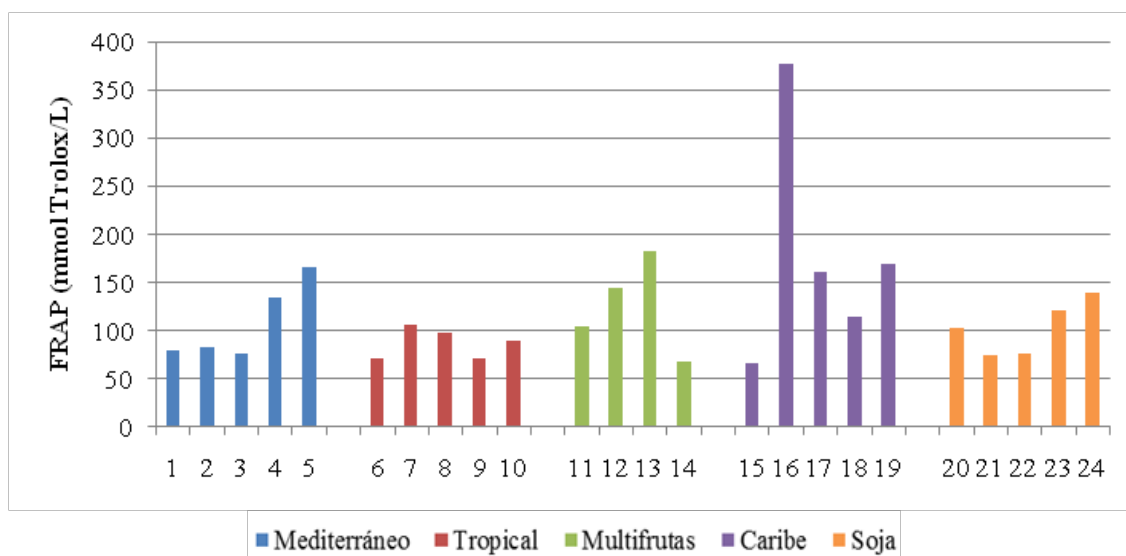
Fig. 27. Contenido total de polifenoles en las bebidas mixtas comerciales agrupadas por categoría comercial.



## Capacidad antioxidante

La actividad antioxidante total de las bebidas refrescantes mixtas medida por el método FRAP y expresada como equivalentes de Trolox viene reflejada en la Figura 28 y en la **Tabla 15**. El valor más alto correspondió a la muestra 16 (Caribe), debido a los elevados niveles de vitamina C y polifenoles totales encontrados (Fig. 28). De hecho, la actividad antioxidante se debió principalmente al ácido ascórbico ( $r= 0,893$ ) y a los polifenoles ( $r= 0,896$ ). Estos datos son concordantes con los hallazgos de *Gardner y col. (2000)* y *Thaipong y col. (2006)* en extractos de guayaba. *Xiaowei y col. (2011)* obtuvieron una importante correlación ( $r= 0,99$ ) entre los polifenoles totales y el FRAP en muestras de mango.

Fig. 28. Capacidad antioxidante medida por el método FRAP en las bebidas mixtas comerciales agrupadas por categoría comercial.



Con el fin de determinar la contribución de compuestos fenólicos a la capacidad antioxidante total de las bebidas mixtas, además del ensayo realizado directamente sobre la bebida, se llevó a cabo un ensayo paralelo de actividad antioxidante FRAP aplicado a los extractos de polifenoles (**Tabla 15**). Se encontró mayor actividad antioxidante en aquellos extractos con mayor contenido de polifenoles ( $r= 0,952$ ). *Gorinstein y col. (2004)* y *Mendiola y col. (2008)* publicaron resultados similares. La presencia de naranja, manzana, piña y zanahoria proporcionan altos niveles de polifenoles, lo que repercute en una mayor capacidad antioxidante según el mecanismo FRAP. Estos datos concuerdan con los trabajos de *Gardner y col. (2000)* y de *Zulueta y col. (2007)*. La diferencia entre los resultados FRAP en las bebidas mixtas y en los extractos polifenólicos sugiere que la capacidad antioxidante total de estas bebidas proviene principalmente de la vitamina C añadida (97,7%) y, en una proporción minoritaria, de los polifenoles (2,3%). *Gardner y col. (2000)* y *Xu y col. (2008)* proporcionaron datos de las contribuciones de ácido ascórbico de entre 65-100% y 48-76%, respectivamente, sobre la capacidad antioxidante total de zumos de cítricos. Según estudios de *Zulueta y col. (2007)* en bebidas de fruta y leche, la actividad antioxidante derivada de la vitamina C es cinco veces mayor que la de los compuestos fenólicos.

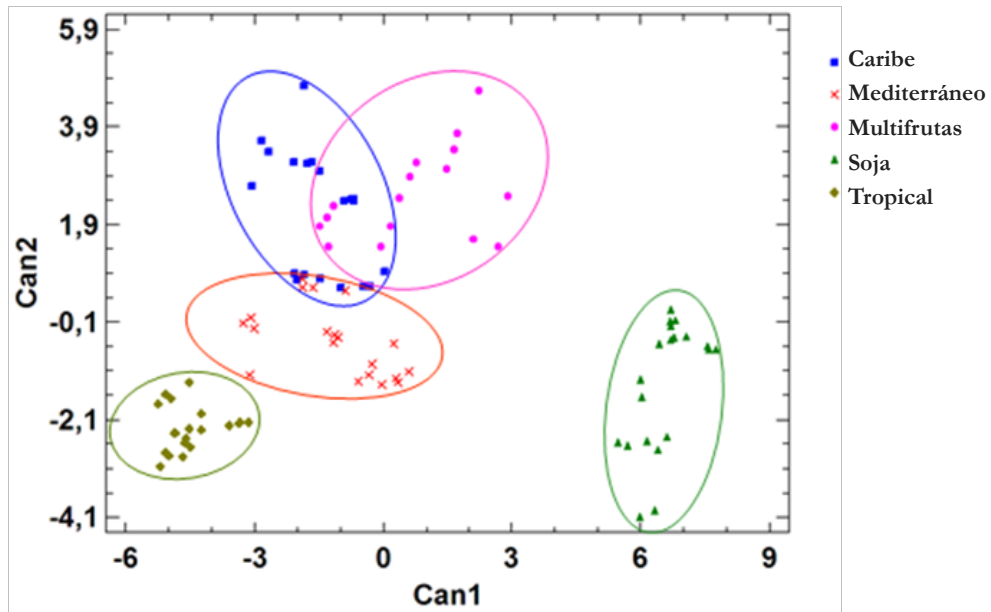
Tabla 15. Actividad antioxidante FRAP (mmoles de equivalentes de Trolox/L) de las bebidas mixtas comerciales y sus correspondientes extractos polifenólicos agrupadas por categoría comercial.

Muestra	Bebidas mixtas	Extractos de polifenoles
1M	78,7 ± 2,8	1,46 ± 0,05
2M	82,3 ± 1,8	2,37 ± 0,27
3M	76,6 ± 2,2	2,99 ± 0,17
4M	135 ± 7,3	0,94 ± 0,09
5M	166 ± 7,6	3,12 ± 0,20
6T	70,8 ± 2,4	1,41 ± 0,11
7T	106 ± 1,9	1,31 ± 0,01
8T	98,5 ± 2,5	2,96 ± 0,03
9T	70,7 ± 2,6	1,33 ± 0,04
10T	89,2 ± 2,3	1,36 ± 0,12
11F	105 ± 1,6	1,81 ± 0,08
12F	144 ± 2,4	2,86 ± 0,16
13F	182 ± 6,4	5,48 ± 0,04
14F	68,4 ± 2,1	1,62 ± 0,02
15C	65,9 ± 1,8	1,77 ± 0,07
16C	377 ± 14	10,2 ± 0,4
17C	161 ± 4,4	3,02 ± 0,16
18C	114 ± 3,9	3,48 ± 0,12
19C	169 ± 2,6	4,13 ± 0,03
20S	103 ± 2,7	2,54 ± 0,05
21S	74,9 ± 4,9	2,35 ± 0,09
22S	77,2 ± 2,4	2,44 ± 0,10
23S	121 ± 2,9	3,10 ± 0,02
24S	140 ± 3,6	3,28 ± 0,03

Categorías comerciales: Mediterráneo (M, 1-5), Tropical (T, 6-10), Multifrutas (F, 11-14), Caribe (C, 15-19) y Soja (S, 20-24).

El análisis discriminante lineal aplicado a los atributos sensoriales y compuestos bioactivos mostró que la primera y segunda variables canónicas fueron las más satisfactorias para discriminar entre las muestras agrupadas por denominaciones comerciales. Los coeficientes más altos para la primera la variable canónica fueron L\* (0,8737), b\* (0,6229), a\* (0,8798) y pH (0,4995), mientras que los parámetros que contribuyeron más a la segunda variable canónica fueron el ácido ascórbico (0,8026), los polifenoles (0,7141) y la capacidad antioxidante (0,8479; 0,7883). La **Figura 29** ilustra la distribución de todas las muestras en un gráfico de dispersión cuyos ejes son las dos variables canónicas principales. Las muestras procedentes de los grupos “Soja” y “Tropical” se clasificaron correctamente (100%) en función de su denominación establecida *a priori* como denominación comercial. Sin embargo, las muestras asignadas a los grupos “Multifruta”, “Caribe” y “Mediterráneo” proporcionaron unos porcentajes de clasificación claramente más bajos, como se refleja en el gráfico.

Fig. 29. Gráfico de dispersión de las dos principales variables canónicas.



## 2. Efecto de los tratamientos y el almacenamiento de una bebida tipo *smoothie*

Los aspectos relativos a esta segunda parte de la Tesis Doctoral están tratados en las publicaciones P-4, P-5 y P-6, siguiendo el mismo orden que en el caso de las muestras comerciales: aspectos generales, nutricionales, sensoriales y funcionales. En este caso se aborda también un bloque adicional relativo a aspectos microbiológicos.

### 2.1. Parámetros generales

Los resultados de los parámetros generales corresponden a la publicación n° 5, excepto en el caso del color, donde se remite a la publicación n° 4 para los *smoothies* elaborados con leche y a la n° 6 en el caso de los elaborados con soja.

#### pH

El pH de los *smoothies* fue algo menos ácido que el obtenido en las muestras comerciales, situándose en 4,24 para el preparado con leche y 4,28 para el correspondiente con soja (Tabla 16). Los resultados fueron concordantes con las puntuaciones de acidez ligeramente superiores obtenidas en la cata. *Bull y col. (2004)* presentaron valores similares en zumo de naranja. Tanto el tratamiento térmico (80 °C/3 min) como las altas presiones (450-650 MPa/20 °C/3 min) no condujeron a cambios significativos en el pH y aunque los valores disminuyeron hacia pH más ácidos a lo largo del almacenamiento, la diferencia (0,1 unidades de pH) puede considerarse insignificante desde un punto de vista práctico. *Sampedro y col. (2009)* detectaron un descenso en el pH en zumo de naranja y leche posiblemente debido a la formación de ácido láctico como resultado del crecimiento microbiano.

#### Acidez

La acidez titulable medida en las bebidas de tipo *smoothie* fue mayor en la formulación elaborada a base de leche (3,3 mg ácido cítrico/L) que en la correspondiente de soja (2,7 mg ácido cítrico/L) (**Tabla 16**), lo cual concuerda con los resultados del atributo “acidez” del análisis sensorial (apartado 2.3). No se encontraron diferencias significativas tras ninguno de los tratamientos aplicados (pasteurización o altas presiones). Al final del período de almacenamiento se observó un aumento en el valor de acidez, situándose en torno a 3,7 mg/L en las muestras tratadas y no tratadas de ambos tipos de *smoothie* (soja y leche), lo que coincide con los valores de pH obtenidos.

Tabla 16. Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre los parámetros fisicoquímicos (pH, acidez, densidad y sólidos solubles totales) de los *smoothies*.

		Smoothie con leche				
	Tiempo	Control	TP	HPP-450	HPP-600	Sig <sup>1</sup>
pH	Inicial	4,24 ± 0,01	4,25 ± 0,01	4,25 ± 0,01	4,25 ± 0,01	ns
	Final <sup>3</sup>	4,17 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,14 ± 0,01 <sup>b</sup>	*
	Sig <sup>2</sup>	***	***	***	***	
Acidez (g/L)	Inicial	3,3 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,2 ± 0,1	ns
	Final <sup>3</sup>	3,7 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,7 ± 0,1	ns
	Sig <sup>2</sup>	**	**	**	**	
Densidad (g/mL)	Inicial	1,05 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,04 ± 0,01	1,05 ± 0,01	ns
	Final <sup>3</sup>	1,03 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,04 ± 0,01 <sup>ab</sup>	*
	Sig <sup>2</sup>	ns	*	ns	ns	
TSS (°Brix)	Inicial	12,03 ± 0,05	12,00 ± 0,01	12,00 ± 0,01	12,00 ± 0,01	ns
	Final <sup>3</sup>	11,60 ± 0,01	11,90 ± 0,12	12,28 ± 0,10	12,28 ± 0,10	ns
	Sig <sup>2</sup>	***	ns	***	***	

		Smoothie con soja				
	Tiempo	Control	TP	HPP-550	HPP-650	Sig <sup>1</sup>
pH	Inicial	4,28 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,29 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,29 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	*
	Final <sup>3</sup>	4,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,16 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,15 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	*
	Sig <sup>2</sup>	***	***	***	***	
Acidez (g/L)	Inicial	2,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	***
	Final <sup>3</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	*
	Sig <sup>2</sup>	***	*	**	ns	
Densidad (g/mL)	Inicial	1,05 ± 0,01	1,04 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,05 ± 0,01	ns
	Final <sup>3</sup>	1,03 ± 0,01	1,03 ± 0,01	1,05 ± 0,01	1,04 ± 0,01	ns
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns	
TSS (°Brix)	Inicial	11,93 ± 0,05 <sup>a</sup>	11,98 ± 0,10 <sup>a</sup>	11,83 ± 0,05 <sup>b</sup>	11,88 ± 0,05 <sup>b</sup>	*
	Final <sup>3</sup>	11,20 ± 0,08 <sup>a</sup>	11,95 ± 0,06 <sup>b</sup>	12,05 ± 0,06 <sup>b</sup>	11,85 ± 0,13 <sup>b</sup>	***
	Sig <sup>2</sup>	***	ns	**	ns	

ANOVA unifactorial: Sig<sup>1</sup> (tipo de tratamiento), Sig<sup>2</sup> (tiempo de almacenamiento). \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), ns (no significativo). Las letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). Final<sup>3</sup> en Control: 30 días; Final<sup>3</sup> en TP y HPP: 45 días.

## Densidad

La densidad fue muy similar en ambos tipos de *smoothie* (soja y leche), estableciéndose en 1,05 g/mL (Tabla 16). La aplicación de los distintos tratamientos no ejerció influencia en este parámetro, lo que coincide con los resultados de otros autores en zumo de naranja (Sánchez-Moreno y col., 2005); en bebidas mixtas a base de naranja y leche (Barba y col., 2012), y en zumo de naranja, limón y zanahoria (Fernández-García y col., 2001). El almacenamiento tampoco afectó al valor de densidad de las muestras analizadas.

### Sólidos solubles totales (°Brix)

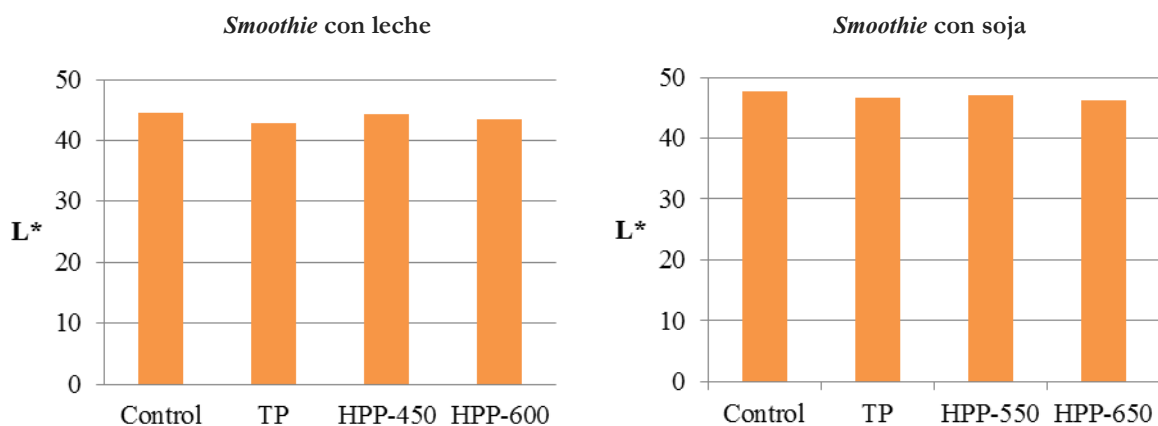
El contenido en sólidos solubles, expresados como °Brix, (**Tabla 16**) fue ligeramente superior en el *smoothie* elaborado con leche (12,03) que en el preparado con soja (11,93), lo que respalda los resultados alcanzados para el resultado de azúcares totales (apartado 2.2) y los obtenidos para el atributo “dulzor” en el análisis sensorial (apartado 3.2). Al igual que ocurría con los parámetros anteriores, los distintos tratamientos de conservación aplicados no dieron lugar a cambios significativos en los resultados de °Brix. Durante el almacenamiento se observó una disminución significativa en las muestras no tratadas (6%) y mayor estabilidad en las tratadas. *Sampedro y col. (2009)* atribuyeron el descenso en los valores de °Brix en un zumo de naranja y leche a la fermentación de azúcares como resultado del crecimiento microbiano. En nuestro caso en las muestras procesadas, tanto por tratamiento térmico como por HP, no se observó en ningún momento tal descenso, lo que es indicativo del mantenimiento de calidad.

La estabilidad de los parámetros generales aludidos en las muestras tratadas por altas presiones coincide con los resultados indicados en la bibliografía. Así, *Landl y col., (2010)* no encontraron cambios significativos para °Brix, pH y acidez en un puré de manzana tratado por altas presiones (400 MPa y 600 MPa/5 min/20 °C) y por tratamiento térmico (75 °C/10 min) y almacenado durante 21 días a 5 °C.

### Color

El parámetro CIE L\* dio un valor medio de 44,49 en los *smoothies* elaborados con leche y de 47,76 en los de soja. En ambos casos el tratamiento térmico condujo a una disminución significativa en la luminosidad de las muestras, del 3,8% en el primer tipo y del 2,5% en el segundo tipo de *smoothie* (**Fig. 30**). Con respecto a las altas presiones, la aplicación de 450 MPa no dio lugar a cambios significativos para este parámetro; sin embargo, presiones superiores (550, 600 y 650 MPa) sí afectaron moderadamente a la luminosidad, tanto más cuanto mayor fue la presión aplicada, observándose disminuciones del 1,4%, el 2,1% y el 3,3%, respectivamente, en comparación con el equivalente *smoothie* no tratado.

Fig. 30. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre L\* en los *smoothies*.

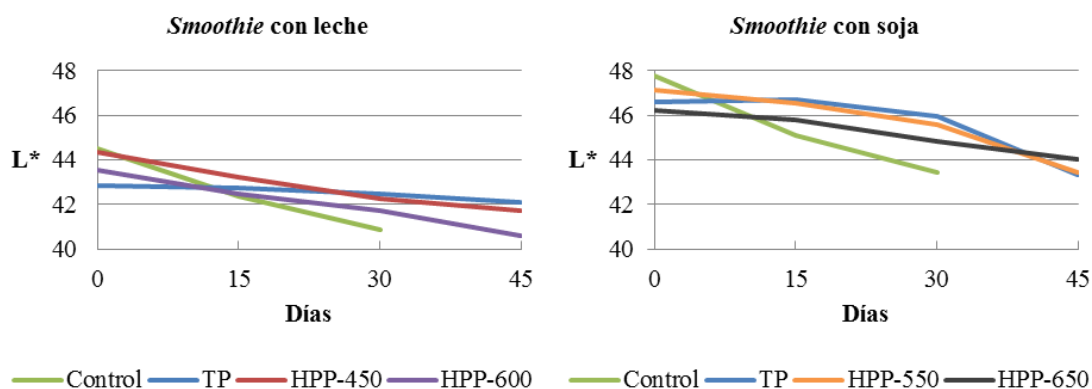


La disminución de luminosidad en los *smoothies* con leche presurizados puede atribuirse a la desintegración de las micelas de caseína en pequeños fragmentos que aumentan la translucidez de la leche, tal como explican *Kim y col. (2008)*. Otros autores como *Barba y col. (2012)* en

zumos de naranja mezclados con leche observaron una relación inversa entre el incremento de la presión y la disminución de la luminosidad. *Poliseli-Scopel y col. (2013)* en su estudio sobre leche de soja encontraron que los tratamientos de altas presiones (200 MPa, 55 y 75 °C) suponían una disminución significativa en  $L^*$ , lo que indicaba un ligero oscurecimiento en comparación con el respectivo producto fresco. *Patras y col. (2009b)* observaron una disminución de  $L^*$  en purés de zanahoria tratados por HP (500 MPa) en comparación con las muestras no tratadas. El aumento de la degradación del color se asocia a menudo con el tratamiento térmico, ya que éste promueve la formación de productos de degradación que afectan a este parámetro (*Sadilova y col., 2009*). Los cambios de luminosidad en el procesado térmico, según indican *Zheng y col. (2014)* en zumo de lichi tratado a 95 °C/1 min, se podrían atribuir a la agregación de proteínas y fibra de la pulpa.

Durante el período de almacenamiento, se observó una disminución progresiva y significativa ( $p < 0,001$ ) en las muestras sin tratar (**Fig. 31**), con pérdidas del 8,1% (*smoothie* con leche) y 9,0% (*smoothie* con soja) al final de su vida útil (30 días). En el caso de las muestras tratadas, la luminosidad se mantuvo más estable durante un mayor período de tiempo que en los productos control. Así, las muestras tratadas térmicamente se mantuvieron constantes y las sometidas a altas presiones mostraron una ligera disminución gradual que osciló entre 4,8 y 7,7% ( $p < 0,05$ ) al final del período estudiado. Esto concuerda con los datos aportados por *Cao y col. (2012)* en zumo de fresa tratado a 600 MPa durante 4 min y almacenado durante 2 meses a 4° C.

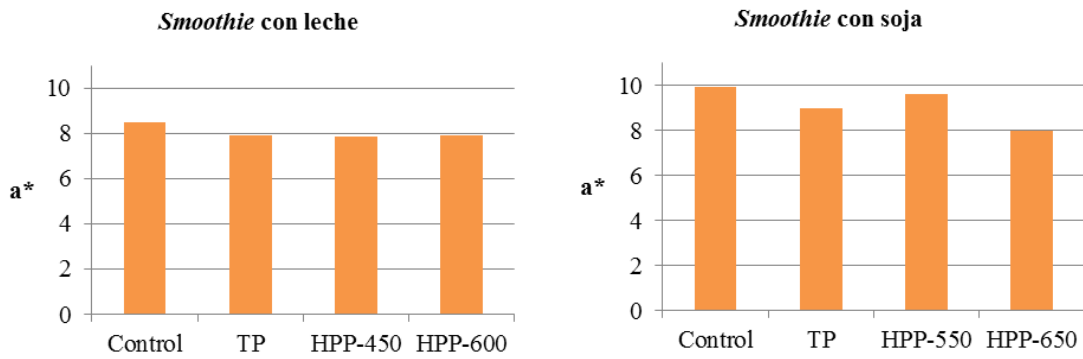
Fig. 31. Evolución de  $L^*$  en los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.



En relación al parámetro CIE  $a^*$  (**Fig. 32**), la comparación entre tratamientos en los *smoothies* elaborados con leche dio como resultado una disminución en torno al 7% ( $p < 0,05$ ) tanto en las bebidas pasteurizadas como en las presurizadas con respecto al correspondiente no tratado ( $a^* = 8,49$ ). Las bebidas con adición de soja mostraron igualmente un comportamiento de disminución significativa ( $p < 0,001$ ) para el tratamiento térmico y HPP-650, si bien la aplicación de presiones de menor intensidad (550 MPa) no derivó en cambios significativos con respecto a dicha bebida antes de ser tratada ( $a^* = 9,93$ ). Las diferencias en el comportamiento de  $a^*$  en las muestras HPP podrían estar influidas por la intensidad de presión, tal como sugieren *Zhang y col. (2011)* en su ensayo realizado en zumo de sandía sometido a altas presiones. La tendencia a la disminución en el valor de  $a^*$  en muestras tratadas por alta presión hidrostática ha sido descrito también por *Patras y col. (2009)* en purés de fresa y mora, *Varela-Santos y col. (2012)* en zumo de granada (350-550 MPa), *Zhou y col. (2014)* en calabaza

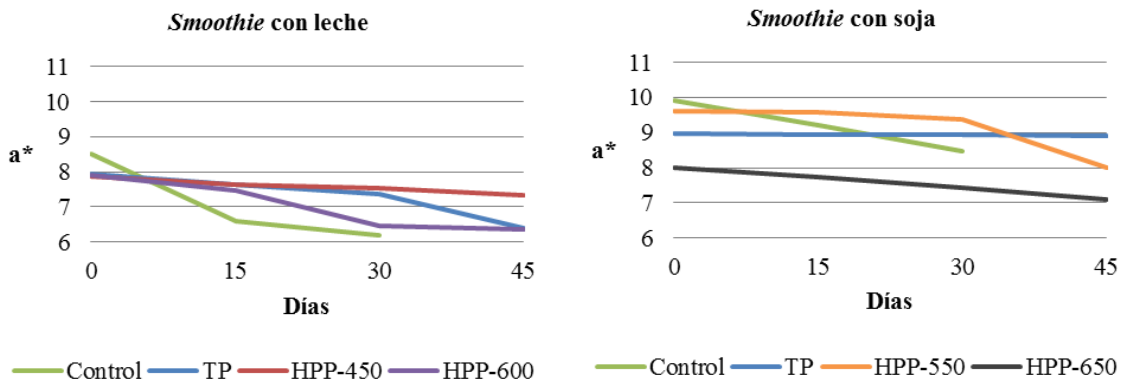
(450 MPa/15 min y 550 MPa/10 min) y *Vega-Gálvez y col. (2014)* en pulpa de grosella (300-500 MPa/1 a 5 min). La pérdida de tonalidad rojiza ( $a^*$ ) puede ser debida a la actividad residual de enzimas que puedan inducir al pardeamiento enzimático de los compuestos fenólicos (*Huang y col., 2013*). Autores como *Li y col. (2015)* apoyan este argumento al detectar la persistencia de la actividad de la polifenoloxidasa después de aplicar presiones de 550 MPa/10 min en batidos de plátano.

Fig. 32. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre  $a^*$  en los *smoothies*.



Al final de la vida útil de los *smoothies* no tratados elaborados con leche y soja (30 días), se observó una reducción considerable en los valores de  $a^*$ : 27% y 15% respectivamente (**Fig. 33**). En relación a las muestras tratadas, con un período de almacenamiento superior (45 días) se observaron grandes variaciones en función de la matriz, produciéndose disminuciones superiores en los *smoothies* preparados con leche. Así, en muestras pasteurizadas, las pérdidas fueron de 19% en los *smoothies* con leche y tan sólo del 1% en las bebidas con soja. En las muestras presurizadas las pérdidas oscilaron entre el 7% (450 MPa) y el 19% (600 MPa) para los *smoothies* con leche y fueron más discretas pero significativas en las bebidas con soja, observándose en cualquier caso una mayor retención de color rojo con menores intensidades de presión. *Barba y col. (2012)* también encontraron una disminución significativa de  $a^*$  en un zumo de naranja y leche tratado térmicamente en comparación con el equivalente fresco. De acuerdo con la bibliografía, la pérdida del tono rojizo puede ser debida a la actividad residual de enzimas oxidativas responsables de deterioro en el color (*Chakraborty y col., 2015*). *Poliseli-Scopel y col. (2013)* describieron una tendencia similar en leche de soja sometida a pasteurización y HPP.

Fig. 33. Evolución de  $a^*$  en los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.



En relación al parámetro  $b^*$  se observó un comportamiento diferente en función del tipo de *smoothie* (Fig. 34). Así, los procesos de pasteurización y de altas presiones (450 y 600 MPa) no derivaron en cambios significativos en los *smoothies* elaborados con leche. Sin embargo, en los formulados con soja el tratamiento HP causó una disminución significativa ( $p < 0,001$ ), aunque poco relevante a efectos prácticos, en el valor de  $b^*$  (4,4% HP-550 y 5,1% HP-650) en comparación con el *smoothie* sin procesar (25,97). Esta tendencia fue más pronunciada en el caso del *smoothie* pasteurizado (22,60). En cualquier caso las altas presiones hidrostáticas aplicadas condujeron a buenos resultados en ambos tipos de formulaciones con respecto a la retención de la tonalidad amarilla. La bibliografía en este sentido es controvertida, encontrándose distintas tendencias según los autores. Así, *Amador-Espejo y col. (2014)* no encontraron diferencias significativas para CIE  $b^*$  en muestras de leche UHT (138 °C/5 s) y HPP (200-300 MPa/55-85 °C) respecto a la misma muestra no procesada. Por su parte, *Poliseli-Scopel y col. (2013)* detectaron una disminución significativa en los valores de amarillo-azul en una muestra de leche de soja tratada por alta presión.

El almacenamiento a 4 °C afectó en menor medida a las muestras sometidas a alta presión en relación a las tratadas térmicamente, sobre todo cuando se aplicaron menores intensidades de presión (Fig. 35). De este modo, el parámetro  $b^*$  se mantuvo constante en los *smoothies* tratados a 450 y 550 MPa. La aplicación de 600 y 650 MPa resultó más drástica en este sentido ya que se observó una disminución significativa tras la primera quincena de almacenamiento. Los efectos del almacenamiento sobre las muestras pasteurizadas fueron similares a los obtenidos con las condiciones de presión intermedias (550 y 600 MPa). La disminución en el parámetro  $a^*$  fue más notable que en el parámetro  $b^*$ . De las variaciones encontradas se desprende que los *smoothies* tratados tienden más hacia el naranja y menos hacia el rojo, en comparación con el *smoothie* sin tratar conforme transcurre el tiempo.

Fig. 34. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre  $b^*$  en los *smoothies*.

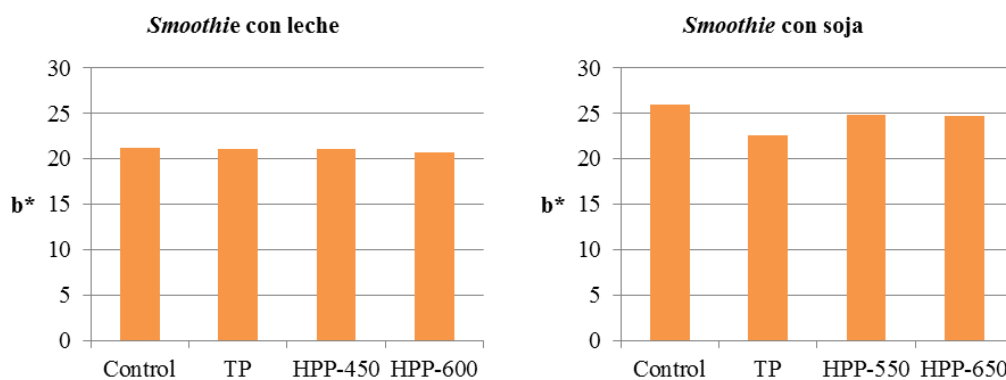
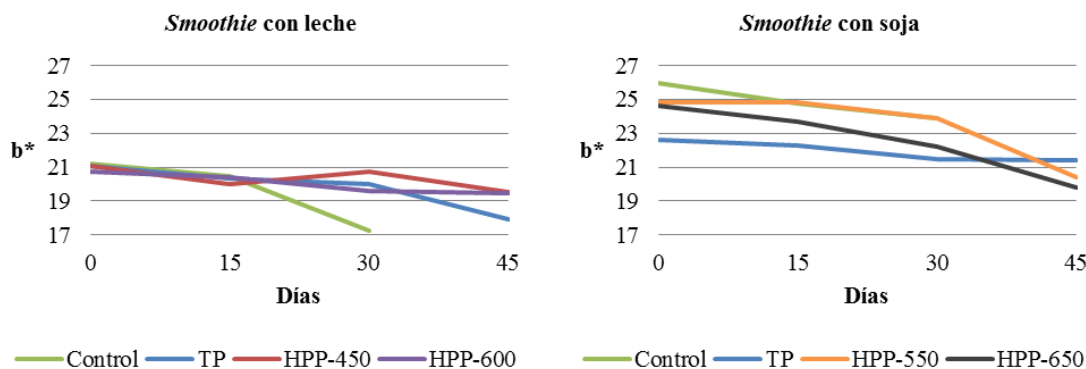


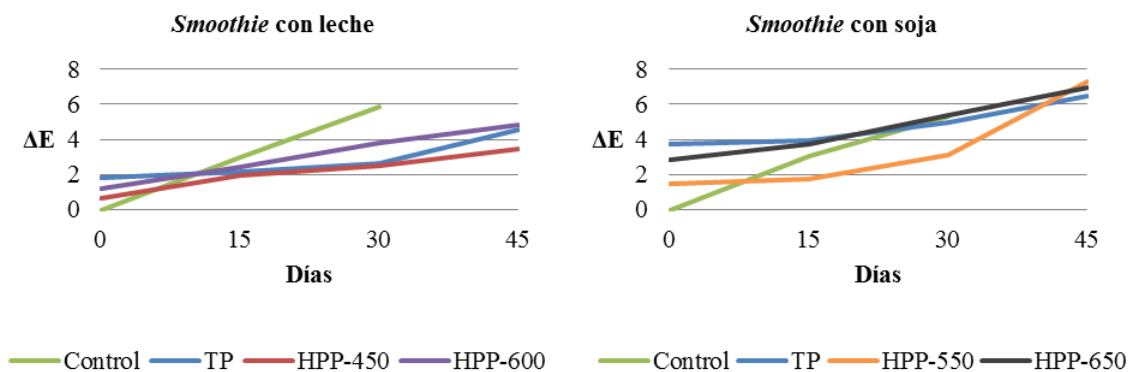
Fig. 35. Evolución de  $b^*$  en los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.



En los *smoothies* se calcularon también las diferencias de color ( $\Delta E$ ), magnitud que a partir de una fórmula matemática donde intervienen los tres parámetros CIE Lab, permite aproximar las variaciones objetivas de color entre las muestras procesadas y no procesadas a la apreciación visual de las mismas. Estas diferencias pueden clasificarse analíticamente como no perceptibles (0-0,5), ligeramente perceptibles (0,5-1,5), notables (1,5-3,0), visibles (3,0-6,0) y evidentes (6,0-12,0) de acuerdo a la clasificación de *Cserhalmi y col. (2006)*. Las bebidas sometidas a tratamiento térmico condujeron a modificaciones de color sensiblemente superiores a las presurizadas, acusándose un cambio notable en el *smoothie* pasteurizado elaborado con leche ( $\Delta E= 1,79$ ) y visible en el caso de la elaboración con soja ( $\Delta E= 3,70$ ). Respecto a las muestras tratadas por alta presión los cambios fueron ligeramente perceptibles ( $\Delta E$  entre 0,68 y 1,44) para las condiciones más suaves. En las muestras sometidas a mayores intensidades de presión (650 MPa), las diferencias de color fueron notables ( $\Delta E= 2,82$ ). Esto sugiere el mejor mantenimiento de color del producto fresco mediante el tratamiento HP frente al tratamiento térmico. Este comportamiento coincide con lo reflejado por *Polydera y col. (2005)* en zumo de naranja y por *Zhang y col. (2011)* en zumo de sandía. *Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas (2004)* también demostraron la buena estabilidad de color y la mayor vida útil en puré de melocotón tratado a 500 MPa/5 min y almacenado a 3 °C.

Independientemente del tratamiento, se ha observado un aumento en la diferencia de color total con el tiempo de almacenamiento (**Fig. 36**) atribuible a la afectación de los compuestos responsables del color de las frutas por una inactivación incompleta de las enzimas y por la acción de microorganismos, lo que da lugar a reacciones químicas indeseables en la matriz (*Oey y col., 2008b; Vega-Gálvez y col., 2012; Wang y col., 2012*).

**Fig. 36.** Evolución de las diferencias de color ( $\Delta E$ ) en los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.



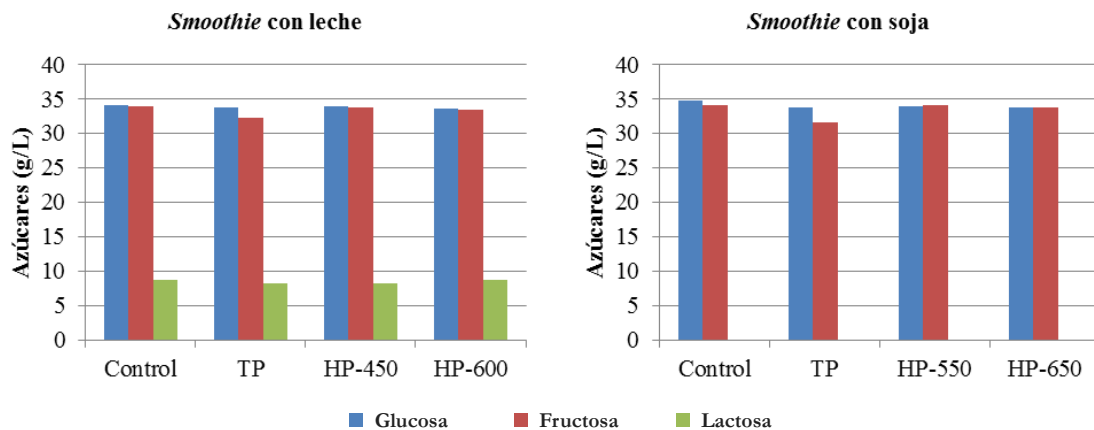
## 2.2. Parámetros nutricionales

### Azúcares

Las concentraciones de glucosa y fructosa en los *smoothies* no tratados fueron 34,1 y 33,9 g/L, respectivamente, para el producto elaborado con leche y 34,7 y 34,1 g/L para el correspondiente de soja (**Fig. 37** y **Tabla 17**). La relación glucosa:fructosa fue de 1:1 en ambos casos. No se detectó sacarosa, posiblemente debido a la actividad enzimática de la papaya-invertasa, una enzima de tipo  $\beta$ -fructofuranósido que cataliza la conversión de sacarosa (*Abu-Goukh y col., 2010*). La lactosa se encontró sólo en los *smoothies* elaborados con leche en una concentración de 8,8 g/L. De acuerdo con la revisión efectuada por *Barba y col. (2012b)* sobre los efectos

de las altas presiones sobre la leche, las diferentes condiciones de presurización o de tiempo no incurren en ningún tipo de degradación sobre la lactosa, lo que sugiere que no tiene lugar la reacción de Maillard o la isomerización de lactosa. En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en la composición de azúcares después de los tratamientos térmicos y de presión. Estos resultados coinciden con los de *Vervoort y col. (2011)* en zumo de naranja, y *Barba y col. (2012)* en zumos de arándano, uva, naranja, manzana, zanahoria y tomate.

Fig. 37. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en azúcares de los *smoothies*.



La evolución de la glucosa, la fructosa (y lactosa en su caso) durante el almacenamiento de los *smoothies* no tratados mostró una disminución significativa tras 30 días a 4 °C, lo que puede atribuirse a la proliferación de microorganismos (**Tabla 17**). En el caso de las muestras tratadas, no se encontraron diferencias significativas en el perfil de azúcares después de 45 días en comparación con los valores iniciales. Estos resultados coinciden con los de *Fernández-García y col. (2001)* en un zumo de naranja, limón y zanahoria tratado a 500 MPa/5 min después de 21 días de almacenamiento a 4 °C donde tampoco hallaron cambios significativos en la glucosa, fructosa y sacarosa.

Tabla 17. Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de azúcares solubles (g/L) de los *smoothies*.

		Smoothie con leche				
	Tiempo	Control	TP	HP-450	HP-600	Sig <sup>1</sup>
Glucosa	Inicial	34,1 ± 0,5	33,7 ± 0,9	33,9 ± 0,7	33,6 ± 0,8	ns
	Final <sup>3</sup>	30,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	33,3 ± 0,4 <sup>b</sup>	33,6 ± 1,0 <sup>b</sup>	33,2 ± 0,6 <sup>b</sup>	***
	Sig <sup>2</sup>	***	ns	ns	ns	
Fructosa	Inicial	33,9 ± 0,5	32,3 ± 0,5	33,8 ± 1,6	33,5 ± 0,4	ns
	Final <sup>3</sup>	31,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	31,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	33,7 ± 0,4 <sup>b</sup>	33,3 ± 0,6 <sup>c</sup>	**
	Sig <sup>2</sup>	***	ns	ns	ns	
Lactosa	Inicial	8,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	8,2 ± 0,4 <sup>b</sup>	8,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	**
	Final <sup>3</sup>	8,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,3 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,4 <sup>b</sup>	*
	Sig <sup>2</sup>	**	ns	ns	ns	

	Tiempo	Smoothie con soja				Sig <sup>1</sup>
		Control	TP	HP-550	HP-650	
Glucosa	Inicial	34,7 ± 0,8	33,7 ± 1,0	34,0 ± 0,7	33,8 ± 0,7	ns
	Final <sup>3</sup>	30,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	31,9 ± 1,2 <sup>b</sup>	33,2 ± 1,2 <sup>c</sup>	33,5 ± 0,5 <sup>c</sup>	**
	Sig <sup>2</sup>	***	ns	ns	ns	
Fructosa	Inicial	34,1 ± 0,5 <sup>ab</sup>	31,6 ± 1,0 <sup>c</sup>	34,1 ± 1,0 <sup>b</sup>	33,7 ± 0,9 <sup>d</sup>	***
	Final <sup>3</sup>	30,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	30,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	33,6 ± 0,7 <sup>b</sup>	32,3 ± 0,7 <sup>c</sup>	***
	Sig <sup>2</sup>	***	ns	ns	*	
Lactosa	Inicial	-	-	-	-	
	Final <sup>3</sup>	-	-	-	-	
	Sig <sup>2</sup>					

ANOVA unifactorial: Sig<sup>1</sup> (tipo de tratamiento), Sig<sup>2</sup> (tiempo de almacenamiento). \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), ns (no significativo). Las letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). Final<sup>3</sup> en Control: 30 días; Final<sup>3</sup> en TP y HPP: 45 días.

### Ácidos orgánicos

Los ácidos cítrico y L-málico fueron los predominantes en los *smoothies*, con concentraciones de 2,42 y 1,51 g/L para el preparado con leche y 2,45 y 1,48 g/L para la formulación con soja, respectivamente (Fig. 38 y Tabla 18). Estos valores son del mismo orden que los obtenidos en las muestras comerciales descritas en la primera parte de la discusión. Los ácidos tartárico, oxálico y quínico se encontraron en concentraciones mucho más bajas, por debajo de los 70 mg/L en ambos tipos de *smoothies*. El contenido de ácido cítrico aumentó ligeramente y de manera significativa después de la pasteurización y la alta presión a 450 y 550 MPa, mientras que el ácido málico se mantuvo estable después de los tratamientos.

El período de almacenamiento no afectó significativamente al contenido de ácidos orgánicos en ninguna de las muestras tratadas estudiadas (Tabla 18). Existe poca bibliografía en relación al comportamiento de los ácidos orgánicos después del tratamiento de alta presión y durante el almacenamiento. Zheng y col. (2014) detectaron cambios significativos en el contenido de ácidos orgánicos en zumo de litchi tratado térmicamente (95 °C/1 min) y por presión (500 MPa/2 min/25 °C). Rbandawa y col. (2014) en su trabajo sobre zumos de cítricos observaron una disminución en el contenido de ácido cítrico y un incremento en el contenido de ácido málico durante todo el período de almacenamiento en refrigeración.

Fig. 38. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en ácidos cítrico y L-málico de los *smoothies*.

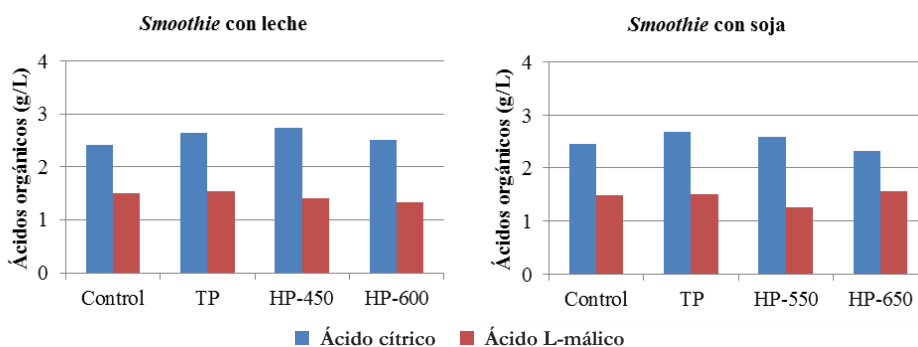


Tabla 18. Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de ácidos orgánicos (mg/L) de los *smoothies*.

		Smoothie con leche				
	Tiempo	Control	TP	HP-450	HP-600	Sig <sup>1</sup>
<b>Cítrico</b>	<b>Inicial</b>	2416 ± 99 <sup>a</sup>	2645 ± 33 <sup>b</sup>	2735 ± 98 <sup>b</sup>	2512 ± 53 <sup>a</sup>	**
	<b>Final<sup>3</sup></b>	2387 ± 61 <sup>a</sup>	2619 ± 78 <sup>b</sup>	2728 ± 46 <sup>b</sup>	2456 ± 70 <sup>a</sup>	***
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	ns	ns	ns	
<b>L-Málico</b>	<b>Inicial</b>	1511 ± 38	1533 ± 82	1402 ± 72	1334 ± 52	ns
	<b>Final<sup>3</sup></b>	1554 ± 99	1570 ± 50	1494 ± 68	1517 ± 67	ns
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	ns	ns	ns	
<b>Tartárico</b>	<b>Inicial</b>	41 ± 5	42 ± 3	44 ± 1	40 ± 4	ns
	<b>Final<sup>3</sup></b>	42 ± 5	44 ± 2	44 ± 1	44 ± 1	ns
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	ns	ns	ns	
<b>Oxálico</b>	<b>Inicial</b>	39 ± 3 <sup>a</sup>	40 ± 1 <sup>b</sup>	39 ± 1 <sup>b</sup>	34 ± 1 <sup>c</sup>	***
	<b>Final<sup>3</sup></b>	32 ± 4 <sup>a</sup>	38 ± 2 <sup>b</sup>	33 ± 2 <sup>a</sup>	33 ± 1 <sup>a</sup>	*
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	***	Ns	***	ns	
<b>Quínico</b>	<b>Inicial</b>	69 ± 1 <sup>a</sup>	70 ± 1 <sup>a</sup>	76 ± 1 <sup>b</sup>	62 ± 2 <sup>c</sup>	***
	<b>Final<sup>3</sup></b>	66 ± 2 <sup>a</sup>	72 ± 2 <sup>b</sup>	73 ± 2 <sup>b</sup>	61 ± 2 <sup>c</sup>	***
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	ns	ns	ns	

		Smoothie con soja				
	Tiempo	Control	TP	HP-550	HP-650	Sig <sup>1</sup>
<b>Cítrico</b>	<b>Inicial</b>	2451 ± 32 <sup>a</sup>	2684 ± 45 <sup>b</sup>	2582 ± 57 <sup>c</sup>	2329 ± 97 <sup>a</sup>	***
	<b>Final<sup>3</sup></b>	2493 ± 96 <sup>a</sup>	2671 ± 74 <sup>c</sup>	2640 ± 95 <sup>b</sup>	2520 ± 86 <sup>ab</sup>	***
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	ns	ns	ns	
<b>L-Málico</b>	<b>Inicial</b>	1483 ± 37 <sup>a</sup>	1512 ± 67 <sup>a</sup>	1256 ± 66 <sup>b</sup>	1552 ± 60 <sup>b</sup>	**
	<b>Final<sup>3</sup></b>	1452 ± 40 <sup>a</sup>	1586 ± 74 <sup>b</sup>	1372 ± 50 <sup>c</sup>	1500 ± 68 <sup>a</sup>	***
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	ns	ns	ns	
<b>Tartárico</b>	<b>Inicial</b>	43 ± 4	46 ± 2	47 ± 1	43 ± 3	ns
	<b>Final<sup>3</sup></b>	45 ± 5	47 ± 2	45 ± 2	44 ± 1	ns
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	ns	ns	ns	
<b>Oxálico</b>	<b>Inicial</b>	33 ± 1 <sup>a</sup>	37 ± 1 <sup>b</sup>	38 ± 1 <sup>b</sup>	32 ± 1 <sup>a</sup>	***
	<b>Final<sup>3</sup></b>	35 ± 2 <sup>a</sup>	34 ± 2 <sup>a</sup>	31 ± 1 <sup>b</sup>	29 ± 2 <sup>b</sup>	***
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	*	**	ns	
<b>Quínico</b>	<b>Inicial</b>	63 ± 2 <sup>a</sup>	77 ± 2 <sup>b</sup>	60 ± 1 <sup>a</sup>	58 ± 4 <sup>a</sup>	***
	<b>Final<sup>3</sup></b>	63 ± 2 <sup>a</sup>	78 ± 2 <sup>b</sup>	60 ± 3 <sup>c</sup>	57 ± 3 <sup>c</sup>	***
	<b>Sig<sup>2</sup></b>	ns	ns	ns	ns	

ANOVA unifactorial: Sig<sup>1</sup> (tipo de tratamiento), Sig<sup>2</sup> (tiempo de almacenamiento). \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), ns (no significativo). Las letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). Final<sup>3</sup> en Control: 30 días; Final<sup>3</sup> en TP y HPP: 45 días.

## Elementos minerales

Las concentraciones para cada elemento mineral se encuentran agrupadas en la **Tabla 19**.

### Macroelementos

En relación a los *smoothies* control, el potasio fue el macroelemento principal tanto en el elaborado con leche (2022 mg/L) como en el adicionado de soja (1800 mg/L). Su procedencia se debe a las frutas utilizadas, principalmente la naranja, por la mayor proporción de esta fruta utilizada en la elaboración (50%); si bien los datos de las tablas de composición *Souci y col. (2008)* reflejan que las zanahorias y el melón son más ricos en este elemento, contribuyendo también de manera significativa a pesar de ser ingredientes de menor peso en las bebidas.

Dentro de los macroelementos, el magnesio fue el minoritario, presentando valores similares en ambos tipos de bebidas: 108 mg/L (*smoothie* con leche) y 110 mg/L (*smoothie* con soja). La papaya es el ingrediente con mayor contenido de este mineral.

Los valores de sodio también fueron muy similares entre sí: 229 y 205 mg/L para los *smoothies* con leche y soja, respectivamente. Ambos tipos de *smoothies* podrían etiquetarse con la mención “muy bajo en sodio” de acuerdo al *Reglamento CE n° 1924/2006 de propiedades saludables y alegaciones nutricionales en alimentos*.

No hubo diferencias significativas entre los resultados de calcio (184 y 175 mg/L entre ambas clases de *smoothies*, lo que puede deberse al enriquecimiento en calcio de la leche de soja utilizada.

### Microelementos esenciales y elementos tóxicos

El zinc fue el microelemento predominante en las dos variantes de *smoothies* estudiadas: leche y soja, con valores de 1175 y 1113 µg/L, respectivamente. Su presencia se debió principalmente a la incorporación de zanahoria como ingrediente (*Souci y col., 2008*). Las muestras de soja mostraron mayor contenido de hierro (1232 µg/L) que las de leche (931 µg/L), lo que concuerda con los datos reflejados por *Souci y col. (2008)* para la soja y la leche de vaca. Se podría aplicar la misma justificación a los datos más elevados detectados para el manganeso y el cobre en los *smoothies* de soja.

Los niveles de los metales pesados analizados en los *smoothies*, plomo y cadmio, se mantuvieron por debajo de sus límites de detección (20 y 10 µg/Kg, respectivamente), hecho positivo desde el punto de vista de la seguridad alimentaria de estos productos, por la toxicidad que entraña la ingesta de dichos metales.

Ni el procedimiento térmico ni las altas presiones afectaron significativamente al contenido mineral de los *smoothies*. El almacenamiento en refrigeración tampoco produjo cambios notables en el perfil mineral, como era de esperar dadas las condiciones aplicadas, lo que significa que cuando los consumidores ingieren un *smoothie* tratado por HPP reciben la misma ingesta total de minerales que en el caso de la bebida no tratada.

Los minerales que contribuyen en mayor proporción a las ingestas dietéticas recomendadas, considerando una ración estándar de 330 mL de *smoothies* son: Ca, 6%; Mg, 9-14%; K, 18-23%; Fe, 2-4%; Cu, 14%, y Zn, 5% de las IDR (*FESNAD, 2010*).

Tabla 19. Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de elementos minerales (mg/L) de los *smoothies*.

	Tiempo	Smoothie con leche					Smoothie con soja				
		Control	TP	HP-450	HP-600	Sig <sup>1</sup>	Control	TP	HP-550	HP-650	Sig <sup>1</sup>
Na	Inicial	229 ± 5	230 ± 12	235 ± 8	239 ± 7	ns	205 ± 7 <sup>a</sup>	190 ± 11 <sup>a</sup>	226 ± 8 <sup>b</sup>	230 ± 9 <sup>b</sup>	**
	Final <sup>3</sup>	220 ± 9 <sup>a</sup>	250 ± 13 <sup>b</sup>	227 ± 7 <sup>a</sup>	234 ± 6 <sup>ab</sup>	*	197 ± 7 <sup>a</sup>	215 ± 12 <sup>b</sup>	208 ± 8 <sup>a</sup>	214 ± 10 <sup>a</sup>	ns
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns		ns	ns	*	ns	
K	Inicial	2022 ± 82	2015 ± 87	2051 ± 75	1892 ± 103	ns	1800 ± 85	1730 ± 48	1896 ± 148	1830 ± 126	ns
	Final <sup>3</sup>	2017 ± 85	2022 ± 77	1986 ± 96	1926 ± 84	ns	1750 ± 48 <sup>a</sup>	1739 ± 37 <sup>a</sup>	2010 ± 82 <sup>b</sup>	1981 ± 71 <sup>b</sup>	***
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	
Ca	Inicial	184 ± 8	204 ± 12	193 ± 9	181 ± 11	ns	175 ± 8 <sup>a</sup>	170 ± 6 <sup>a</sup>	193 ± 7 <sup>b</sup>	169 ± 8 <sup>a</sup>	*
	Final <sup>3</sup>	183 ± 8 <sup>a</sup>	202 ± 10 <sup>b</sup>	182 ± 7 <sup>a</sup>	194 ± 6 <sup>ab</sup>	ns	168 ± 10 <sup>a</sup>	191 ± 8 <sup>b</sup>	189 ± 7 <sup>b</sup>	185 ± 9 <sup>b</sup>	*
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns		ns	*	ns	ns	
Mg	Inicial	108 ± 6 <sup>a</sup>	119 ± 7 <sup>b</sup>	110 ± 6 <sup>a</sup>	105 ± 8 <sup>a</sup>	*	110 ± 4 <sup>a</sup>	107 ± 5 <sup>a</sup>	125 ± 6 <sup>b</sup>	101 ± 5 <sup>a</sup>	**
	Final <sup>3</sup>	99 ± 8 <sup>a</sup>	114 ± 6 <sup>b</sup>	108 ± 6 <sup>b</sup>	112 ± 5 <sup>b</sup>	*	108 ± 6	121 ± 5	118 ± 6	115 ± 6	ns
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns		ns	*	ns	*	
Fe	Inicial	931 ± 37	933 ± 27	981 ± 43	891 ± 44	ns	1232 ± 53	1295 ± 56	1258 ± 41	1227 ± 37	ns
	Final <sup>3</sup>	896 ± 57	879 ± 69	936 ± 48	916 ± 32	ns	1217 ± 49	1268 ± 51	1260 ± 48	1235 ± 58	ns
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	
Cu	Inicial	338 ± 17 <sup>a</sup>	314 ± 15 <sup>b</sup>	325 ± 11 <sup>c</sup>	312 ± 13 <sup>b</sup>	*	400 ± 19	426 ± 18	445 ± 22	405 ± 20	ns
	Final <sup>3</sup>	319 ± 15	321 ± 27	325 ± 20	327 ± 15	ns	424 ± 16	401 ± 17	426 ± 16	408 ± 14	ns
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	
Zn	Inicial	1175 ± 49	1146 ± 56	1147 ± 56	1148 ± 48	ns	1113 ± 41	1116 ± 46	1151 ± 47	110 ± 38	ns
	Final <sup>3</sup>	1168 ± 39	1149 ± 52	1082 ± 48	1156 ± 54	ns	1140 ± 43	1132 ± 53	1145 ± 47	109 ± 33	ns
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	
Mn	Inicial	242 ± 11	245 ± 9	245 ± 13	244 ± 9	ns	380 ± 16	389 ± 7	366 ± 14	396 ± 5	ns
	Final <sup>3</sup>	228 ± 23 <sup>a</sup>	239 ± 10 <sup>a</sup>	248 ± 15 <sup>ab</sup>	255 ± 10 <sup>b</sup>	*	372 ± 9	391 ± 10	375 ± 12	390 ± 10	ns
	Sig <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	

ANOVA unifactorial: Sig<sup>1</sup> (tipo de tratamiento), Sig<sup>2</sup> (tiempo de almacenamiento). \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001), ns (no significativo). Las letras diferentes en la misma línea indican diferencias significativas entre tratamientos (p < 0,05). Final<sup>3</sup> en Control: 30 días; Final<sup>3</sup> en TP y HPP: 45 días.

### 2.3. Análisis sensorial

Los atributos sensoriales evaluados en los *smoothies* fueron color, aroma, sabor, consistencia y aceptabilidad general. Los resultados se encuentran reflejados en la **Figura 39**.

El color de las bebidas se mantuvo estable después de los tratamientos de alta presión, tanto en las muestras que incluían leche como en las correspondientes de soja, con puntuaciones de alrededor de 6,8. Los panelistas no encontraron diferencias significativas con respecto al equivalente *smoothie* sin tratar (valoración de 6,9). Aunque las bebidas pasteurizadas tuvieron las puntuaciones más bajas en valores medios (6,4 y 6,5), las diferencias tampoco fueron significativas con respecto a las muestras control.

Los *smoothies* con leche o soja no tratados mostraron un aroma afrutado muy marcado: 5,6 y 5,2 respectivamente. Las distintas condiciones de tratamiento por altas presiones no dieron lugar a cambios significativos, manteniéndose las mismas características aromáticas del producto fresco. Sin embargo, en el caso de las correspondientes bebidas sometidas a tratamiento térmico se observó una disminución significativa, alcanzando valores de 4,7 y 4,1 respectivamente.

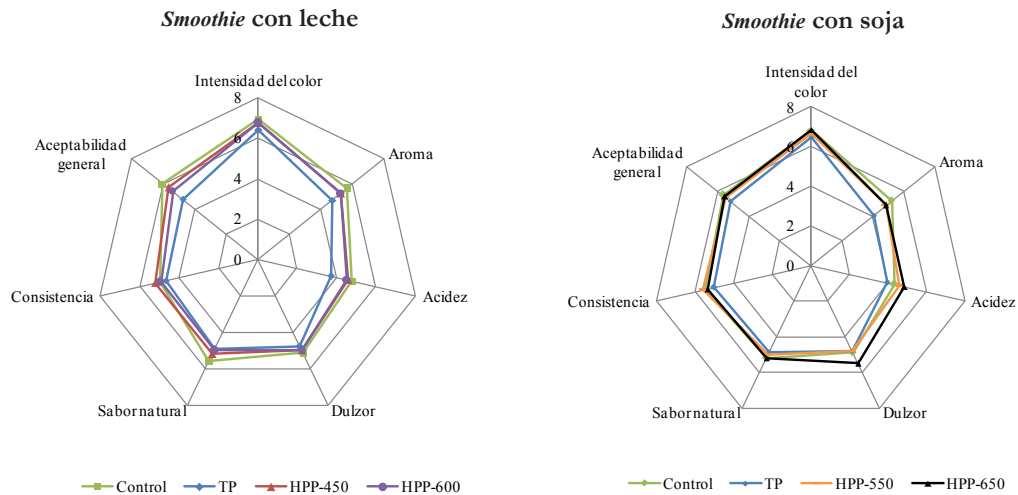
El sabor se describió en términos de acidez, dulzor y sensación de fruta natural. Los panelistas no encontraron diferencias significativas según el tipo de *smoothie*, aunque los no tratados elaborados con leche recibieron puntuaciones más altas que los de soja: acidez (leche: 4,8; soja: 4,3), dulzor (leche: 5,1; soja: 4,9), sensación de fruta natural (leche: 5,6; soja: 5,2). No se observaron diferencias significativas para estos parámetros entre las muestras tratadas y las no tratadas, si bien las muestras pasteurizadas obtuvieron menores puntuaciones, lo que significa que las muestras presurizadas no manifestaron ningún cambio respecto a este atributo sensorial.

En consecuencia, las bebidas procesadas por altas presiones mantienen su frescura original, color, aroma y sabor, hecho destacado también en la bibliografía (*Dede y col., 2007*). Con respecto a la pasteurización, al aplicar condiciones suaves en este estudio no se ha detectado sabor a cocido, y aun con puntuaciones inferiores, no ha habido significación estadística en las diferencias con el producto fresco.

En relación a la consistencia, tampoco se observaron cambios significativos entre las muestras tratadas y las no tratadas en ambos tipos de *smoothie*. No obstante, las muestras con soja recibieron puntuaciones más altas que las correspondientes con leche, lo que sugiere la mayor consistencia de las bebidas de soja, tal como se describió en las bebidas refrescantes mixtas comerciales (apartado 1.3).

La aceptabilidad general de las muestras elaboradas con leche siguió una puntuación descendente siendo mejor valorada la no tratada (6,0), seguida sin diferencias significativas por la HPP-450 (5,7) y la HPP-600 (5,4). Finalmente fue peor valorada, con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), la muestra pasteurizada (4,8). La muestra de soja control obtuvo una puntuación de 5,7 y aunque no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tipos de procesado debido a la variabilidad de resultados, el *smoothie* de soja pasteurizado obtuvo una puntuación menor (5,2) que los tratados por alta presión (5,5 el HPP-550 y 5,6 el HPP-650). La diferencia de presión entre los dos tratamientos en las muestras de soja (100 MPa) no pareció ser suficiente para causar cambios organolépticamente notables.

Fig. 39. Gráfico radial de los resultados del análisis sensorial para los atributos estudiados en los *smoothies* (intensidad del color, aroma, sabor ácido, dulce y natural, consistencia y aceptabilidad)



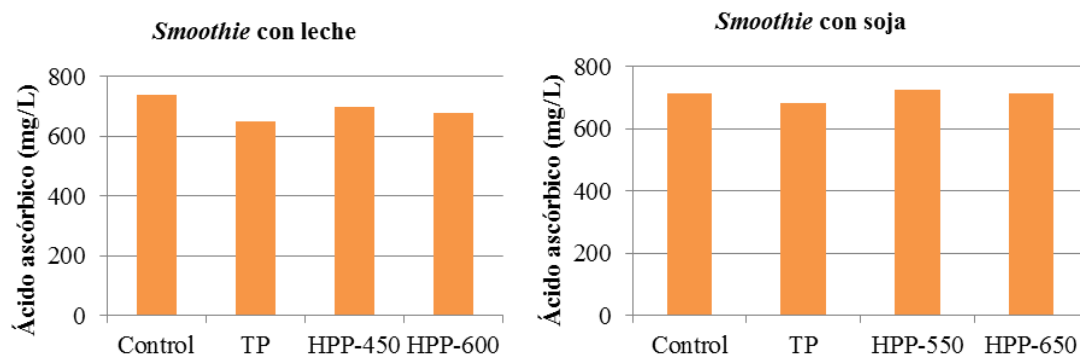
## 2.4. Parámetros funcionales

### Compuestos bioactivos

#### Ácido ascórbico

En los *smoothies* elaborados con leche la concentración inicial de ácido ascórbico fue de 735,9 mg/L (Fig. 40) y se comprobó que todos los tratamientos de conservación aplicados ocasionaron una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) en su contenido respecto al fresco, aunque la retención fue notablemente superior ( $p < 0,05$ ) en las muestras tratadas por altas presiones (95% HPP-450 y 92% HPP-600) con respecto a la tratada térmicamente (88%). En el caso del *smoothie* control preparado con soja, la concentración inicial de ácido ascórbico fue de 713,5 mg/L. No se encontraron diferencias significativas entre las muestras antes y después de ser tratadas por HP lo que señala la gran estabilidad del ácido ascórbico incluso a intensidades de presión elevadas. Sin embargo, en el caso del *smoothie* sometido al proceso térmico, se observó de nuevo una disminución significativa ( $p < 0,001$ ) del 6%. Bull y col. (2004) obtuvieron resultados similares en su estudio realizado en zumo de naranja pasteurizado (65 °C/1 min). Fernández-García y col. (2001) analizaron zumos de naranja y mezclas de zumo de naranja-lima-zanahoria y no hallaron diferencias entre las muestras antes y después del tratamiento HP (500-800 MPa/5 min).

Fig. 40. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en ácido ascórbico de los *smoothies*.

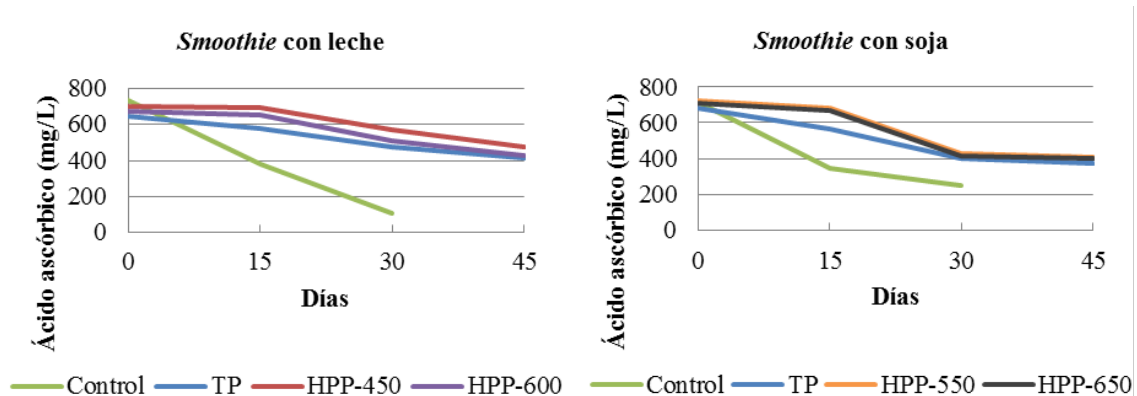


En la bibliografía siempre se señalan porcentajes de retención de ácido ascórbico más elevados en el tratamiento por alta presión que en el tratamiento de pasteurización (Sánchez-Moreno y col., 2005; Velázquez-Estrada y col., 2013). Los porcentajes de pérdidas obtenidos en los *smoothies* HPP del presente estudio fueron similares a los obtenidos por otros autores como Barba y col. (2012) en una bebida de zumo de naranja y leche tratada a 400 MPa, y Patras y col. (2009b) en purés de tomate sometidos a 600 MPa. Oey y col. (2008) reflejan que la tasa de degradación del ácido ascórbico se incrementa a medida que aumenta la presión. En nuestro estudio se observó un comportamiento similar, produciéndose retenciones ligeramente superiores al aplicar intensidades de presión más bajas.

El ácido ascórbico es un compuesto bioactivo de labilidad conocida que se pierde fácilmente durante el almacenamiento. De hecho, la pérdida de vitamina C proporciona un índice útil de deterioro oxidativo. Los dos tipos de *smoothies* frescos almacenados en refrigeración redujeron a la mitad su contenido de vitamina C en tan sólo quince días (Fig. 41) y llegaron a alcanzar pérdidas del 85% (leche) y del 65% (soja) al final de dicho almacenamiento (30 días). En el caso de las muestras tratadas por HP, los descensos resultaron más suaves y progresivos que en las tratadas térmicamente, llegando a tiempo final a porcentajes de pérdida bastante similares al comparar ambos tratamientos. Tras 45 días en refrigeración, las bebidas a base de fruta y leche mostraron una degradación del 32% (HPP-450), 36% (HPP-600) y 37% (TP). Para los *smoothies* a base de fruta y soja, los porcentajes de deterioro de ácido ascórbico fueron del 44% (TP) y del 43% (HPP-550 y HPP-650). Además de la presión, existe otro factor importante como es el pH bajo de los *smoothies* (apartado 2.1), que puede contribuir a la estabilización de este compuesto. Dede y col. (2007) también encontraron una retención elevada (> 45%) de ácido ascórbico en zumo de zanahoria tratado por altas presiones (250 MPa/35 °C/15 min) y tras su almacenamiento durante 30 días.

La degradación del ácido ascórbico puede ser debida a la presencia de oxígeno residual remanente en el envase. Sakbale, Panar y Ranveer (2012) sugirieron la luz o la oxidación del ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico como causas del deterioro. También existen otros factores que pueden conducir a su degradación, tales como la presencia de sustancias anti- o pro-oxidantes, la activación enzimática inducida por la presión (citocromo oxidasa, oxidasa del ácido ascórbico y peroxidasa encontradas en frutas), y las reacciones aerobias y anaerobias no enzimáticas (Polydera y col., 2005; Sánchez-Moreno y col., 2005; Zhou y col., 2014).

Fig. 41. Evolución del contenido de ácido ascórbico de los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.



Los datos que aporta la bibliografía con respecto a la pérdida del ácido ascórbico durante el almacenamiento en refrigeración son contradictorios. Los resultados encontrados en esta Tesis concuerdan con los reflejados por *Polydera y col. (2005)* y de *Plaza y col. (2006)* en zumo de naranja tratado por HPP. Sin embargo, *Cao y col. (2012)* observaron una disminución del 39,6 % en zumo de fresa tratado a 600 MPa durante 4 min tras 6 meses de almacenamiento a 4 °C.

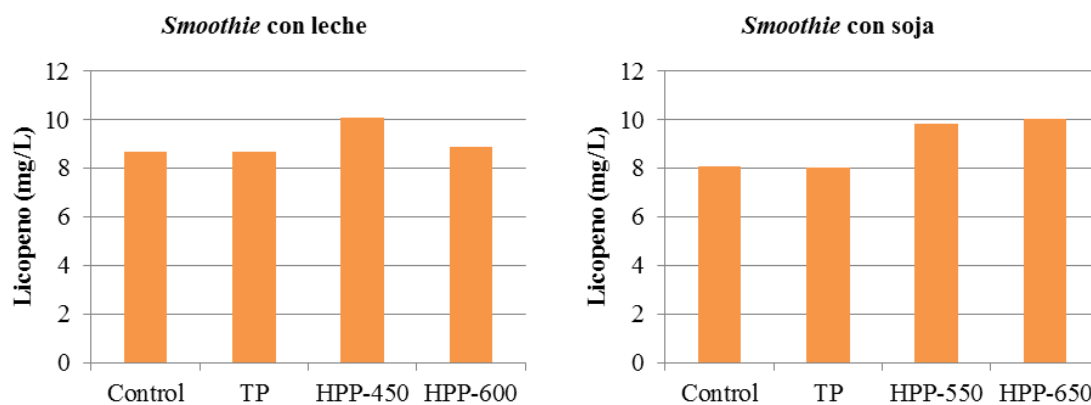
En la práctica industrial, la disminución de la concentración de ácido ascórbico hasta niveles inaceptables define a menudo la vida útil del zumo. De hecho, *Polydera y col. (2005)*, asumiendo que se trata del tiempo requerido para producir una pérdida del 50% del contenido de ácido ascórbico, establecieron la vida útil de zumos de naranja Navel HP (600 MPa/40 °C/4 min) y pasteurizados (80 °C/60 s) almacenados a 5 °C en 109 días y en 58 días, respectivamente. Según *Tivari y col. (2009)*, la concentración de ácido ascórbico en zumo de naranja debería ser al menos 250 mg/L en la fecha de caducidad. En el presente estudio, tanto los *smoothies* tratados por calor (80 °C/3 min) como los tratados por altas presiones (450 a 650 MPa/20 °C/3 min) retuvieron más del 50% de ascórbico en el momento final del almacenamiento establecido (45 días a 4 °C).

Pese a la adición deliberada de ácido ascórbico en la formulación del *smoothie* (200 mg/L), el resto del contenido presente de manera natural por las frutas con que se elaboró resulta suficiente para cubrir el 100% de las recomendaciones diarias en todos los grupos de población: 35-100 mg/día (*FESNAD, 2010*) tras el consumo de una ración individual de 330 mL de la bebida.

### Carotenoides

Los carotenoides identificados y cuantificados en los *smoothies* fueron licopeno,  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\epsilon$ -caroteno (**Tabla 20**). El licopeno, procedente de la papaya seleccionada como ingrediente, se encontró en las muestras no tratadas en cantidades de 8,7 y 8,1 mg/L según estén formuladas con leche o soja respectivamente. Tras el tratamiento térmico no se observaron pérdidas estadísticamente significativas ya que las concentraciones fueron similares en ambos tipos de productos (**Fig. 42**). La aplicación de las altas presiones dio lugar a la total retención (HPP-600) o incluso incrementos significativos de la concentración de este pigmento del 16% (HPP-450), 22% (HPP-550) y 24% (HPP-650), lo que supone un efecto favorable para este caroteno.

Fig. 42. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en licopeno de los *smoothies*.



Nuestros datos son concordantes con los aportados por *Zhang y col. (2011)* en zumo de sandía tratado por alta presión, donde el *trans*-licopeno fue significativamente superior que el del zumo tratado térmicamente. *Hsu y col. (2008)* analizaron puré de tomate y también advirtieron la estabilidad del licopeno frente al calor durante la pasteurización y el aumento de la extractabilidad tras el procesado por alta presión, siendo ésta directamente proporcional a la presión aplicada.

Durante el almacenamiento se observó una disminución significativa ( $p < 0,01$ ) en el contenido medio de licopeno de las muestras no tratadas y pasteurizadas (**Fig. 43**) mientras que en el caso de las bebidas HPP, se observó un mantenimiento en el contenido de licopeno en los *smoothies* con soja e incluso un incremento en los de leche, lo que indica que los *smoothies* tratados por esta tecnología retienen su contenido de licopeno al menos durante 45 días de almacenamiento en refrigeración. *Hsu (2008)* observó un comportamiento similar en el licopeno de un zumo de tomate HP almacenado en frío.

Tabla 20. Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de carotenoides (mg/L) de los *smoothies*.

**Smoothie con leche**

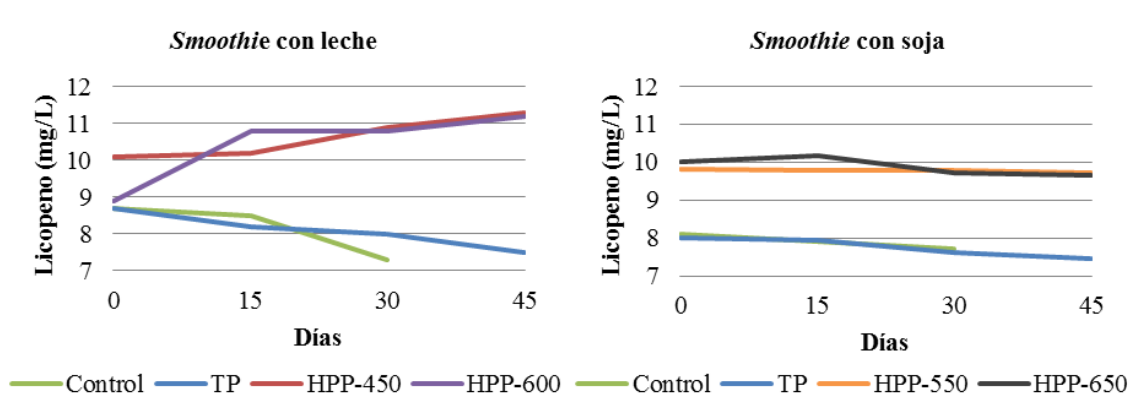
	Días	Licopeno	β-caroteno	α-caroteno	ε-caroteno	Carotenoides totales
<b>Control</b>	<b>0</b>	8,7 ± 0,2 <sup>Aa</sup>	72,0 ± 1,0 <sup>Aa</sup>	37,7 ± 0,6 <sup>Aa</sup>	9,6 ± 0,2 <sup>Aa</sup>	128 ± 2 <sup>Aa</sup>
	<b>15</b>	8,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	67,2 ± 2,3 <sup>b</sup>	36,8 ± 1,3 <sup>a</sup>	7,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	120 ± 4 <sup>b</sup>
	<b>30</b>	7,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	58,1 ± 1,4 <sup>c</sup>	35,1 ± 0,7 <sup>b</sup>	6,3 ± 0,6 <sup>c</sup>	107 ± 2 <sup>c</sup>
<b>TP</b>	<b>0</b>	8,7 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	71,8 ± 1,1 <sup>Aa</sup>	37,0 ± 1,6 <sup>Aa</sup>	9,0 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	127 ± 5 <sup>Aa</sup>
	<b>15</b>	8,2 ± 0,1 <sup>ab</sup>	64,6 ± 1,3 <sup>b</sup>	36,1 ± 0,8 <sup>a</sup>	8,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	118 ± 3 <sup>b</sup>
	<b>30</b>	8,0 ± 0,5 <sup>bc</sup>	59,6 ± 4,2 <sup>c</sup>	35,8 ± 0,8 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,4 <sup>a</sup>	112 ± 4 <sup>c</sup>
	<b>45</b>	7,5 ± 0,2 <sup>c</sup>	55,0 ± 1,5 <sup>d</sup>	35,5 ± 1,0 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	107 ± 1 <sup>d</sup>
<b>HPP-450</b>	<b>0</b>	10,1 ± 0,3 <sup>Ba</sup>	81,0 ± 1,7 <sup>Ba</sup>	36,9 ± 1,5 <sup>Aa</sup>	9,1 ± 0,3 <sup>Aa</sup>	137 ± 3 <sup>Ba</sup>
	<b>15</b>	10,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	76,6 ± 1,7 <sup>b</sup>	36,4 ± 0,5 <sup>ab</sup>	8,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	132 ± 4 <sup>b</sup>
	<b>30</b>	10,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	75,7 ± 1,2 <sup>b</sup>	35,7 ± 0,7 <sup>ab</sup>	8,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	131 ± 1 <sup>a</sup>
	<b>45</b>	11,3 ± 0,2 <sup>b</sup>	74,9 ± 1,7 <sup>b</sup>	35,3 ± 0,9 <sup>b</sup>	8,1 ± 0,6 <sup>b</sup>	130 ± 4 <sup>a</sup>
<b>HPP-600</b>	<b>0</b>	8,9 ± 0,3 <sup>Aa</sup>	90,2 ± 1,8 <sup>Ca</sup>	37,5 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	8,9 ± 0,9 <sup>Aa</sup>	146 ± 4 <sup>Ba</sup>
	<b>15</b>	10,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	88,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	37,4 ± 0,6 <sup>a</sup>	8,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	145 ± 5 <sup>b</sup>
	<b>30</b>	10,8 ± 0,4 <sup>b</sup>	82,9 ± 3,3 <sup>b</sup>	36,7 ± 0,4 <sup>ab</sup>	8,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	139 ± 2 <sup>b</sup>
	<b>45</b>	11,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	82,3 ± 3,4 <sup>b</sup>	35,6 ± 1,0 <sup>b</sup>	8,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	138 ± 5 <sup>b</sup>

Smoothie con soja

	Días	Licopeno	β-caroteno	α-caroteno	ε-caroteno	Carotenoides totales
Control	0	8,1 ± 0,1 <sup>Aa</sup>	71,2 ± 0,9 <sup>Aa</sup>	36,3 ± 1,0 <sup>Aa</sup>	9,0 ± 0,6 <sup>Aa</sup>	125 ± 2 <sup>Aa</sup>
	15	7,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	61,7 ± 1,7 <sup>b</sup>	36,0 ± 2,1 <sup>a</sup>	8,0 ± 0,7 <sup>b</sup>	114 ± 1 <sup>b</sup>
	30	7,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	60,9 ± 0,7 <sup>b</sup>	35,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,4 ± 0,2 <sup>ab</sup>	113 ± 1 <sup>c</sup>
TP	0	8,0 ± 0,2 <sup>Aa</sup>	71,9 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	35,7 ± 1,6 <sup>Aa</sup>	8,5 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	124 ± 4 <sup>Aa</sup>
	15	7,9 ± 0,2 <sup>a</sup>	71,7 ± 0,8 <sup>a</sup>	31,8 ± 0,9 <sup>b</sup>	8,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	120 ± 3 <sup>a</sup>
	30	7,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	59,6 ± 2,7 <sup>b</sup>	32,0 ± 1,2 <sup>b</sup>	8,2 ± 0,6 <sup>a</sup>	107 ± 4 <sup>b</sup>
	45	7,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	56,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	32,5 ± 0,6 <sup>b</sup>	7,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	105 ± 3 <sup>b</sup>
HPP-550	0	9,8 ± 0,1 <sup>Ba</sup>	80,0 ± 0,9 <sup>Ba</sup>	35,4 ± 0,4 <sup>Aa</sup>	8,8 ± 0,3 <sup>Aa</sup>	134 ± 2 <sup>Ba</sup>
	15	9,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	74,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	34,9 ± 0,4 <sup>a</sup>	7,5 ± 0,3 <sup>b</sup>	126 ± 2 <sup>b</sup>
	30	9,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	74,3 ± 1,3 <sup>b</sup>	33,7 ± 0,8 <sup>b</sup>	8,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	126 ± 2 <sup>b</sup>
	45	9,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	74,0 ± 2,0 <sup>b</sup>	33,3 ± 0,8 <sup>b</sup>	8,7 ± 0,2 <sup>a</sup>	126 ± 1 <sup>b</sup>
HPP-650	0	10,0 ± 0,1 <sup>Ba</sup>	81,7 ± 0,6 <sup>Ca</sup>	35,9 ± 0,8 <sup>Aa</sup>	8,8 ± 0,5 <sup>Aa</sup>	136 ± 3 <sup>Ca</sup>
	15	10,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	75,7 ± 2,6 <sup>b</sup>	35,8 ± 0,5 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	130 ± 3 <sup>ab</sup>
	30	9,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	71,5 ± 1,0 <sup>c</sup>	35,5 ± 0,6 <sup>a</sup>	8,3 ± 0,4 <sup>a</sup>	127 ± 4 <sup>ab</sup>
	45	9,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	72,7 ± 0,7 <sup>c</sup>	34,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	8,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	125 ± 2 <sup>b</sup>

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos a tiempo inicial (día 0). Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los distintos días de almacenamiento para un mismo tratamiento.

Fig. 43. Evolución del contenido de licopeno de los smoothies a lo largo del período de almacenamiento.

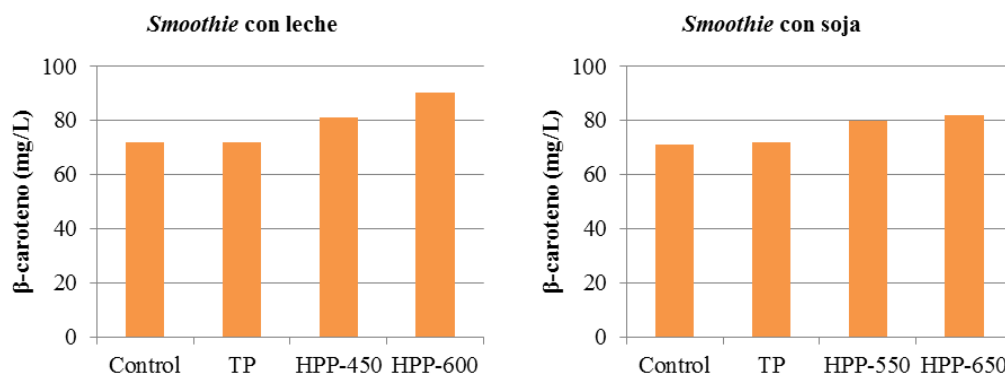


Aunque el licopeno no se reconoce aún como un nutriente esencial y no existen niveles recomendados de consumo, se considera que un consumo diario de 5-7 mg en individuos sanos puede ser suficiente para mantener los niveles séricos de licopeno adecuados para combatir el estrés oxidativo y prevenir enfermedades crónicas (Rao y col., 2007). En nuestro caso, la ingesta de una ración de smoothie (330 mL) cubriría en torno al 45% de la necesidad diaria de licopeno.

El  $\beta$ -caroteno en los *smoothies* procede fundamentalmente de la zanahoria y del melón utilizados en su elaboración, alcanzando valores de 72,0 y 71,2 mg/L, según incorporación de leche o soja. Su comportamiento en las bebidas con leche resultó muy similar a la del licopeno: no se detectaron diferencias significativas entre la muestra tratada térmicamente y la control. Sin embargo, la aplicación de las diferentes condiciones de HPP provocó aumentos significativos de  $\beta$ -caroteno que oscilaron entre el 12,5% (HPP-450) y el 25% (HPP-600) con respecto a la muestra no tratada motivados por la mayor facilidad de extracción tras el procesado de altas presiones (Tabla 20 y Fig. 44). En el caso de la formulación con soja, el tratamiento térmico tampoco dio lugar a cambios significativos. En las muestras tratadas por HP, los porcentajes de incremento se situaron entre el 12% (HPP-550) y el 15% (HPP-650) ( $p < 0,001$ ).

Vásquez-Caicedo y col. (2007) describieron pérdidas escasas de  $\beta$ -caroteno en puré de mango pasteurizado. Huang y col. (2013) en néctares de albaricoque, refieren un aumento significativo del contenido total de carotenoides y de  $\beta$ -caroteno tras el tratamiento por alta presión a 500 MPa/20 min. Patras y col. (2009) y Sánchez-Moreno y col. (2005) también reflejaron incrementos en el contenido de  $\beta$ -caroteno en puré de zanahoria y zumo de naranja, respectivamente, tratados por HP.

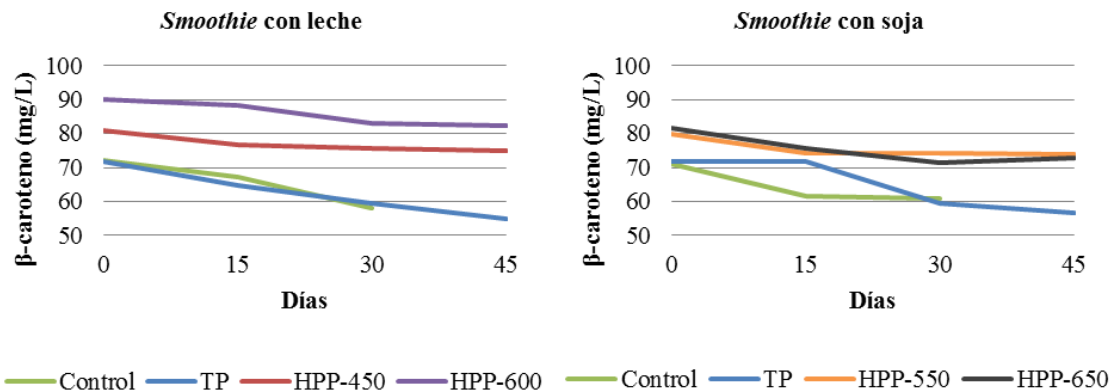
Fig. 44. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en  $\beta$ -caroteno de los *smoothies*.



En el estudio de almacenamiento de los *smoothies*, se observó una disminución de  $\beta$ -caroteno en todos los tipos de muestras (Fig. 45). Las muestras no tratadas de ambos tipos (leche y soja) mostraron una disminución significativa del 15-19% al final del período estudiado (30 días). Las muestras pasteurizadas vieron disminuido su contenido de  $\beta$ -caroteno hasta una pérdida final en torno al 23% ( $p < 0,005$ ) tras 45 días en refrigeración. Para las muestras tratadas por alta presión, la disminución fue también significativa ( $p < 0,001$ ) aunque mucho más gradual y suave, con porcentajes de pérdidas inferiores, del orden del 8% (450 y 550 MPa), 9% (600 MPa) y 11% (650 MPa) tras 45 días de almacenamiento a 4 °C. Bull y col. (2004) refirieron una reducción significativa del contenido de  $\beta$ -caroteno en zumos de naranja tratados por HP a 600 MPa/1 min o por tratamiento térmico.

El contenido inicial de  $\alpha$ -caroteno en los *smoothies* (37,7 y 36,3 mg/L en las formulaciones con leche y soja, respectivamente), proporcionado básicamente por las zanahorias, no se vio afectado en general ni por el factor tratamiento ni por el factor tiempo de almacenamiento ( $p > 0,05$ ). Excepcionalmente el  $\alpha$ -caroteno de la bebida con soja pasteurizada sufrió una disminución ( $p < 0,01$ ) tras 15 días de almacenamiento (Tabla 20).

Fig. 45. Evolución del contenido de  $\beta$ -caroteno de los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.

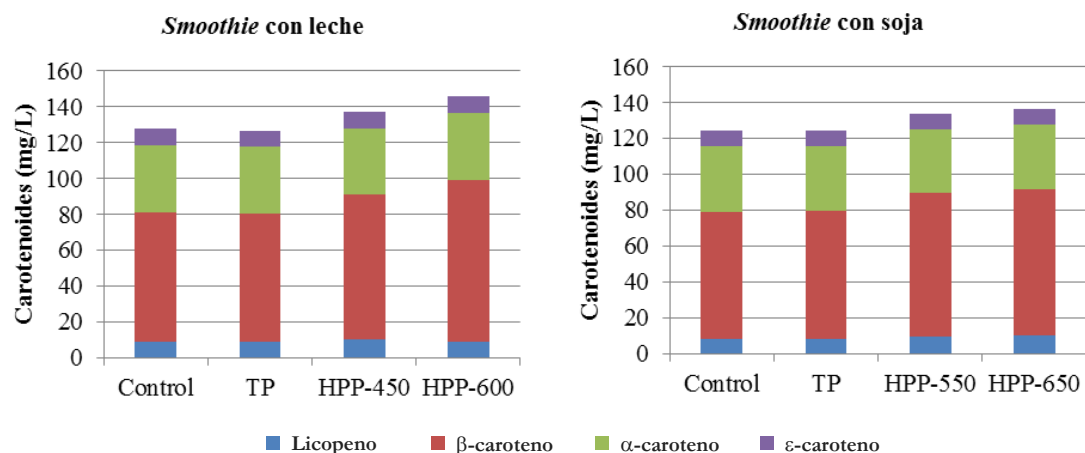


El  $\epsilon$ -caroteno fue el pigmento minoritario. Su concentración fue inferior a 10 mg/L en todas las muestras. Los tratamientos de conservación no produjeron variaciones significativas en los *smoothies* elaborados con soja y se observaron ligeras pérdidas, de poco interés, en aquellos preparados con leche, cifrándose la retención con respecto al *smoothie* fresco en porcentajes siempre superiores al 93%. Tras los 45 días de almacenamiento se produjeron escasas variaciones, inferiores al 10% (Tabla 20).

La recomendación diaria de vitamina A (600-800  $\mu$ g/día) quedaría plenamente cubierta tras el consumo de una ración de 330 mL (FESNAD, 2010), lo que convierte a estos *smoothies* en una buena fuente de carotenoides con un doble efecto beneficioso sobre la salud: el provitámico y el antioxidante.

El contenido total de carotenoides estuvo representado mayoritariamente por el  $\beta$ -caroteno, con un porcentaje de contribución alrededor del 57%. En menor proporción se situó el  $\alpha$ -caroteno, con una aportación en torno al 28% sobre el contenido total de carotenoides. En proporción similar, la participación del licopeno y del  $\epsilon$ -caroteno sobre el contenido total alcanzó el 8 y el 7%, respectivamente (Fig. 46). El contenido de carotenoides totales se mantuvo estable tras el tratamiento térmico de ambos tipos de *smoothies* y se observó un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) en los tratados por altas presiones: 10% (HPP-450), 13% (HPP-550), 9% (HPP-600) y 16% (HPP-650).

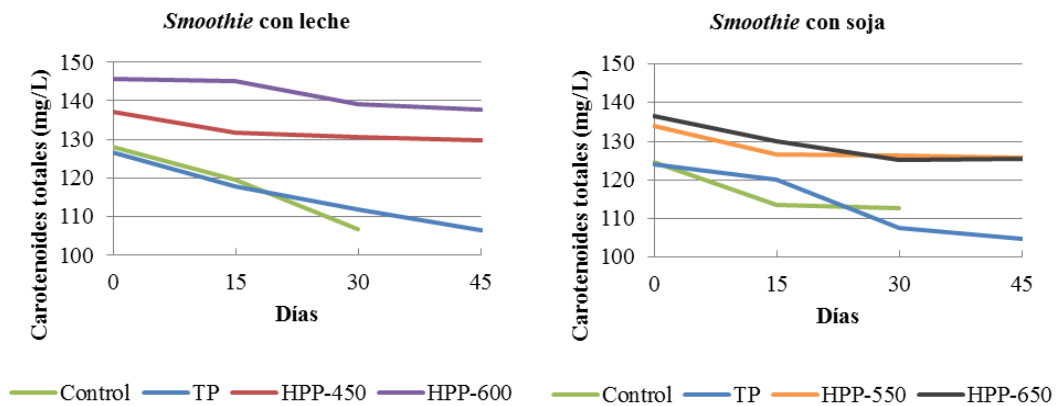
Fig. 46. Contribución de cada carotenoide al contenido total tras la aplicación de los distintos tratamientos de conservación.



Estos resultados demuestran que los carotenoides totales presentan excelentes niveles de retención después de los diferentes tratamientos de presión aplicados. *Barba y col. (2012b)* en su revisión sobre efecto de la presión sobre los alimentos, refieren que la mayor capacidad de extracción de carotenoides se podría explicar porque la presión afecta a las membranas de las células vegetales y desnaturaliza la unión entre los carotenoides y las proteínas, lo que implica una mejora desde el punto de vista nutricional. Los resultados obtenidos por otros autores sobre el efecto de altas presiones en carotenoides apuntan también a una estabilidad o un incremento de niveles tras el tratamiento. *Carbonell-Capella y col. (2013)* procesaron una mezcla de zumos de fruta bajo diferentes condiciones de presión (300, 400 y 500 MPa) y observaron que éste tenía un efecto positivo significativo sobre los carotenoides totales en la bebida, especialmente al aplicar la intensidad de presión más alta (500 MPa/15 min). Las condiciones de procesamiento seleccionadas por *Vervoort y col. (2011)* en zumo de naranja pasteurizado (72 °C/20 s) no tuvieron efecto significativo sobre el perfil de carotenoides.

Al considerar la evolución en el tiempo de almacenamiento, en las muestras elaboradas con leche o soja no tratadas se observó una disminución significativa ( $p < 0,05$ ) del contenido de carotenoides totales en un rango de 4-8% tras 30 días (**Fig. 47**). Las correspondientes muestras pasteurizadas almacenadas durante 45 días condujeron a pérdidas del orden de 15-11%. Los *smoothies* tratados por alta presión manifestaron mayor estabilidad en la fracción de carotenoides tras 45 días en refrigeración. La aplicación de 450 MPa no dio lugar a cambios significativos y las mayores pérdidas (6%) se observaron al aplicar la presión más elevada (650 MPa). Hay numerosos autores que evidencian la superioridad en la retención de carotenoides al aplicar el tratamiento de altas presiones frente a la pasteurización: de *Ancos y col. (2002)*, *Plaza y col. (2011)* y *Vervoort y col. (2011)* encontraron pérdidas significativamente superiores en el contenido total de carotenoides en zumos de naranja pasteurizados en comparación con los tratados por alta presión. *Esteve y col. (2009)* obtuvieron resultados similares a lo largo del almacenamiento (7 semanas/4 °C) de un zumo de naranja tratado por altas presiones y pasteurización. *De Ancos y col. (2002)* también observaron la gran estabilidad de los carotenoides en zumo de naranja tratado a 100 MPa/60 °C/5 min almacenado durante 10 días en refrigeración. Existen dos razones que podrían explicar este comportamiento, por una parte la inactivación de las enzimas implicadas en la pérdida de los carotenoides durante el almacenamiento, y por otra la mejora en la extracción originada por la alta presión.

Fig. 47. Evolución del contenido de carotenoides totales de los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.



### Polifenoles individuales

El contenido de polifenoles individuales se ha estudiado en los *smoothies* elaborados con soja ya que, *a priori*, deberían tener un perfil más variado por la inclusión de los polifenoles, tanto de las frutas y hortalizas como de la soja. Los compuestos fenólicos identificados y cuantificados pertenecieron a los grupos de ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, encontrándose más representadas en este último grupo las flavanonas con respecto a las isoflavonas (**Tabla 21**).

Entre los ácidos hidroxicinámicos destacaron los ácidos clorogénico (20,4 mg/L), *p*-cumárico (18,5 mg/L) y cafeico (12,7 mg/L). Aunque son de amplia difusión en productos vegetales, según la bibliografía, la papaya y la naranja utilizadas como ingredientes de los *smoothies*, serían las responsables de su presencia (Gayosso y col., 2011; Klimczak y col., 2007). Dentro del grupo de los flavonoides, la hesperidina fue la flavanona que destacó por su máxima contribución (276 mg/L), y cuya procedencia es atribuible a la naranja, que constituye el ingrediente principal de la formulación. Klimczak y col. (2007) corroboran la presencia de los ácidos hidroxicinámicos, principalmente ácido cafeico, y las flavanonas (hesperidina y narirutina) como los grupos predominantes de compuestos fenólicos en zumos de naranja.

En orden decreciente de concentración, se detectaron las isoflavonas: genisteína (12,1 mg/L), daidzina (3,1 mg/L) y daidzeína (207 µg/L) debido a la adición de leche de soja como ingrediente en la preparación de los *smoothies*. Según Rostagno y col. (2009), la soja es la única fuente alimentaria significativa de isoflavonas, cuyos niveles oscilan entre 0,4 mg y 9,5 mg/g. Finalmente, dentro de los flavonoides se detectaron flavan-3-oles que estuvieron representados por la epicatequina (8,4 mg/L) y la catequina (4,4 mg/L).

El efecto de los tratamientos aplicados fue diferente en función del polifenol estudiado. El ácido cafeico, la narirutina y la hesperidina no mostraron diferencias significativas entre los diferentes tipos de procesado. Asimismo el ácido *p*-cumárico, el ácido clorogénico, la daidzina y la genisteína permanecieron estables después del tratamiento HP en ambas condiciones de presión (550 y 650 MPa) o incluso en algunos casos aumentaron significativamente con respecto a las muestras no tratadas. Sin embargo, la pasteurización condujo a una pérdida significativa en el contenido de estos polifenoles, principalmente de ácido clorogénico (18%), de acuerdo con su conocida termolabilidad. La epicatequina y la catequina resultaron ser más inestables, permaneciendo sus niveles constantes únicamente bajo ciertas condiciones de tratamiento de alta presión: epicatequina a 550 MPa y catequina y daidzeína a 650 MPa. Dada la mayor estabilidad de los compuestos fenólicos tras el procesado de HP frente al procesado térmico, los *smoothies* tratados por alta presión pueden ser considerados de mayor interés con respecto a estos compuestos bioactivos

Tabla 21. Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre el contenido de polifenoles individuales (mg/L) de los *smoothies*.

	Días	Clorogénico	p-cumárico	Cafeico	Hesperidina	Narirutina	Genisteína	Daidzina	Daidzeína	Epicatequina	Catequina	Total
Control	Inicial	20,4 ± 0,8 <sup>Ab</sup>	18,5 ± 0,6 <sup>Ab</sup>	12,7 ± 0,7 <sup>A</sup>	276 ± 14 <sup>A</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>A</sup>	12,1 ± 0,4 <sup>Ab</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>ABa</sup>	207 ± 8 <sup>A</sup>	8,4 ± 0,2 <sup>ABa</sup>	4,4 ± 0,2 <sup>AB</sup>	360 ± 18 <sup>A</sup>
	Final <sup>I</sup>	17,9 ± 0,5 <sup>b</sup>	14,5 ± 0,2 <sup>b</sup>	12,4 ± 0,7	272 ± 13	3,5 ± 0,1	11,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	211 ± 2	7,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	4,3 ± 0,3	346 ± 15
TP	Inicial	16,7 ± 0,4 <sup>B</sup>	15,9 ± 0,2 <sup>Ca</sup>	12,8 ± 0,7 <sup>A</sup>	266 ± 14 <sup>A</sup>	3,3 ± 0,2 <sup>A</sup>	10,9 ± 0,3 <sup>B</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>Ca</sup>	201 ± 6 <sup>B</sup>	6,8 ± 0,3 <sup>C</sup>	3,7 ± 0,2 <sup>BC</sup>	337 ± 15 <sup>B</sup>
	Final <sup>I</sup>	17,4 ± 0,8	18,4 ± 0,6 <sup>b</sup>	11,7 ± 0,9	255 ± 9	3,2 ± 0,1	10,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	188 ± 4	6,8 ± 0,3	4,0 ± 0,2	329 ± 9
HPP-550	Inicial	23,0 ± 0,2 <sup>Ca</sup>	20,5 ± 0,4 <sup>Ba</sup>	12,7 ± 1,0 <sup>A</sup>	283 ± 9 <sup>A</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>A</sup>	12,3 ± 0,3 <sup>A</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>BCa</sup>	203 ± 4 <sup>B</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>A</sup>	3,5 ± 0,2 <sup>C</sup>	370 ± 10 <sup>A</sup>
	Final <sup>I</sup>	21,3 ± 0,6 <sup>b</sup>	21,6 ± 0,4 <sup>b</sup>	12,9 ± 0,8	287 ± 9	3,7 ± 0,2	11,7 ± 0,2	2,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	207 ± 9	8,6 ± 0,4	3,4 ± 0,3	373 ± 9
HPP-650	Inicial	20,5 ± 0,5 <sup>A</sup>	19,0 ± 0,4 <sup>AB</sup>	12,9 ± 0,7 <sup>A</sup>	289 ± 17 <sup>A</sup>	3,4 ± 0,2 <sup>A</sup>	11,5 ± 0,3 <sup>A</sup>	3,3 ± 0,3 <sup>A</sup>	221 ± 5 <sup>AB</sup>	7,7 ± 0,3 <sup>B</sup>	4,5 ± 0,2 <sup>A</sup>	372 ± 15 <sup>A</sup>
	Final <sup>I</sup>	21,3 ± 0,4	19,7 ± 0,6	14,0 ± 0,6	267 ± 11	3,6 ± 0,3	11,9 ± 0,1	3,0 ± 0,1	224 ± 4	7,6 ± 0,3	4,5 ± 0,3	353 ± 14

Los resultados están expresados en mg/L, excepto la daidzeína, que está expresada en µg/mL.

Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos a tiempo inicial (día 0). Letras minúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el contenido a tiempo inicial y final para un mismo tratamiento.

Final<sup>I</sup> en Control: 30 días; Final<sup>I</sup> en TP y HPP: 45 días.

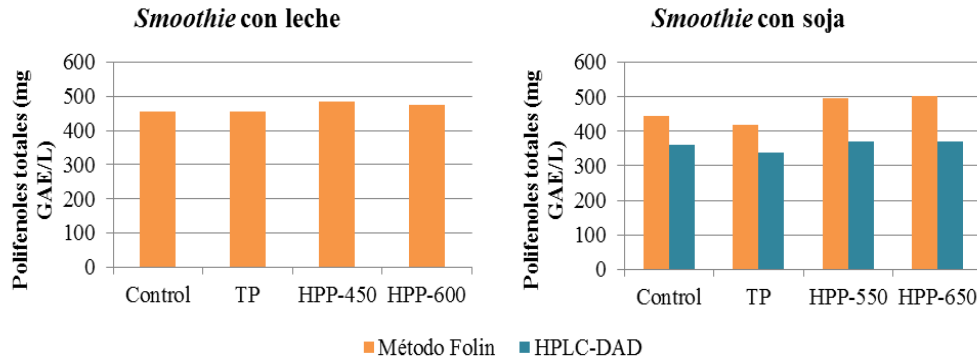
En general, los datos obtenidos concuerdan con la bibliografía, que refleja el distinto comportamiento de cada polifenol frente a la presión y la pasteurización. *Morales de la Peña y col. (2011b)* también encontraron una disminución significativa de los ácidos clorogénico y cumárico después del tratamiento térmico (90 °C/1 min) en una bebida mixta de fruta y leche de soja. *Velázquez-Estrada y col. (2013)* describieron la estabilidad del contenido de flavanonas en zumo de naranja después de la pasteurización (90 °C/1 min). *Odrizola-Serrano y col. (2009)* reflejaron la misma tendencia para los ácidos clorogénico, ferúlico, p-cumárico y cafeico, quercetina y kaempferol en zumo de tomate. Después del procesado por HP, *Jung y col. (2008)* no observaron ningún efecto significativo de la presión sobre la concentración total de isoflavonas en leche de soja sometida a 400-750 MPa/25 °C. *Rodríguez-Roque y col. (2015)* en bebidas a base de zumo de fruta, o *Plaza y col. (2011)* y *Sánchez-Moreno y col. (2005)* en zumos de naranja obtuvieron un aumento significativo en la capacidad de extracción de polifenoles individuales de las muestras sometidas a HPP con respecto a las correspondientes no tratadas. *Sánchez-Moreno y col. (2003)* advirtieron que no había correlación directa entre el grado de presión aplicada y la capacidad de extracción de flavanonas en zumo de naranja (100- 400 MPa / de 30-60 °C / 1-5 min). En términos generales, el nivel de los distintos polifenoles después del almacenamiento a 4 °C durante 45 días no produjo cambios acusados en ninguno de los tipos de procesado de los *smoothies*. Las muestras no tratadas fueron las más afectadas por el almacenamiento, detectándose pérdidas significativas de daidzina (6%), genistéina (7%), epicatequina (12%), ácido clorogénico (12%) y ácido p-cumárico (22%). La daidzeína fue el único polifenol vulnerable que sufrió pérdidas en el almacenamiento tras la aplicación de los tratamientos de pasteurización y HP. El ácido clorogénico sufrió una pérdida significativa tras el almacenamiento en HP-550 (7%), si bien los niveles siempre estuvieron por encima de los detectados en la muestra de referencia. De acuerdo con la revisión de *Barba y col. (2012)*, dependiendo de los autores, se describe un aumento (*Sánchez-Moreno y col., 2003*) o una disminución (*Plaza y col. 2011*) en el contenido de flavanonas en zumo de naranja. La degradación de los compuestos fenólicos durante el almacenamiento se ha relacionado principalmente con la actividad residual de la polifenoloxidasas y la peroxidasa (*Odrizola-Serrano y col., 2009*). *Rostagno y col. (2007)* afirman que las enzimas y el pH pueden operar durante el almacenamiento y por tanto pueden repercutir en la estabilidad de los glucósidos de isoflavona.

### Polifenoles solubles totales

El efecto del tratamiento de los *smoothies* en los polifenoles totales determinados por el método de Folin dio como resultado la ausencia de diferencias significativas en las muestras pasteurizadas en comparación con las no tratadas en el *smoothie* tipo leche, si bien en el de soja se detectaron pérdidas significativas aunque leves (6%) (**Fig. 48**). Por el contrario, en el caso de los *smoothies* tratados por alta presión, se encontró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de entre el 7% (450 MPa) y el 12 % (650 MPa). Estos incrementos son consecuencia de la ruptura de las paredes celulares por las altas presiones aplicadas, lo que permite una mayor liberación de los compuestos fenólicos y demás componentes antioxidantes por una mejor penetración del disolvente (*Wang y col., 2012*). Estos resultados concuerdan con los de *Barba y col. (2012)* en una bebida de zumo de naranja y leche tratada por alta presión. *Zhou y col. (2014)* obtuvieron igualmente aumentos en el TPC de 2,4% y 3,7% en calabaza tratada a 450 MPa y 550 MPa, respectivamente. *Varela-Santos y col. (2012)* también detectaron incrementos en un rango entre 3,3% y 11,9% para zumos de granada tratados a 350 MPa y 550 MPa, respectiva-

mente. Huang y col. (2013), Patras y col. (2009b) y Vega-Gálvez y col. (2014) obtuvieron resultados similares para néctares de albaricoque, zanahoria, puré de tomate y grosella.

Fig. 48. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre el contenido en polifenoles totales de los *smoothies*.



Los polifenoles totales calculados por la suma de los polifenoles individuales determinados por HPLC en *smoothies* elaborados con soja mostraron una buena correlación (0,8704) con los polifenoles totales procedentes del análisis espectrofotométrico. Sin embargo, los valores de TPC son más elevados en dicha determinación (Fig. 48) debido a una sobreestimación originada por otros compuestos presentes en la muestra que podrían producir interferencias (Klimczak y col., 2007).

Al final del período de almacenamiento a 4 °C, las pérdidas en el contenido de polifenoles totales fueron más o menos similares en todas las muestras evaluadas, oscilando entre el 6% (HPP-550 MPa) y el 15% (*smoothie* fresco preparado con leche). La pérdida de polifenoles totales puede atribuirse a la reacción de los polímeros parcialmente solubles que se forman con el reactivo del método Folin-Ciocalteu, a la oxidación de los compuestos fenólicos y a la polimerización de dichos compuestos con proteínas durante el almacenamiento (Cao y col., 2011). La oxidación enzimática (polifenoloxidasas y peroxidasas) juega un papel importante en la degradación de los compuestos fenólicos en muestras tratadas por alta presión. En el caso de la muestra pasteurizada, la disminución en el contenido de polifenoles totales durante el almacenamiento parece estar más relacionada con la oxidación, tanto enzimática como no enzimática, sobretodo la autooxidación no enzimática de compuestos fenólicos que da lugar a su transformación en quinonas (Patras y col., 2010).

## Capacidad antioxidante

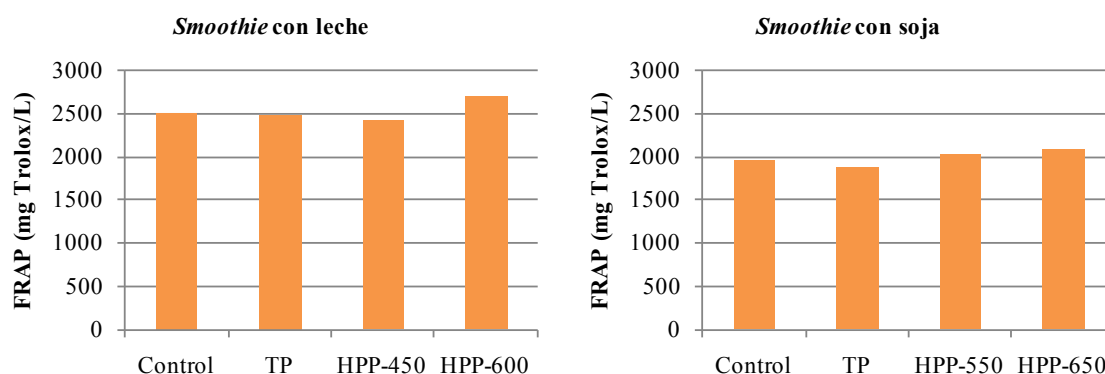
### FRAP

El efecto de los distintos tratamientos de los dos tipos de *smoothies* estudiados en la capacidad antioxidante medida por el mecanismo FRAP mostró ausencia de diferencias significativas entre las muestras control y las tratadas térmicamente, si bien se observó una ligera disminución no significativa en el *smoothie* de soja (Fig. 49). En relación a los tratamientos por alta presión se detectó un comportamiento diferente en función de la intensidad de presión aplicada, de tal manera que a menores presiones (450 y 550 MPa) no hubo cambios significativos y sin embargo al aplicar presiones superiores (600 y 650 MPa) se produjo un ligero aumento significativo, en torno al 7%, de la actividad antioxidante con respecto a la muestra no tratada.

En cualquier caso la actividad antioxidante siempre fue claramente superior en las muestras sometidas a altas presiones con respecto a las pasteurizadas, lo que coincide con los resultados de *Zhou y col. (2014)* en calabaza tratada por pasteurización (85 °C/5 min) y por altas presiones (450 MPa/15 min y 550 MPa/10 min). *Velázquez-Estrada y col. (2013)* también encontraron un valor medio de FRAP significativamente inferior en un zumo de naranja pasteurizado con respecto al mismo tratado por alta presión. Este efecto es debido probablemente al comportamiento del ácido ascórbico y los polifenoles totales, tal como exponen *Wang y col. (2012)*, *Oey y col. (2008)* y *Polydera y col. (2005)*, lo que se ha podido corroborar en este estudio por la elevada correlación entre el FRAP y el ácido ascórbico (0,7135) y el FRAP con el TPC (0,6827).

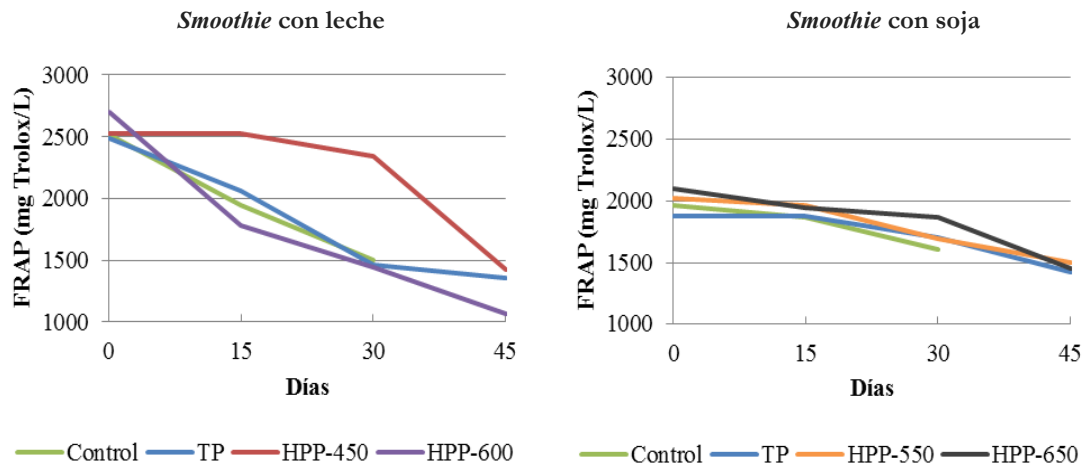
La velocidad de disminución de la actividad antioxidante (FRAP) durante el almacenamiento en general fue gradual en las muestras analizadas, si bien en la muestra elaborada con leche sometida a presiones de 450 MPa se mantuvo más constante en los primeros 30 días (**Fig. 50**). Al final del período de almacenamiento (45 días), el porcentaje de pérdidas osciló entre 24 y 61% y fue superior en las muestras elaboradas con leche con respecto a las preparadas con soja. Dentro de un mismo tipo de muestra, se observó una similitud en el comportamiento de TP, HPP-450 y HPP-550 durante el almacenamiento con menores pérdidas en relación a HPP-600 y HPP-650 al final de los ensayos.

**Fig. 49.** Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre la capacidad antioxidante de los *smoothies* medida por el mecanismo FRAP.



Las diferencias porcentuales en las pérdidas de actividad antioxidante entre las muestras de leche y las de soja pueden ser debidas a diferencias en el contenido de oxígeno residual que queda como espacio de cabeza en los envases (menor en las muestras de soja), siendo el oxígeno el factor responsable de la oxidación de ciertos compuestos como la vitamina C. Dado que la capacidad antioxidante se correlaciona bien con la vitamina C y el TPC (*Wang y col., 2012*), las pérdidas de estos compuestos durante el almacenamiento podrían explicar la consiguiente pérdida de actividad antioxidante.

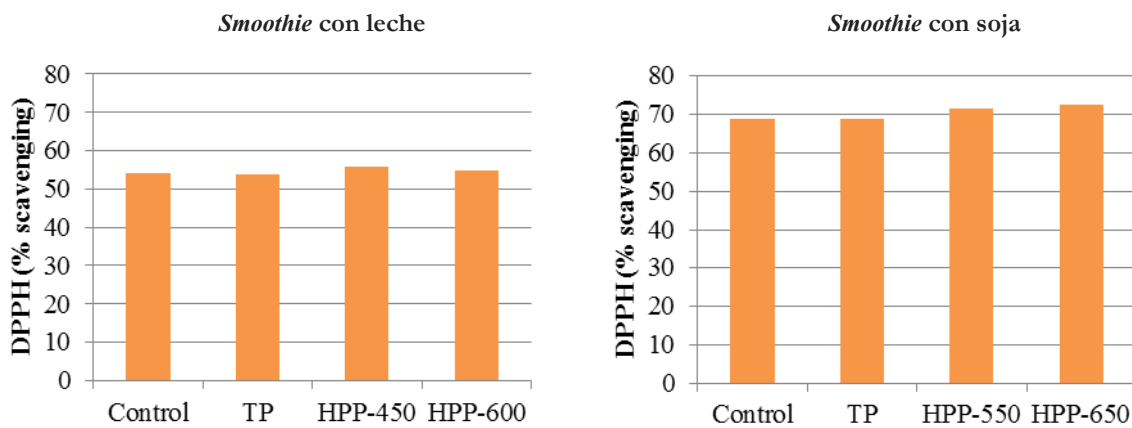
Fig. 50. Evolución de la capacidad antioxidante (FRAP) de los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.



### DPPH

La actividad antioxidante medida por el mecanismo de neutralización del radical DPPH no reveló diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los *smoothies* elaborados con leche tratados respecto al control (Fig. 51). En los correspondientes de soja no se observó ningún cambio significativo después del tratamiento térmico. No obstante, se detectó un aumento leve pero significativo ( $p < 0,01$ ) para las muestras HPP-550: 3,8% y HPP-650: 5,4%.

Fig. 51. Efecto de los distintos tratamientos aplicados sobre la capacidad antioxidante de los *smoothies* medida por el mecanismo de neutralización del radical DPPH.

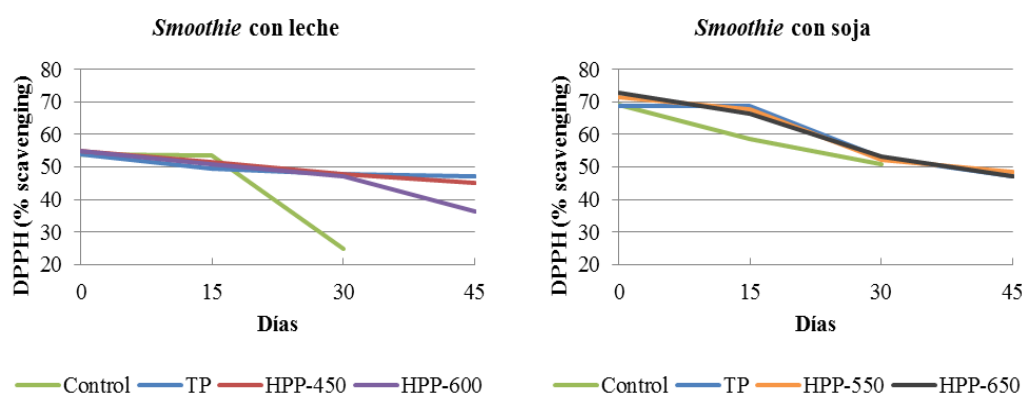


La bibliografía orienta a un mantenimiento o un incremento de la actividad antioxidante en función de las condiciones de HP aplicadas en los ensayos. *Patras y col. (2009b)* encontraron un aumento significativo en la capacidad antioxidante en purés de zanahoria tratados por HP (500 y 600 MPa/20 °C/15 min) del 22 al 37% en comparación con las muestras no tratadas. Estos resultados concuerdan también con los de *Polydera y col. (2005)* y *Vega-Gálvez y col. (2014)* en zumo de naranja y pulpa de grosella, respectivamente. *Di Scala y col. (2013)* demostraron que el tratamiento de alta presión aumenta o mantiene la actividad antioxidante en función de las diferentes presiones aplicadas y del tiempo de espera. Sin embargo *Fernández-García*

y col. (2001) no encontraron cambios en la capacidad antioxidante (DPPH) inmediatamente después de tratar un zumo de naranja, lima y zanahoria con HP (500 a 800 MPa/T<sup>a</sup> ambiente/5 min).

El valor de DPPH disminuyó gradual y significativamente ( $p < 0,01$ ) durante todo el tiempo de almacenamiento para la totalidad de las muestras estudiadas (Fig. 52). Las mayores pérdidas se detectaron en el *smoothie* control de leche (54%). La pasteurización condujo a pérdidas menores, del orden del 13% en el caso de la bebida de leche y del 31% en la de soja. En cuanto a las muestras tratadas por altas presiones hidrostáticas, las pérdidas fueron directamente proporcionales a la presión aplicada. Los porcentajes de pérdidas oscilaron entre el 19% (HPP-450) y el 35% (HPP-650). Chen y col. (2013) en un ensayo llevado a cabo en zumo de granada tratado por alta presión y por pasteurización a alta temperatura observaron igualmente una disminución en los valores de FRAP y DPPH, tras 90 días de almacenamiento a 4 °C. Varela-Santos y col. (2012) encontraron resultados similares en zumo de granada tratado por alta presión después de 35 días de almacenamiento.

**Fig. 52. Evolución de la capacidad antioxidante (DPPH) de los *smoothies* a lo largo del período de almacenamiento.**



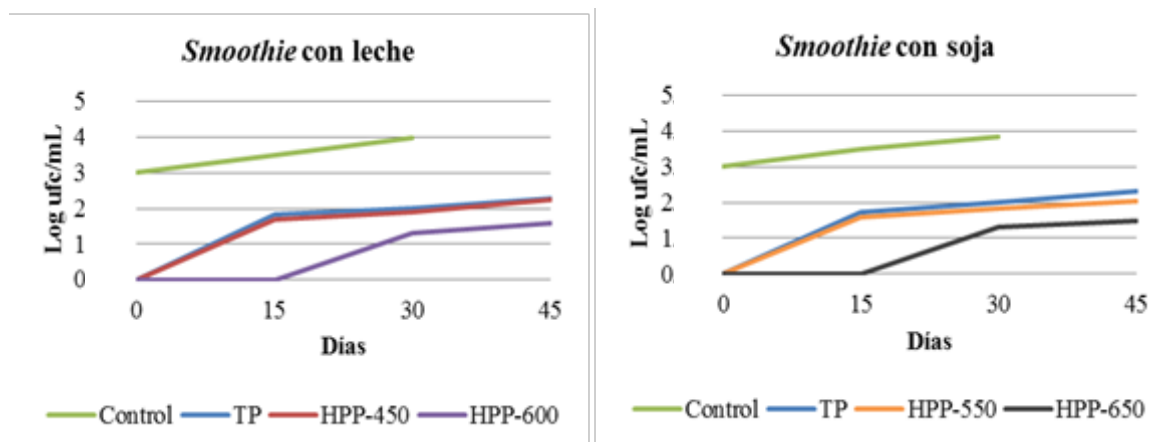
Las técnicas FRAP y DPPH mostraron altos coeficientes de correlación tanto con el ácido ascórbico (0,7135 y 0,8107, respectivamente) como con el TPC (0,6819 y 0,6935, respectivamente) en las muestras que contenían leche. En las muestras adicionadas de soja se observaron correlaciones del mismo orden de la capacidad antioxidante medidas por FRAP y DPPH con el ácido ascórbico (0,7399 y 0,8944, respectivamente), y en menor medida con los polifenoles totales (0,5246 y 0,4743, respectivamente). *Ismail y col. (2010)* estudiaron la actividad antioxidante del DPPH en extractos de melón, destacando una buena correlación con el contenido de fenoles totales (0,9228) y el contenido de flavonoides totales (0,8478). Por su parte, los carotenoides no revelaron ninguna correlación con los métodos para medir la actividad antioxidante (FRAP y DPPH) en extractos metanólicos, lo que coincide con lo expuesto por *Thaipong y col. (2006)*. Por lo tanto, el ácido ascórbico y los polifenoles son los principales contribuyentes a la actividad antioxidante de los *smoothies* medida por los métodos aplicados.

## 2.5. Parámetros microbiológicos

Los resultados de estos parámetros vienen reflejados en la **Tabla 22**.

El valor medio de bacterias aerobias mesófilas en las muestras no tratadas fue 3,00 log ufc/ml para ambos tipos de *smoothies* (**Fig. 53**). *Bull y col. (2004)* hallaron un recuento microbiano superior, de alrededor de 7,8 log ufc/mL en zumo de naranja. La elaboración de los *smoothies* se llevó a cabo siguiendo un protocolo meticuloso en la manipulación higiénica de las materias primas (lavado de las mismas con una solución de hipoclorito sódico 11,5 g/L, desinfección de las manos de los manipuladores y las superficies de trabajo, utilización de guantes, rapidez en la elaboración, etc.), lo que puede justificar los menores recuentos.

**Fig. 53.** Recuento de microorganismos aerobios mesófilos a 30 °C tras la aplicación de los distintos tratamientos y lo largo del período de almacenamiento.



En general, hay una asociación directa entre mayores recuentos microbianos y valores de pH más elevados. Así, *Patterson y col. (2012)* obtuvieron un recuento de 5,8 log ufc/ml en un zumo de zanahoria con un valor de pH de 6,5. Tanto el tratamiento de pasteurización como de altas presiones demostraron su eficacia limitando el crecimiento microbiano en los *smoothies*, con reducciones de más de 3 log ufc/mL, y no se encontraron diferencias significativas entre ambos tipos de tratamientos. Estos resultados son concordantes con los trabajos de *Patterson y col. (2012)*. *Velázquez-Estrada y col. (2012)* detectaron una mayor reducción logarítmica de bacterias mesófilas (4 log ufc/mL) en zumo de naranja, aplicando una presión de 300 MPa. *Unni y col. (2015)* demostraron que la alta presión (200-600 MPa/5 min/30 °C) y la pasteurización (90 °C/5 min) son tratamientos de eficacia equivalente en la reducción de los recuentos microbianos en pasta de jengibre.

Se postulan distintos mecanismos implicados en la inactivación de microorganismos por HPP. Las altas presiones hidrostáticas alteran la estructura celular y las funciones fisiológicas, pudiendo romper las cadenas de ADN, alterar la integridad de la membrana celular, inactivar enzimas claves, desnaturalizar proteínas de manera irreversible y desactivar la selectividad de las membranas (*Lado y Yousef, 2002*). Dentro del grupo de las bacterias aerobias mesófilas, ninguna de las colonias encontradas perteneció a la familia *Enterobacteriaceae*. Tampoco se detectaron *Listeria monocytogenes* ni *Escherichia coli* en ninguna de las muestras.

Tabla 22. Efecto de los distintos tipos de procesado y posterior almacenamiento a 4 °C sobre los parámetros microbiológicos (ufc/mL) de los *smoothies*.

Smoothie con leche						
	Días	Mohos y levaduras	Recuento de aerobios a 30°C	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Recuento de enterobacterias
<b>Control</b>	0	3,40	3,00	nd	nd	nd
	15	4,18	3,48	nd	nd	2,08
	30	4,54	3,98	nd	nd	3,00
<b>TP</b>	0	nd	nd	nd	nd	nd
	15	nd	1,83	nd	nd	nd
	30	nd	2,00	nd	nd	nd
	45	nd	2,28	nd	nd	nd
<b>HPP-450</b>	0	nd	nd	nd	nd	nd
	15	nd	1,69	nd	nd	nd
	30	nd	1,90	nd	nd	nd
	45	nd	2,23	nd	nd	nd
<b>HPP-600</b>	0	nd	nd	nd	nd	nd
	15	nd	1,00	nd	nd	nd
	30	nd	1,30	nd	nd	nd
	45	nd	1,60	nd	nd	nd

Smoothie con soja						
	Días	Mohos y levaduras	Recuento de aerobios a 30°C	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Recuento de enterobacterias
<b>Control ZS</b>	0	3,48	3,00	nd	nd	nd
	15	4,15	3,48	nd	nd	3,00
	30	4,18	3,85	nd	nd	3,80
<b>TP</b>	0	nd	nd	nd	nd	nd
	15	nd	1,74	nd	nd	nd
	30	nd	2,00	nd	nd	nd
	45	nd	2,30	nd	nd	nd
<b>HPP-550</b>	0	nd	nd	nd	nd	nd
	15	nd	1,60	nd	nd	nd
	30	nd	1,85	nd	nd	nd
	45	nd	2,04	nd	nd	nd
<b>HPP-650</b>	0	nd	nd	nd	nd	nd
	15	nd	nd	nd	nd	nd
	30	nd	1,30	nd	nd	nd
	45	nd	1,48	nd	nd	nd

nd: no detectado.

Los recuentos de mohos y levaduras en los *smoothies* a base de leche y de soja no tratados fueron 3,40 y 3,48 log ufc/mL, respectivamente. Los hongos hallados en los *smoothies* frescos fueron levaduras; no se detectaron mohos. En las muestras tratadas tanto por altas presiones como por pasteurización hubo ausencia de mohos y levaduras.

Los zumos tratados por altas presiones por lo general no son estériles y requieren su conservación en refrigeración para mantener la estabilidad microbiológica a lo largo de la vida comercial. La población inicial de bacterias aerobias mesófilas en los *smoothies* no tratados aumentaron desde aproximadamente 1 log ufc/mL hasta casi 4 log ufc/mL tras 30 días de almacenamiento (**Fig. 53**). En vista del elevado deterioro microbiano y la pérdida de la calidad organoléptica, se dio por finalizada la vida útil de los *smoothies* no tratados y fueron retirados en dicha fecha, mientras que se prolongó el ensayo de los correspondientes *smoothies* tratados durante 15 días más. En el transcurso del almacenamiento, todas las muestras tratadas sufrieron un deterioro microbiano, pero los recuentos en las muestras HPP fueron menores que en las pasteurizadas. La aplicación de las presiones más elevadas (600 y 650 MPa) resultó más eficaz al mantenerse la total ausencia de la población microbiana durante los primeros 15 días. Se observó además un recuento menor ( $p < 0,05$ ) después de esta fecha y hasta el final del almacenamiento, en comparación con las muestras tratadas a presiones más bajas (450 y 550 MPa).

En los *smoothies* no tratados, comenzaron a proliferar enterobacterias después de los primeros 15 días de almacenamiento en refrigeración, observándose mayor deterioro en el de soja (3,80 log ufc/mL) que en el de leche (3,0 log ufc/mL). No se detectaron enterobacterias en ninguna de las muestras tratadas. *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* tampoco se identificaron en ninguna de las muestras. El recuento de mohos y levaduras se incrementó en una unidad logarítmica (1 log ufc/mL) en las muestras sin procesar después de un mes de almacenamiento refrigerado, y en contraposición no se detectó su presencia en las muestras tratadas.

Después de 45 días a 4 °C ni las muestras pasteurizadas ni las tratadas por alta presión llegaron a alcanzar los recuentos obtenidos en los *smoothies* no tratados a tiempo inicial (día 0). Sin embargo, los *smoothies* tratados por HP mostraron mejor calidad microbiológica por lo que previsiblemente su vida útil podría ser ligeramente más prolongada que las tratadas térmicamente. Estos resultados fueron más satisfactorios que los obtenidos por Bull y col. (2004) en zumo de naranja sometido a 600 MPa/20 °C/60 s.



# 7. CONCLUSIONES





### A) Respecto a las metodologías aplicadas

1. El método de HPLC desarrollado y validado para la determinación simultánea de  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol,  $\alpha$ -tocoferol acetato, palmitato de retinol, retinol y  $\beta$ -caroteno en bebidas a base de fruta y leche o soja muestra la adecuación para las muestras analizadas por su simplicidad, buena linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad.
2. El método de ICP-AES seleccionado para la determinación de minerales y los métodos de HPLC utilizados en la determinación de carotenoides, compuestos fenólicos, azúcares, ácidos orgánicos y vitamina C, basados en anteriores trabajos, se han optimizado y validado, con resultados altamente satisfactorios para su aplicación en el análisis de bebidas mixtas y *smoothies*.

### B) Respecto a las bebidas comerciales

3. Las bebidas mixtas a base de frutas y leche o soja suponen una buena opción tanto para la hidratación como para el aporte de cantidades significativas de nutrientes esenciales, entre ellos azúcares, principalmente sacarosa, minerales y vitaminas A, C y E. Los sulfatos y fosfatos fueron los aniones predominantes. El potasio fue el principal macroelemento y la concentración de sodio fue en general muy escasa, especialmente en las bebidas de fruta y soja. La concentración de vitamina C fue muy elevada y en un 79% de las muestras contribuyó en más del 80% a las CDR. Así pues, el consumo de estas bebidas representa una buena contribución a nivel nutricional.
4. La comparación entre los atributos sensoriales de las muestras comerciales mostró diferencias significativas en el color, la dulzura, la acidez y la consistencia. El color fue más intenso en las bebidas cuyo ingrediente principal fue la naranja, la papaya o el mango y la mayor acidez se relacionó con la mayor proporción de naranja debido a la presencia natural del ácido cítrico y a su adición intencionada. Las bebidas elaboradas con soja presentan menor dulzor y mayor consistencia. Las bebidas mixtas con plátano, naranja y soja tuvieron la mejor aceptabilidad general.
5. El análisis comparativo entre los componentes químicos y el perfil sensorial de las bebidas comerciales mixtas dio lugar a correlaciones negativas entre el contenido total de azúcares y el sabor ácido y positivas entre el porcentaje de concentrado de frutas y su consistencia, así como con la fructosa, ácido málico, potasio y fosfato al ser éstos, compuestos naturales de las frutas que dependen del porcentaje de concentrado empleado.
6. Las bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y leche o, en su caso, extracto de soja, han demostrado ser una buena fuente de compuestos bioactivos como los carotenoides, la vitamina C y los polifenoles con potencial actividad antioxidante, que deriva en un 98% de los componentes añadidos:  $\beta$ -caroteno y especialmente vitamina C y el 2% restante se puede atribuir a la fracción natural de polifenoles.
7. Los carotenoides cuantificados fueron luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno siendo éste último el mayoritario en todas las muestras como consecuencia de su adición como colorante. La presencia de naranja y zanahoria como ingredientes, se asocian con mayor contenido en  $\beta$ -caroteno y zeaxantina y con otros carotenoides detectados como criptoxantina,  $\alpha$ - y  $\epsilon$ -caroteno. Se han identificado clorofilinas en una sola muestra (M-16), responsables de su color verde.

8. La presencia de vitaminas C y E en las bebidas refrescantes mixtas procede fundamentalmente de la adición por el fabricante como aditivo (ácido ascórbico o acetato de  $\alpha$ -tocoferol respectivamente), en cantidad normalmente superior a la indicada en la etiqueta con objeto de asegurar dicha cantidad a lo largo de la vida útil del producto.

9. Los polifenoles de las bebidas mixtas tienen una procedencia natural. No se ha encontrado una correlación significativa con el extracto total de fruta empleada en su elaboración, pero su cantidad es significativamente superior en aquellas bebidas con extractos integrados por naranja, uva, manzana y/o piña.

10. La denominación comercial asignada a las bebidas no ha sido concluyente como factor diferencial. En este tipo de bebidas no existen criterios legales establecidos con los que se pueda establecer una comparativa para los parámetros estudiados. Sería de gran interés la existencia de un marco reglamentario para este tipo de productos, con el objetivo de garantizar una información clara al consumidor.

### **C) Respecto a las bebidas de tipo *smoothie***

**La evaluación de los parámetros nutricionales, sensoriales, funcionales y microbiológicos de los *smoothies* elaborados con leche o soja sometidos a altas presiones hidrostáticas como alternativa al tratamiento térmico señala que:**

11. La aplicación del tratamiento térmico (80 °C/3 min) y las distintas condiciones de la tecnología de altas presiones hidrostáticas (450-650 MPa/3 min/20 °C) a los *smoothies* no producen modificación de las características fisicoquímicas y preservan de forma equiparable su calidad nutricional valorada a partir de azúcares individuales, ácidos orgánicos y minerales analizados. La fracción vitamínica estudiada: vitamina C y provitamina A, fue más estable a las altas presiones que al tratamiento térmico por aplicación de HP.

12. La medición de los parámetros de color CIE Lab mostró en general menor estabilidad tras el tratamiento térmico, particularmente en lo referente a los parámetros L y b\* con respecto a la aplicación del procesado HP a intensidades de presión comprendidas entre 450 y 600 MPa. El análisis de las tres variables en conjunto demuestra que las bebidas pasteurizadas conducen a modificaciones de color ( $\Delta E$ ) sensiblemente superiores a las presurizadas.

13. El análisis sensorial no mostró diferencias significativas en los atributos color, sabor y consistencia tras los tratamientos aplicados. Sin embargo los *smoothies* tratados por HP conservaron mejor los atributos de aroma y aceptabilidad general, con respecto al tratamiento térmico.

14. Los resultados demuestran que el contenido de compuestos bioactivos de los *smoothies* procesados por alta presión es equiparable o incluso superior al de los *smoothies* frescos. La retención del ácido ascórbico es superior al 92% y el licopeno,  $\beta$ -caroteno y polifenoles totales incrementan su concentración después del tratamiento por HP. Tan solo los niveles de epicatequina, catequina y daidzeína se han visto comprometidos bajo ciertas condiciones de presión. El tratamiento térmico provoca una menor retención de ácido ascórbico, licopeno y  $\beta$ -caroteno, y menor estabilidad de la fracción de polifenoles.

15. La aplicación de HP mantuvo (450 y 550 MPa) o incrementó (600 y 650 MPa) la actividad antioxidante medida por FRAP y DPPH con respecto al fresco. El ácido ascórbico y los poli-

fenoles son los que más contribuyen a la capacidad antioxidante, que siempre fue claramente superior en las muestras sometidas a altas presiones con respecto a las pasteurizadas.

16. Desde un punto de vista microbiológico, los *smoothies* procesados por altas presiones en un rango entre 450 y 650 MPa mostraron una reducción significativa de la población de aerobios mesófilos (más de 3 log ufc/mL). No se detectó la presencia de enterobacterias, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, mohos ni levaduras en ninguna muestra. Desde esta perspectiva, el tratamiento de altas presiones resultó igualmente eficaz que el tratamiento térmico convencional.

17. Las distintas condiciones de presión elegidas muestran que el tratamiento a 450 MPa/3 min/20 °C es suficiente para producir un *smoothie* microbiológicamente seguro, con mínimos cambios sensoriales, mayor contenido de licopeno,  $\beta$ -caroteno y polifenoles, alta retención de ácido ascórbico y elevada actividad antioxidante en comparación con la bebida control y la bebida pasteurizada.

**De la evaluación del efecto del almacenamiento en refrigeración (4 °C) sobre dichos parámetros y la vida útil del producto se desprende que:**

18. Los °Brix y el perfil de azúcares permanecieron constantes a lo largo del almacenamiento de los *smoothies* procesados (TP y HPP) frente a las muestras frescas, donde se observa una disminución atribuible al crecimiento microbiano. Las fracciones de ácidos orgánicos y de minerales no se vieron afectadas en ningún tipo de muestra a tiempo final del almacenamiento en refrigeración.

19. Respecto al color CIE Lab, pese a que no hay un comportamiento uniforme, el almacenamiento a 4 °C afecta en menor medida a los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  en las muestras sometidas a alta presión frente a las tratadas térmicamente, si bien hay una influencia en función de la intensidad de presión aplicada y del tipo de *smoothie*.

20. Los compuestos bioactivos de los *smoothies* tratados por HP fueron relativamente estables después del almacenamiento en comparación con el producto fresco (licopeno) y con pérdidas menores y más graduales que las observadas en las muestras tratadas térmicamente, destacando menores pérdidas de  $\beta$ -caroteno, más graduales de ácido ascórbico y similares en relación a los polifenoles.

21. Las pérdidas derivadas del almacenamiento en relación a la capacidad antioxidante fueron inferiores en el caso de las muestras HP con respecto a las pasteurizadas, con porcentajes directamente proporcionales a la presión aplicada. La pérdida del ácido ascórbico produjo una disminución de la capacidad antioxidante de todas las muestras.

22. En el transcurso del almacenamiento, todas las muestras sufrieron un deterioro microbiano, que limitó la vida útil de los *smoothies* frescos a 30 días. La calidad microbiológica de las bebidas tratadas fue superior y su vida útil se extendió a más de 45 días. La reducción microbiana durante el almacenamiento fue equiparable en bebidas pasteurizadas y sometidas a menores presiones 450-550 MPa y se alcanzaron mejores resultados conforme se incrementó la intensidad del tratamiento de HP (600, 650 MPa).

## CONCLUSIONES FINALES

- Las bebidas refrescantes mixtas a base de fruta y leche o, en su caso, extracto de soja suponen una buena opción tanto para la hidratación como para contribuir al aporte de nutrientes esenciales y compuestos bioactivos con potencial antioxidante, que en su mayoría derivan de la incorporación como aditivos por el fabricante. Su fácil consumo y gran aceptabilidad sensorial los convierten en una opción muy interesante especialmente para el sector de población de niños y personas mayores.
- Los *smoothies* formulados han demostrado ser una fuente natural y concentrada de compuestos bioactivos, particularmente licopeno,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico y hesperidina, con potencial antioxidante e implicaciones positivas en la salud humana.
- El procesado por altas presiones (450-650 MPa/3 min/20 °C) demuestra la idoneidad como alternativa frente a los métodos tradicionales de tratamiento térmico (80 °C/3 min) de *smoothies* porque consigue mantener la calidad microbiológica y preserva en mayor medida los componentes responsables de la calidad nutricional, funcional y sensorial tras el tratamiento y posterior almacenamiento en refrigeración.

## 8. BIBLIOGRAFÍA





- Aboul-Enein, H. Y., Berczynski, P., & Kruk, I. (2013). Phenolic compounds: The role of redox regulation in neurodegenerative disease and cancer. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *13*, 385-398.
- Abu-Goukh, A. B. A., Shattir, A. E. T., & Mahdi, E. F. M. (2010). Physico-chemical changes during growth and development of papaya fruit. II: Chemical changes. *Agriculture and Biology Journal of North America*, *1*, 871-877.
- AIJN (2015). European Fruit Juice Association. Liquid Fruit 2015 Market Report. Bruselas. Disponible en web: [www.ajjn.org](http://www.ajjn.org)
- AIJN (2013). European Fruit Juice Association. Liquid Fruit 2013 Market Report. Bruselas. Disponible en web: [www.ajjn.org](http://www.ajjn.org)
- Agriello, M. F., Buonsante, M. E., Franco, C., Abeldaño, A., Neglia, V., et al. (2010). Escorbuto: una entidad que aún existe en la medicina moderna. *Medicina Cutánea Ibero-Latina Americana*, *38*, 76-80.
- Alothman, M., Bhat, R., & Karim, A. (2009). UV radiation-induced changes of antioxidant capacity of fresh-cut tropical fruits. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *10*, 512-516.
- Alves-Rodrigues, A., & Shao, A. (2004). The science behind lutein. *Toxicology Letters*, *150*, 57-83.
- Amazan, D. (2013). Estudio de eficacia de una fuente de vitamina E natural (D- $\alpha$ -tocopherol) en ganado porcino. Memoria para optar al grado de Doctor. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- Anthon, G. E., Sekine, Y., Watanabe, N., & Barrett, D. M. (2002). Thermal inactivation of pectin methylesterase, polygalacturonase, and peroxidase in tomato juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 6153-6159.
- Antón, M., Chapleau, N., Beaumal, V., Delépine, S., & de Lamballerie-Anton, M. (2001). Effect of high-pressure treatment on rheology of oil-in-water emulsions prepared with hen egg yolk. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *2*, 9-21.
- Arias Carmona, M. D. (2009). Caracterización físico-química y sensorial de nabiza y grelo (*Brassica rapa* L.). Memoria para optar al grado de Doctor. Universidad de Santiago de Compostela.
- Arjunan, K. P., Sharma, V. K., & Ptasinska, S. (2015). Effects of atmospheric pressure plasmas on isolated and cellular DNA-A review. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*, 2971-3016.
- Asavasanti, S., Ersus, S., Ristenpart, W., Stroeve, P., & Barrett, D. M. (2010). Critical electric field strengths of onion tissues treated by pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, *75*, 433-443.
- Asociación Española de Fabricantes de Zumos (ASOZUMOS). Dossier de prensa. Junio de 2015. Disponible en web: [www.asozumos.org](http://www.asozumos.org)
- Bao, S. X., Wang, Z. H., & Liu, J. S. (1999). X-Ray fluorescence analysis of trace elements in fruit juice. *Spectrochimica Acta B*, *54*, 1893-1897.
- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2011). Determination of vitamins E ( $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherol) and D (cholecalciferol and ergocalciferol) by liquid chromatography in milk, fruit juice and vegetable beverage. *Food Chemistry*, *134*, 559-563.
- Barba, F. J., Cortés, C., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2012). Study of antioxidant capacity and quality parameters in an orange juice-milk beverage after high-pressure processing treatment. *Food Bioprocess Technology*, *5*, 2222-2232.

- Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2012b). High pressure treatment effect on physicochemical and nutritional properties of fluid foods during storage: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *11*, 307-322.
- Barbosa-Cánovas, G. V., & Bermúdez-Aguirre, D. (2010). Procesamiento no térmico de alimentos - Nonthermal Processing of Food. *Scientia Agropecuaria*, *1*, 81-93.
- Bansal, B., & Chen, X. D. (2006). Effect of temperature and power frequency on milk fouling in an ohmic heater. *Food and Bioprocess Process*, *84*, 286-291.
- Barreiro Méndez, J. A., & Sandoval Briceño, A. J. (2006). Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Editorial Equinoccio. Caracas (Venezuela). ISBN 980-237-210-2.
- Barret, D. M., & Lloyd, B. (2012). Advanced preservation methods and nutrient retention in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*, 7-22.
- Basak, S., Ramaswamy, H. S., & Piette, J. P. G. (2002). High pressure destruction kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae* in single strength and concentrated orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *3*, 223-231.
- Belitz, H. D., & Grosch, W. (2004). Química de los alimentos. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza. España.
- Bello Gutiérrez, J. (2000). Conservación mediante aplicación de calor. En: Ciencia bromatológica. Principios generales de los alimentos. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. ISBN: 84-7978-447-4.
- Bernhoft, A. (2010). Bioactive compounds in plants-benefits and risks for man and animals. The Norwegian Academy of Science and Letters. Oslo, Norway.
- Bertsias, G., Linardakis, M., Mammias, I., & Kafatos, A. (2005). Fruit and vegetables consumption in relation to health and diet of medical students in Crete, Greece. *International Journal for Vitamins and Nutrition Research*, *75*, 107-117.
- Beveridge, T. (2002). Opalescent and cloudy fruit juices: formation and particle stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *42*, 317-337.
- Black, E. P., Setlow, P., Hocking, A. D., Stewart, C. M., Kelly, A. L., et al. (2007). Response of Spores to High-Pressure Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *6*, 103-119.
- Bozoglu, F., Alpas, H., & Kaletunç, G. (2004). Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, *40*, 243-247.
- Braddock, R. J. (1999). Handbook of Citrus By-Products and Processing Technology. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.
- Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (1998) Characterization of dietary fibre and the in vitro indigestible fraction of grape pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, *49*, 135-141.
- Bull, M. K., Zerdin, K., Howe, E., Goicoechea, D., Paramanandhan, P., et al. (2004). The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *5*, 135-149.
- Bursać Kovačević, D., Putnik, P., Dragović-Uzelac, V., Pedisić, S., Režek Jambrak, A., et al. (2016). Effects of cold atmospheric gas phase plasma on anthocyanins and color in pomegranate juice. *Food Chemistry*, *190*, 317-323.

- Butz, P., Keller, W. D., Tauscher, B., & Wolf, S. (1994). Ultra-high pressure processing of onions: chemical and sensory changes. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*, 27, 463-467.
- Butz, P., Edenharter, R., García, A. F., Fister, H., Merkel, C., et al. (2002). Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. *Food Research International*, 35, 295-300.
- Butz, P., Bognar, A., Dieterich, S., & Tauscher, B. (2007). Effect of High-Pressure Processing at Elevated Temperatures on Thiamin and Riboflavin in Pork and Model Systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1289-1294.
- Cámara, M., Pérez, M. L., López, R., Martí, N., Saura, N. D., et al. (2011). Nutrición y salud. El Libro del Zumo. Capítulo 6, pp. 117-140. Asociación Española de Fabricantes de Zumos, ASOZUMOS.
- Campos, R., & Gómez-Bengoechea, G. (2013). Las bebidas refrescantes y su impacto socioeconómico en España. Asociación de Bebidas Refrescantes ANFABRA - IESE Business School de la Universidad de Navarra.
- Cao, X. M., Xu, W. W., Liao, X. J., Hu, X. S., & Zhang, Y. (2011). Effect of high pressure processing steps on antioxidants and antioxidant activity in strawberry juice drinks. *Food and Nutrition in China*, 17, 30-35.
- Cao, X., Bi, X., Huang, W., Wu, J., Hu, X., et al. (2012). Changes of quality of high hydrostatic pressure processed cloudy and clear strawberry juices during storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 181-190.
- Carbonell-Capella, J. M., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2013). High pressure processing of fruit juice mixture sweetened with *Stevia rebaudiana* Bertoni: Optimal retention of physical and nutritional quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 18, 48-56.
- Cardello, A. V., Schutz, H. G., & Leshner, L. L. (2007). Consumer perceptions of foods processed by innovative and emerging technologies: a conjoint analytic study. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 73-83.
- Cardona Gálvez, M., Díaz Lorenzo, T., & Morejón Martí, P. (2008). Métodos de conservación de alimentos. En: Temas de higiene de los alimentos. Caballero Torres, A. E. Editorial Ciencias Médicas. La Habana. Capítulo 17, pp. 249-264.
- Carranco-Jáuregui, M. E., Calvo-Carrillo, M. C., & Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61, 233-241.
- Castro, I., Teixeira, J. A., Salengke, S., Sastry, S. K., & Vicente, A. A. (2004). Ohmic heating of strawberry products: electrical conductivity measurements and ascorbic acid degradation kinetics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 27-36.
- Chaiwanon, P., Puwastien, P., Nitithamyong, A., & Sirichakwal, P.P. (2000). Calcium fortification in soybean milk and in vitro bioavailability. *Journal Food Composition Analysis*, 13, 319-327.
- Chakraborty, S., Kaushik, N., Rao, P. S., & Mishra, H. N. (2014). High-pressure inactivation of enzymes: A review on its recent applications on fruit purees and juices. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13, 578-596.

- Chandrasekaran, S., Ramanathan, S., & Basak, T. (2013). Microwave food processing-A review. *Food Research International*, *52*, 243-261.
- Chaya-Romero, C., Guerrero, L., Claret, A., Varela, A., & Fernández-Ruiz, V. (2012). Aplicación de Altas Presiones Hidrostáticas en jamón serrano: efecto sobre la intención de compra y las expectativas del consumidor. Ponencia. VII Congreso Español de Ingeniería de Alimentos. Noviembre 2012. Ciudad Real (España).
- Chen, S. K., Tsai, M. L., Huang, J. R., & Chen, R. H. (2009). In vitro antioxidant activities of low-molecular-weight polysaccharides with various functional groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*, 2699-2704.
- Chen, C. H., Han, R. M., Liang, R., Fu, L. M., Wang, P., et al. (2011). Direct observation of the carotene reaction with hydroxyl radical. *Journal of Physical Chemistry B*, *115*, 2082-2089.
- Chen, D., Xi, H., Guo, X., Qin, Z., Pang, X., et al. (2013). Comparative study of quality of cloudy pomegranate juice treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *19*, 85-94.
- Cheng, L., Soh, C., Liew, S., & Teh, F. (2007). Effects of sonication and carbonation on guava juice quality. *Food Chemistry*, *104*, 1396-1401.
- Chun, J., Lee, J., Ye, L., Exler, J., & Eitenmiller, R. R. (2006). Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 196-204.
- Cilla Tatay, A. (2010). Actividad antioxidante y biodisponibilidad mineral de zumos de frutas adicionados de minerales y/o leche. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.
- Cilla, A., Lagarda, M. J., Alegría, A., de Ancos, B., Cano, M. P., et al. (2011). Effect of processing and food matrix on calcium and phosphorous bioavailability from milk-based fruit beverages in Caco-2 cells. *Food Research International*, *44*, 3030-3038.
- Cilla, A., Alegría, A., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., et al. (2012). Bioaccessibility of tocopherols, carotenoids, and ascorbic acid from milk- and soy-based fruit beverages: Influence of food matrix and processing. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 7282-7290.
- Cindric, I. J., Zeiner, M., Kröppl, M., & Stingeder, G. (2011). Comparison of sample preparation methods for the ICP-AES determination of minor and major elements in clarified apple juices. *Microchemical Journal*, *99*, 364-369.
- CODEX Alimentarius. Norma General del Codex para zumos (jugos) y néctares de frutas. CODEX STAN 247-2005.
- Código PAOS. Código de correulación de la publicidad de alimentos y bebidas dirigida a menores, prevención de la obesidad y salud. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2012).
- Cortés, C., Esteve, M. J., Frígola, A., & Torregrosa, F. (2004). Identification and quantification of carotenoids including geometrical isomers in fruit and vegetable juices by liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 2203-2212.
- Cortés, C., Esteve, M. J., Rodrigo, D., Frígola, A., & Torregrosa, F. (2005). Changes in carotenoids including geometrical isomers and ascorbic acid content in orange-carrot juice during frozen storage. *European Food Research and Technology*, *221*, 125-131.

- Cserhalmi, Zs., Sass-Kiss, A., Tóth-Markus, M., & Lechner, N. (2006). Study of pulsed electric field treated citrus juices. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7, 49-54.
- Cullen, P. J., Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K. (2009). Modelling approaches to ozone processing of liquid foods. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 125-136.
- Cullen, P. J., Tiwari, B. K., & Valdramidis, V. P. (2012) *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*: Academic Press. Elsevier Inc. ISBN: 978-0-12-381470-8.
- Da Costa, P. A., Ballus, C. A., Teixeira-Filho, J., & Teixeira Gody, H. (2010). Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International*, 43, 1603-1606.
- Damar, S., & Balaban, M. O. (2006) Review of dense phase CO<sub>2</sub> technology: Microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *Journal of Food Science*, 71, 1-11.
- Darvishi, H., Khostaghaza, M. H., & Najafi, G. (2013). Ohmic heating of pomegranate juice: electrical conductivity and pH change. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 12, 101-108.
- Dauchet, L., Amouyel, P., Hercberg, S., & Dallongeville, J. (2006). Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. *The Journal of Nutrition*, 136, 2588-2593.
- De Ancos, B., Sgroppo, S., Plaza, L., Cano, M. P. (2002). Possible nutritional and health-related value promotion in orange juice preserved by high-pressure treatment. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 790-796.
- De Arpe Muñoz, C. (2006). Otras bebidas hidratantes: características principales, valor nutritivo y aspectos legales sobre su consumo. En: El libro blanco de la hidratación, pp. 33-51. Ed: SEDCA (Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación).
- De Ruiter, F. E., & Dwyer, J. (2002) Consumer acceptance of irradiated foods: dawn of a new era? *Food Service Technology*, 2, 47-58.
- Del Pozo-Insfran, D., Balaban, M. O., & Talcott, S. T. (2006) Microbial stability, phytochemical retention, and organoleptic attributes of dense phase CO<sub>2</sub> processed muscadine grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5468-5473.
- Decisión de la Comisión de 23 de mayo de 2001 por la que se autoriza la comercialización de preparados pasteurizados a base de frutas obtenidos por medio de un tratamiento de pasteurización a alta presión con arreglo al Reglamento (CE) no 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo. DOUE núm. 151, de 7 de junio de 2001, páginas 42 a 43.
- Dede, S., Alpas, H., & Bayindirli, A. (2007). High hydrostatic pressure treatment and storage of carrot and tomato juices: antioxidant activity and microbial safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 773-782.
- Devlieghere, F., Vermeiren, L., & Debevere, J. (2004) New preservation technologies: possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14, 273-285.
- Di Scala, K., Vega-Gálvez, A., Ah-Hen, K., Núñez-Mancilla, Y., Tabilo-Munizaga, G., et al. (2013). Chemical and physical properties of aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel stored after high hydrostatic pressure processing. *Food Science and Technology*, 33, 52-59.

- Directiva 2001/112/CE del Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. DOUE núm. 10, de 12 de enero de 2002, páginas 58 a 66.
- Directiva 2009/106/CE de la Comisión, de 14 de agosto de 2009, por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. DOUE núm. 212, de 15 de agosto de 2009, páginas 42 a 44.
- Directiva 2012/12/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de abril de 2012, por la que se modifica la Directiva 2001/112/CE del Consejo relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. DOUE núm. 115, de 27 de abril de 2012, páginas 1 a 11.
- Duthie, G. G., Gardner, P. T., & Kyle, J. A. M. (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 599-603.
- EFSA. 2005. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Sodium. *EFSA Journal*, 209, 1-26.
- EFSA. 2006. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Scientific Committee on Food. Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. ISBN: 92-9199-014-0. Disponible en: <http://www.efsa.eu.int>
- Ehlbeck, J., Schnabel, U., Polak, M., Winter, J., Von Woedtke, T., et al. (2011). Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 44, 013002.
- Ehling, S., & Cole, S. (2011). Analysis of organic acids in fruit juices by liquid chromatography–mass spectrometry: An enhanced tool for authenticity testing. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2229-2234.
- Eischeid, A. C., Meyer, J. N., & Linden, K. G. (2009). UV disinfection of adenoviruses: molecular indications of DNA damage efficiency. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 23-28.
- El-Samahay, S. K., Youssef, B. M., Askar, A. A., & Swailam, H. M. M. (2000). Microbiological and chemical properties of irradiated mango. *Journal of Food Safety*, 20, 139-156.
- Élez, P., Aguiló, I., & Martín-Belloso, O. (2006). Inactivation of orange juice peroxidase by high-intensity pulsed electric fields as influenced by process parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 71-81.
- Elez Garofulić, I., Režek Jambrak, A., Milošević, S., Dragović-Uzelac, V., Zorić, Z., et al. (2015). The effect of gas phase plasma treatment on the anthocyanin and phenolic acid content of sour cherry Marasca (*Prunus cerasus* var. Marasca) juice. *LWT-Food Science and Technology*, 62, 894-900.
- Esteve, M. J., Palop, S., Barba, F. J., & Frígola, A. (2009). The effects of non-thermal processing on carotenoids in orange juice. *Czech Journal of Food Science*, 27, 304-306.
- Estrategia NAOS. Estrategia para la Nutrición, Actividad Física y Prevención de la Obesidad. Ministerio de Sanidad y Consumo. 2005.
- Farkas, D. F., & Hoover, D. G. (2000). High Pressure Processing. *Journal of Food Science*, 65, 47-64.

- Fernández-García, A., Butz, P., Bognàr, A., & Tauscher, B. (2001). Antioxidative capacity, nutrient content and sensory quality of orange juice and an orange-lemon-carrot juice product after high pressure treatment and storage in different packaging. *European Food Research and Technology*, 213, 290-296.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., et al. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 438-450.
- Ferrari, G., Maresca, P., & Ciccarone, R. (2010). The application of high hydrostatic pressure for the stabilization of functional foods: pomegranate juice. *Journal of Food Engineering*, 100, 245-253.
- Ferrentino, G., Plaza, M., Ramirez-Rodriguez, M., Ferrari, G., & Balaban, M. (2009). Effects of dense phase carbon dioxide pasteurization on the physical and quality attributes of a red grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 74, 333-341.
- FESNAD. (2010). Ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población española. *Actividad Dietética*, 14, 196-197.
- Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. *Nutrients*, 6, 466-488.
- Foley, D. M., Pickett, K., Varon, J., Lee, J., Min, D. B., et al. (2002). Pasteurization of Fresh Orange Juice Using Gamma Irradiation: Microbiological, Flavor, and Sensory Analyses. *Journal of Food Science*, 67, 1495-1501.
- Fox, M., Esveld, D., & Boom, R. (2007). Conceptual design of a mass parallelized PEF micro reactor. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 484-491.
- Fraser, P. D., & Bramley, P. M. (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43, 228-265.
- FSA, Food Standards Agency. (2010). Eatwell: 8 tips for making healthier choices. Online: <http://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/publication/eatwell0708.pdf>
- Fu, Y. C. (2004). Fundamentals and industrial applications of microwave and radio frequency in food processing. En: *Food processing: Principles and applications*. J. S. Smith, & Y. H. Hui (Eds.). Blackwell, Iowa.
- Gabrovská, D., Paulicková, I., Mosková, E., Fiedlerová, V, Kocurova, K., et al. (2005). Changes in selected vitamins, microorganism counts and sensory quality during storage of pressurized sprouted seed of alfalfa (*Medicago sativa*, L.). *Czech Journal of Food Science*, 23, 246-250.
- García Alonso, F. J. (2005). Evaluación *in vitro* e *in vivo* de la funcionalidad de un producto rico en antioxidantes. Memoria para optar al grado de Doctor Europeo. Universidad de Murcia.
- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58, 537-552.
- García-Parra, J., González-Cebrino, F., & Ramírez, R. (2014). Tecnologías emergentes de procesado de alimentos: altas presiones hidrostáticas. Artículo web de 23 de mayo de 2014. <http://www.interempresas.net/Alimentaria/Articulos/123333-Tecnologias-emergentes-de-procesado-de-alimentos-altas-presiones-hidrostaticas.html>

- Gardner, P. T., White, T. A. C., McPhail, D. B., & Duthie, G. G. (2000). The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chemistry*, *68*, 471-474.
- Gasperi, F., Aprea, E., Biasioli, F., Carlin, S., Endrizzi, I., et al. (2009). Effects of supercritical CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O pasteurisation on the quality of fresh apple juice. *Food Chemistry*, *115*, 129-136.
- Gayosso-García Sancho, L. E., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2011). Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International*, *44*, 1284-1291.
- Geveke, D. J., & Brunkhorst, C. (2008). Radio frequency electric fields inactivation of *Escherichia coli* in apple cider. *Journal of Food Engineering*, *85*, 215-221.
- Gimeno, E., Calero, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., de la Torre, et al. (2000). Simultaneous determination of  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *881*, 255-259.
- Giner, J., Gimeno, V., & Espachs, A. (2000). Inhibition of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pectin methylesterase by pulsed electric fields. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *1*, 57-67.
- Giner, J., Ortega, M., Messegue, A. M., Gimeno, V., Barbosa-Canovas, G. V., et al. (2002). Inactivation of peach polyphenoloxidase by exposure to pulsed electric fields. *Journal of Food Science*, *67*, 1467-1472.
- Global Industry Analysts (2010). Smoothies: a global strategic business report. [http://www.prweb.com/releases/smoothies\\_market/frozen\\_mix\\_smoothie/prweb3808804.htm](http://www.prweb.com/releases/smoothies_market/frozen_mix_smoothie/prweb3808804.htm)
- Gómez-López, V. M., Devlieghere, F., Bonduelle, V., & Debevere, J. (2005). Factors affecting the inactivation of microorganisms by intense light pulses. *Journal of Applied Microbiology*, *99*, 460-470.
- Gómez-López, V. M., Koutchma, T., & Linden, K. (2012). Ultraviolet and Pulsed Light Processing of Fluid Foods. En: Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods. Ed: Cullen, Tiwari, & Valdramidis. Elsevier. Págs: 185-223.
- Gómez-Ordóñez, E., Alonso, E., & Rupérez, P. (2010). A simple ion chromatography method for inorganic anion analysis in edible seaweeds. *Talanta*, *82*, 1313-1317.
- Gomis, D. B., Fernández, M. P., & Gutiérrez Alvarez, M. D. (2000). Simultaneous determination of fat-soluble vitamins and provitamins in milk by microcolumn liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *891*, 109-114.
- Góngora-Nieto, M. M., Sepulveda, D., Pedrow, P., Barbosa-Cánovas, G., & Swanson, B. (2002). Food processing by pulsed electric fields: Treatment delivery, inactivation level, and regulatory aspects. *Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie*, *35*, 375-388.
- Goodman, C. L., Fawcett, S., & Barringer, S. A. (2002). Flavor, Viscosity, and Color Analyses of Hot and Cold Break Tomato Juices. *Journal of Food Science*, *67*, 404-408.
- Gorinstein, S., Zachwieja, Z., Katrich, E., Pawelzik, E., Haruenkit, R., et al. (2004). Comparison of the contents of the main antioxidant compounds and the antioxidant activity of white grapefruit and his new hybrid. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, *37*, 337-343.

- Gorinstein, S., Park, Y. S., Heo, B. G., Namiesnik, J., Leontowicz, M., et al. (2009). A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. *European Food Research and Technology*, 228, 903-911.
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, M. C., Blanco-Navarro, I., & Pérez-Sacristán, B. (2010). Suitability of ultra-high performance liquid chromatography for the determination of fat-soluble nutritional status (vitamins A, E, D, and individual carotenoids). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1389-1393.
- Gueguen, S., Herbeth, B., Siest, G., & Leroy, P. (2002). An isocratic liquid chromatographic method with diode-array detection for the simultaneous determination of  $\gamma$ -tocopherol, retinol and five carotenoids in human serum. *Journal of Chromatographic Science*, 40, 69-76.
- Guerrero-Beltrán, J., & Barbosa-Cánovas, G. (2004). High hydrostatic pressure processing of peach puree with and without antibrowning agents. *International Journal of Food Processing and Preservation*, 28, 69-85.
- Guerrero-Beltrán, J. A., Welti-Chanes, J., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Ultraviolet-C Light processing of grape, cranberry and grapefruit juices to inactivate *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 916-932.
- Gundersen, T. E., & Blomhoff, R. (2001). Qualitative and quantitative liquid chromatographic determination of natural retinoids in biological samples. *Journal of Chromatography A*, 935, 13-43.
- Gurzau, E. S., Neagu, C., & Gurzau, A. E. (2003). Essential metals-case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56, 190-200.
- Hayashi, R., Kawamura, Y., Nakasa, T., & Okinaka, O. (1989). Application of High Pressure to Food Processing: Pressurization of Egg White and Yolk, and Properties of Gels Formed. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 2935-2939.
- Heinz, V., & Buckow, R. (2010). Food preservation by high pressure. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 5, 73-81.
- Hendrickx, M. E. G., & Knorr, D. (2002). *Ultra High Pressure Treatments of Foods*. Food Engineering Series. Springer US. ISBN: 0306472783, 9780306472787.
- Henry, C. J. (2010). Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, 64, 657-659.
- Hernández-Carrión, M., Hernando, I., & Quiles, A. (2014). High hydrostatic pressure treatment as an alternative to pasteurization to maintain bioactive compound content and texture in red sweet pepper. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 26, 76-85.
- Herrero-Barbudo, M. C., Granado-Lorencio, F., Blanco-Navarro, I., & Olmedilla-Alonso, B. (2005). Retinol,  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol and carotenoids in natural and vitamin A- and E-fortified dairy products commercialized in Spain. *International Dairy Journal*, 15, 521-526.
- Hoffmann-Ribani, R., Huber, L. S., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2009). Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 263-268.
- Holden, J. M., Eldridge, A. L., Beecher, G. R., Buzzard, I. M., Bhagwat, A. S., et al. (1999). Carotenoid Content of U.S. Foods: An Update of the Database. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 169-196.
- Hoover, D. G., Metrick, C., Papineau, A. M., Farkas, D. F., & Knorr, D. (1989). Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms. *Food Technology*, 43, 99-107.

- Hounsome, B., Hounsome, B., Tomos, D., & Edward-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of Food Science*, *73*, 48-65.
- Hsu (2008). Evaluation of processing qualities of tomato juice induced by thermal and pressure processing. *LWT - Food Science and Technology*, *41*, 450-459.
- Hsu, K. C., Tan, F. J., & Chi, H. Y. (2008). Evaluation of microbial inactivation and physicochemical properties of pressurized tomato juice during refrigerated storage. *LWT – Food Science and Technology*, *41*, 367-375.
- Huang, Y., Rasco, B. A., & Cavinato, A. G. (2009). Fruit juices. En: *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. 978-0-12-374136-3 (pp. 355–375). Elsevier Inc.
- Huang, W., Bi, X., Zhang, X., Liao, X., Hu, X., et al. (2013). Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *18*, 74-82.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, *126*, 1821-1835.
- Indrawati, I., Arroqui, C., Messagie, I., Nguyen, M., Van Loey, A., et al. (2004). Comparative study on pressure and temperature stability of 5- methyltetrahydrofolic acid in model systems and in food products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 4854-492.
- Ismail H. I., Chan, K. W., Mariod A. A., & Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, *119*, 643-647.
- Iwase, H. (2002). Simultaneous sample preparation for high-performance liquid chromatographic determination of vitamin A and b-carotene in emulsified nutritional supplements after solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, *463*, 21-29.
- Jaeger, H., Janositz, A., Knorr, D. (2010). The Maillard reaction and its control during food processing. The potential of emerging technologies. *Pathologie Biologie*, *58*, 207-213.
- Johnson, L. E. (1995). Food technology of the antioxidant nutrients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *35*, 149-159.
- Jolie, R. P., Duvetter, T., Houben, K., Clynen, E., Sila, D. N., et al. (2009). Carrot pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: Study of activity, stability and inhibition. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *10*, 601-609.
- Joyce, E., Mason, T. J., Phull, S. S., & Lorimer, J. P. (2003). The development and evaluation of electrolysis in conjunction with power ultrasound for the disinfection of bacterial suspensions. *Ultrasonics Sonochemistry*, *10*, 231-234.
- Jun, X. (2006). Application of high high hydrostatic pressure processing of food to extracting lycopene from tomato paste waste. *High Pressure Research*, *26*, 33-41.
- Jung, S., Murphy, P. A., & Sala, I. (2008). Isoflavone profiles of soymilk as affected by high-pressure treatments of soymilk and soybeans. *Food Chemistry*, *111*, 592-598.
- Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., & Gallego, M. (2011). Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction. *Talanta*, *84*, 924-930.
- Juturu, V. (2008). Resveratrol and cardiovascular disease. *Current Nutrition & Food Science*, *4*, 227-230.

- Kadkhodae, R., & Povey, M. J. W. (2008). Ultrasonic inactivation of *Bacillus*  $\alpha$ -amylase. I. effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonics Sonochemistry*, *15*, 133-142.
- Kale, R. V., Pandhare, G. R., Satwase, N. A., & Goswami, D. (2012). Effect of different concentration of Orange juice on quality characteristics of soya milk blended beverage. *Journal Food Processing Technology*, *3*:140. DOI: 10.4172/2157-7110.1000140.
- Kalili, K. M., & de Villiers, A. (2011). Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. *Journal of Separation Science*, *34*, 854-876.
- Kao, T. H., Wu, W. M., Hung, C. F., Wu, W. B., & Chen, B. H. (2007). Anti-inflammatory effects of isoflavone powder produced from soybean cake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*, 11068-11079.
- Karaca, H., & Velioglu, Y. S. (2007). Ozone Applications in Fruit and Vegetable Processing. *Food Reviews International*, *23*, 91-106.
- Karppi, J., Nurmi, T., Olmedilla-Alonso, B., Granado-Lorencio, F., & Nyssonen, K. (2008). Simultaneous measurement of retinol, alpha-tocopherol and six carotenoids in human plasma by using isocratic reversed-phase HPLC method. *Journal of Chromatography B*, *867*, 226-232.
- Kaushik, N., Reddy Gondi, A., Rana, R., & Srinivasa Rao, P. (2015). Application of fuzzy logic technique for sensory evaluation of high pressure processed mango pulp and litchi juice and its comparison to thermal treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. doi: 10.1016/j.ifset.2015.08.007.
- Keenan, D. F., Brunton, N. P., Gormley, T. R., Butler, F., Tiwari, B. K., et al. (2010). Effect of thermal and high hydrostatic pressure processing on antioxidant activity and colour of fruit smoothies. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *11*, 551-556.
- Keenan, D. F., Röbke, C., Gormley, R., Butler, F., & Brunton, N. P. (2012). Effect of high hydrostatic pressure and thermal processing on the nutritional quality and enzyme activity of fruit smoothies. *LWT - Food Science and Technology*, *45*, 50-57.
- Keener, K. M. (2008). Atmospheric non-equilibrium plasma. *Encyclopedia of Agricultural, Food and Biological Engineering*, *1*, 1-5.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroğlu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, *91*, 187-192.
- Kelebek, H., & Selli, S. (2011). Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dörtöyl (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. *Journal Science of Food and Agriculture*, *91*, 1855-1862.
- Kim, H. Y., Kim, S. H., Choi, M. J., Min, S. G., & Kwak, H. S. (2008). The Effect of High Pressure-Low Temperature Treatment on Physicochemical Properties in Milk. *Journal of Dairy Science*, *91*, 4176-4182.
- Kincal, D., Hill, W., Balaban, M., Portier, K., Sims, C., Wei, C., & Marshall, M. (2006) A Continuous High-Pressure Carbon Dioxide System for Cloud and Quality Retention in Orange Juice. *Journal of Food Science*, *71*, 338-344.
- King, B. M., Arents, P., Bouter, N., Duineveld, C. A. A., Meyners, M., et al. (2006). Sweetener/sweetness-induced changes in flavor perception and flavor release of fruity and green character in beverages. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 2671-2677.
- Kingsley, D., Holliman, D. R., Calci, K. R., Chen, H., Flick, G. J., et al. (2007). Inactivation of a norovirus by high-pressure processing. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*, 581-585.

- Kishimoto, Y., Saito, N., Kurita, K., Shimokado, K., Maruyama, N., et al. (2013). Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 430, 579-584.
- Kitts, D.D. (2005). Antioxidant properties of casein-phosphopeptides. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 549-554.
- Kleber, N., Maier, S., & Hinrichs, J. (2007). Antigenic response of bovine  $\beta$ -lactoglobulin influenced by ultra-high pressure treatment and temperature. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 39-45.
- Klimczak, I., Malecka, M., Szlachta, M., & Gliszczynska-Świgło, A. (2007). Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313-322.
- Knirsch, M. C., Alves dos Santos, C., Martins de Oliveira Soares Vicente, A. A., & Vessoni Penna, T. C. (2010). Ohmic heating-a review. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 436-441.
- Knorr, D. (1993) Effects of high-hydrostatic-pressure processes on food safety and quality. *Food Technology*, 47, 156-161.
- Knorr, D., Heinz, V., & Buckow, R. (2006). High pressure application for food biopolymers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1764, 619-631.
- Kopsell, D. A., & Kopsell, D. E. (2010). Carotenoids in vegetables: biosynthesis, occurrence, impacts on human health, and potential for manipulation, pp. 645-662. En: R. Ross & V.R. Preedy (Dds.). *Bioactive Food in Promoting Health: Fruits and Vegetables*. Elsevier, St. Louis.
- Kouniaki, S., Kajda, P., & Zabetakis, I. (2004). The effect of high hydrostatic pressure on anthocyanins and ascorbic acid in blackcurrants (*Ribes nigrum*). *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 281-286.
- Koutchma, T., Parisi, B., & Patazca, E. (2007). Validation of UV coiled tube reactor for fresh fruit juices. *Journal of Environmental Science and Engineering*, 6, 319-328.
- Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- Krishnamurthy, K., Demirci, A., & Irudayaraj, J. M. (2007). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow-through pulsed UV-light treatment system. *Journal of Food Science*, 72, M233-239.
- Kruk, Z. A., Yun, H., Rutley, D. L., Lee, E. J., Kim, Y. J., et al. (2011). The effect of high pressure on microbial population, meat quality and sensory characteristics of chicken breast fillet. *Food Control*, 22, 6-12.
- Laaksonen, O., Sandell, M., Nordlund, E., Heiniö, R. L., Malinen, H. L., et al. (2012). The effect of enzymatic treatment on blackcurrant (*Ribes nigrum*) juice flavour and its stability. *Food Chemistry*, 130, 31-41.
- Lado, B. H., & Yousef, A. E. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4, 433-440.
- Lakkakula, N. R., Lima, M., & Walker, T. (2004). Rice bran stabilization and rice bran oil extraction using ohmic heating. *Biore-source Technology*, 92, 157-161.
- Landl, A., Abadias, M., Sárraga, C., Viñas, I., & Picouet, P. A. (2010). Effect of high pressure processing on the quality of acidified Granny Smith apple purée product. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 557-564.

- Landon, S. (2007). Fruit juice nutrition and health. *Food Australia*, 59, 533-538.
- Lee, H. S., & Coates, G. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Food Science and Technology*, 36, 153-156.
- Lee, J. W., Kim, J. K., Srinivasan, P., Choi, J. I., Kim, J. H., et al. (2009). Effect of gamma irradiation on microbial analysis, antioxidant activity, sugar content and color of ready-to-use tamarind juice during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 101-105.
- Levent, A., Ekin, S., & Oto, G. (2010). Simultaneous determination of retinol, retinyl palmitate and  $\beta$ -carotene in rat serum treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and *Hypericum Perforatum* L. by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Central European Journal of Chemistry*, 8, 108-115.
- Li, R., Wang, Y., Wang, S., & Liao, X. (2015). A Comparative Study of Changes in Microbiological Quality and Physicochemical Properties of  $N_2$ -Infused and  $N_2$ -Degassed Banana Smoothies After High Pressure Processing. *Food and Bioprocess Technology*, 8, 333-342.
- Lin, C. H., & Chen, B. H. (2003). Determination of carotenoids in tomato juice by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1012, 103-109.
- Linton, M., & Patterson, M. F. (2000). High pressure processing of foods for microbiological safety and quality. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 47, 175-182.
- Linton, M., Mc Clements, J. M. J., & Patterson, M. F. (2003). Changes in the microbiological quality of shellfish, brought about by treatment with high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Science & Technology*, 38, 713-727.
- Liu, R. H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 517-520.
- Liu, X., Gao, Y., Peng, X., Yang, B., Xu, H., et al. (2008) Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (*Beta vulgaris* L.) extract with high pressure carbon dioxide. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 24-31.
- Liu, Y., Zhao, X. Y., Zou, L., & Hu, X. S. (2013). Effect of high hydrostatic pressure on overall quality parameters of watermelon juice. *Food Science and Technology International*, 19, 197-207.
- Londoño-Londoño, J. (2011). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. *Desarrollo y Transversalidad*, 129-162. Serie Lasallista Investigación y Ciencia, Editorial Artes y Letras. Colombia.
- López-Malo, A., Palou, E., Jiménez-Fernández, M., Alzamora, S. M., & Guerrero, S. (2005). Multifactorial fungal inactivation combining thermosonication and antimicrobials. *Journal of Food Engineering*, 67, 87-93.
- López Ortíz, C. M., Prats Moya, M. S., & Berenguer Navarro, V. (2006). A rapid chromatographic method for simultaneous determination of  $\beta$ -sitosterol and tocopherol homologues in vegetable oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 141-149.
- Lorente, J., Valero, M., de Ancos, B., Martí, N., García, S., et al. (2011). Aspectos industriales. En: El Libro del zumo. ASOZUMOS, Asociación Española de Fabricantes de Zumos. ISBN: 978-84-92928-11-8.
- Loveday, S. M., & Singh, H. (2008). Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 657-668.

- Ludikhuyze, L., Van Loey, A., Oey, I., & Hendrickx, M. (2002). High pressure processing of fruit and vegetables. En: *Ultra High Pressure Treatments of Foods*. Hendrickx, M. & Knorr, D. New York, Kluwer Academic.
- Maiani, G., Periago Castón, M. J., Catasta, G., Tori, E., Goñi Cambrodón, I., et al. (2009). Carotenoids: actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53, 1-25.
- Malone, A. S., Shellhammer, T. H., & Courtney, P. D. (2002). Effects of High Pressure on the Viability, Morphology, Lysis, and Cell Wall Hydrolase Activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4357-4363.
- Manchón, N., Mateo-Vivaracho, L., d'Arriago, M., García-Lafuente, A., Guillamón, E., et al. (2013). Distribution patterns of polyphenols and alkaloids in instant coffee, soft and energy drinks, and tea. *Czech Journal of Food Sciences*, 31, 483-500.
- Mansor, A., Shamsudin, R., Adzahan, N. M., & Hamidon, M. N. (2014). Efficacy of Ultraviolet Radiation as Non-thermal Treatment for the Inactivation of *Salmonella typhimurium* TISTR 292 in Pineapple Fruit Juice. *Agriculture and Agricultural Science Proceedings*, 2, 173-180.
- Marra, F., Zhang, L., & Lyng, J. G. (2009). Radio frequency treatment of foods: Review of recent advances. *Journal of Food Engineering*, 91, 497-508.
- Martínez, A., Gil, A., Gil, M., & Ferreres, F. (2008). A comparative study of flavonoid compounds, vitamin C and antioxidant properties of baby leaf *Brassicaceae* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2330-2340.
- Martínez-Flores, H. E., Garnica-Romo, M. G., Bermúdez-Aguirre, D., Pokhrel, P. R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2015). Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. *Food Chemistry*, 172, 650-656.
- Marx, M., Schieber, A., & Carle, R. (2000). Quantitative determination of carotene stereo-isomers in carrot juices and vitamin supplemented (ATBC) drinks. *Food Chemistry*, 70, 403-408.
- Masschalck, B., Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2001). High pressure increases bactericidal activity and spectrum of lactoferrin, lactoferricin and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 325-332.
- Mateos-Aparicio, I., Redondo-Cuenca, A., Villanueva-Suárez, M. J., Zapata-Revilla, M. A., & Tenorio-Sanz, M. D. (2010). Pea pod, broad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 1467-1470.
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38, 1175-1188.
- McInerney, J. K., Seccafien, C. A., Stewart, C. M., & Bird, A. R. (2007). Effects of high pressure processing on antioxidant activity, and total carotenoid content and availability, in vegetables. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 543-548.
- Meglia, G. E., Jensen, S. K., Lauridsen, C., & Persson-Waller, K. (2006).  $\alpha$ -tocopherol concentration and stereoisomer composition in plasma and milk from dairy cows fed natural or synthetic vitamin E around calving. *Journal of Dairy Research*, 73, 227-234.

- Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54, 149-154.
- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, 101, 1145-1150.
- Mélo, E. A., Lima, V. L., & Maciel, M. I. (2006). Polyphenol, ascorbic acid and total carotenoid contents in common fruits and vegetables. *Brazilian Journal of Food Technology*, 9, 89-94.
- Mena, A. (2011). Aspectos normativos. El Libro del Zumo, cap. 3. Ed: ASOZUMOS, Asociación Española de Fabricantes de Zumos. ISBN: 978-84-92928-11-8.
- Mendiola, J. A., Marín, F. R., Señoráns, F. J., Reglero, G., Martín, P. J., et al. (2008). Profiling of different bioactive compound in functional drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1188, 234-241.
- Mendoza, B. R., Pons, S. M., Bargalló, A. I. C., & López-Sabater, M. C. (2003). Rapid determination by reversed phase high performance liquid chromatography of vitamins A and E in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, 1018, 197-202.
- Menéndez Aguirre, O., Evangelista Lozano, S., Arenas Ocampo, M., Bermúdez Torres, K., del Villar Martínez, A., et al. (2006). Cambios en la actividad de alfa-amilasa, pectinmetilesterasa y pologalacturonasa durante la maduración del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa* degener). *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 31, 728-733.
- Mertz, C., Brat, P., Caris-Veyrat, C., & Gunata, Z. (2010). Characterization and thermal lability of carotenoids and vitamin C of tamarillo fruit (*Solanum betaceum* Cav.). *Food Chemistry*, 119, 653-659.
- Michael, M., Phebus, R. K., Thippareddi, H., Subbiah, J., Birla, S. L., et al. (2014). Validation of radio-frequency dielectric heating system for destruction of *Cronobacter sakazakii* and *Salmonella* species in nonfat dry milk. *Journal of Dairy Science*, 97, 7316-7324.
- Miján, A., Pérez, A., & Martín, E. (2001). Necesidades de agua y electrolitos. En: SENC. Guías alimentarias para la población española. Madrid: IM&C. 2001:289-302.
- Miller, G., & Kaspar, C. W. (1994). *Escherichia coli* 0157:H7 acid tolerance and survival in apple cider. *Journal of Food Protection*, 57, 460-464.
- Miyake, Y., Suzuki, E., Ohya, S., Fukumoto, S., Hiramitsu, M., et al. (2006). Lipid-lowering effect of eriocitrin, the main flavonoid in lemon fruit, in rats on a high-fat and high-cholesterol diet. *Journal of Food Science*, 71, 633-637.
- Molto-Puigmartí, C., Permanyer, M., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2011). Effects of pasteurisation and high-pressure processing on vitamin C, tocopherols and fatty acids in mature human milk. *Food Chemistry*, 124, 697-702.
- Monge-Rojas, R., & Campos, H. (2011). Tocopherol and carotenoid content of foods commonly consumed in Costa Rica. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 202-216.
- Mor-Mur, M., Escriu, R., & Yuste, J. (2014). Microbiological Aspects of High-Pressure Processing. En: *Emerging Technologies for Food Processing*. Ed: Da-Wen Sun. University College Dublin, National University of Ireland, Dublin, Ireland.

- Morales de la Peña, M., Salvia Trujillo, L., Rojas Graü, M. A., & Martín Belloso, O. (2010). Impact of high intensity pulsed electric field on antioxidant properties and quality parameters of a fruit juice–soymilk beverage in chilled storage. *LWT-Food Science and Technology*, *43*, 872-881.
- Morales de la Peña, M., Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2011). Impact of high intensity pulsed electric fields or heat treatments on the fatty acid and mineral profiles of a fruit juice-soymilk beverage during storage. *Food Control*, *22*, 1975-1983.
- Morales de la Peña, M., Salvia Trujillo, L., Rojas Graü, M. A., & Martín Belloso, O. (2011b). Changes on phenolic and carotenoid composition of high intensity pulsed electric field and thermally treated fruit juice-soymilk beverage during refrigerated storage. *Food Chemistry*, *129*, 982-990.
- Morris, M. C., Schneider, J. A., Li, H., Tangney, C. C., Nag, S., et al. (2015). Brain tocopherols related to Alzheimer's disease neuropathology in humans. *Alzheimer's & Dementia*, *11*, 32-39.
- Mortensen, A., Geppel, A. (2007). A HPLC-MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *8*, 419-425.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martín-Belloso, O. (2008). Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. *Food Microbiology*, *25*, 479-491.
- Mota, M. J., Lopes, R. P., Delgadillo, I., Saraiva, J. A. (2015). Probiotic yogurt production under high pressure and the possible use of pressure as an on/off switch to stop/start fermentation. *Process Biochemistry*, *50*, 906-911.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Tonello-Samson, C., Welti-Chanes, J., & Torres, J. A. (2011). High-Pressure Processing Technologies for the Pasteurization and Sterilization of Foods. *Food and Bioprocess Technology*, *4*, 969-985.
- Müller, L., Theile, K., & Böhm, V. (2010). In vitro antioxidant activity of tocopherols and tocotrienols and comparison of vitamin E concentration and lipophilic antioxidant capacity in human plasma. *Molecular Nutrition & Food Research*, *54*, 731-742.
- Muller, A., Stahl, M. R., Graef, V., Franz, C. M., & Huch, M. (2011). UV-C Treatment of Juices to Inactivate Microorganisms using Dean Vortex Technology. *Journal of Food Engineering*, *107*, 268-275.
- Nelson, C. H. (2001). Risk Perception, Behavior, and Consumer Response to Genetically Modified Organisms. *American Behavioral Scientist*, *44*, 1371-1388.
- Niemira, B. A., & Fan, X. (2009). Ionizing radiation enhances microbial safety of fresh and fresh-cut fruits and vegetables while maintain product quality. En: *Microbial Safety of Fresh Produce*. X. Fan, B. A. Niemira, C. J. Doona, F. Feeherry, & R. B. Gravani (Eds.). Blackwell, Ames, IA.
- Niemira, B. A., & Gao, M., (2012). Irradiation of Fluid Foods. En: *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. P. J. Cullen, B. Tiwari, & V. P. Valdramidis (Eds.). Elsevier Inc.
- Nienaber, U., & Shellhammer, T. H. (2001). High-Pressure Processing of Orange Juice: Kinetics of Pectinmethylesterase Inactivation. *Journal of Food Science*, *66*, 328-331.
- Niu, L., Wu, J., Liao, X., Chen, F., Wang, Z., et al. (2008). Physicochemical characteristics of orange juice samples from seven cultivars. *Agricultural Sciences in China*, *7*, 41-47.

- Nomura, K., & Iwahashi, H. (2014). Pressure-regulated fermentation: a revolutionary approach that utilizes hydrostatic pressure. *Reviews in Agricultural Science*, 2, 1-10.
- Norma ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique.
- Norma ISO 11290-1:1996/A1: 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method. Amd 1:2004. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.
- Norma ISO 16649-1:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* -- Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.
- Norma ISO 21527-1:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
- Norma ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae -- Part 2: Colony-count method.
- O'Donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P., & Cullen, P. J. (2010) Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21, 358-367.
- Odrizola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., Hernández-Jover, T., & Martín-Belloso, O. (2009). Carotenoid and phenolic profile of tomato juices processed by high intensity pulsed electric fields compared with conventional thermal treatments. *Food Chemistry*, 112, 258-266.
- Odrizola-Serrano, I., Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2013). Pulsed electric fields processing effects on quality and health-related constituents of plant-based foods. *Trends in Food Science & Technology*, 29, 98-107.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 320-328
- Oey, I., Van der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008b). Does high pressure processing influence nutritional aspects of plant based food systems? *Trends in Food Science and Technology*, 19, 300-308.
- Ofori, J. A., & Hsieh, Y. H. P. (2013). Novel Technologies for the Production of Functional Foods. En: *Bio-Nanotechnology: A Revolution in Food, Biomedical and Health Sciences*. Ed: D. Bagchi, M. Bagchi, H. Moriyama, & F. Shahidi. John Wiley & Sons, Ltd.
- Oms-Oliu, G., Odrizola-Serrano, I., & Martín-Belloso, O. (2012). The effects of non-thermal technologies on phytochemicals. En: *Phytochemicals – A global perspective of their role in nutrition and health*. Venketeshwer Rao (Ed.). ISBN: 978-953-51-0296-0.
- O'Neil, C. E., Nicklas, T. A., Zhanovec, M., & Fulgoni, V. L. (2011). Diet quality is positively associated with 100% fruit juice consumption in children and adults in the United States: NHANES 2003-2006. *Nutrition Journal*, 13, 10-17.

- Oyane, I., Takeda, T., Oda, Y., Sakata, T., Furuta, M., et al. (2009). Comparison between the effects of ultrasound and  $\gamma$ -rays on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: analyses of cell membrane permeability and DNA or RNA synthesis by flow cytometry. *Ultrasonics Sonochemistry*, *16*, 532-536.
- Pandurangi, S., Balasubramaniam, V. M., Tao, Y., & Sun, D. W. (2014). High-Pressure Processing of Salads and Ready Meals. En: *Emerging Technologies for Food Processing*. Ed: Da-Wen Sun. *University College Dublin, National University of Ireland, Dublin, Ireland*. ISBN: 978-0-12-411479-1.
- Patil, S., Bourke, P., Frias, J. M., Tiwari, B. K., & Cullen, P. J. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* in orange juice using ozone. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, *10*, 551-557.
- Patil, S., Valdramidis, V. P., Cullen, P. J., Frias, J., & Bourke, P. (2010). Inactivation of *Escherichia coli* by ozone treatment of apple juice at different pH levels. *Food Microbiology*, *27*, 835-840.
- Patil, S., & Bourke, P. (2012). Ozone Processing of Fluid Foods. En: *Novel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. P. J. Cullen, B. K. Tiwari, & V. P. Valdramidis (Eds.). San Diego: Academic Press.
- Patras, A., Brunton, N. P., Da Pieve, S., & Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and color of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *10*, 308-313.
- Patras, A., Brunton, N., Da Pieve, S., Butler, F., & Downey, G. (2009b). Effect of thermal and high pressure processing on antioxidant activity and instrumental color of tomato and carrot purees. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *10*, 16-22.
- Patras, A., Brunton, N. P., O'Donnell, C., & Tiwari, B. K. (2010). Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods; mechanisms and kinetics of degradation. *Trends in Food Science and Technology*, *21*, 3-11.
- Patterson, M. F., & Linton, M. (2010). "Pasteurización" de alimentos por altas presiones. Nuevas tecnologías en la conservación y transformación de los alimentos, pp. 59-72. Instituto Tomás Pascual Sanz para la nutrición y la salud – Universidad de Burgos. Ed: International Marketing & Communication. ISBN: 978-84-7867-055-0.
- Patterson, M. F., McKay, A. M., Connolly, M., & Linton, M. (2012). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and safety of carrot juice during refrigerated storage. *Food Microbiology*, *30*, 205-212.
- Pekmezci, D. (2011). Vitamin E and immunity. *Vitamins and the Immune System*, *86*, 179-215.
- Petrier, C., Combet, E., & Mason, T. (2007) Oxygen-induced concurrent ultrasonic degradation of volatile and non-volatile aromatic compounds. *Ultrasonics Sonochemistry*, *14*, 117-121.
- Piljac-Zegarac, J., Valek, L., Martinez, S., & Belscak, A. (2009). Fluctuations in the phenolic content and antioxidant capacity of dark fruit juices in refrigerated storage. *Food Chemistry*, *113*, 394-400.
- Pina Pérez, M. C. (2011). Aplicación de tecnologías no-térmicas de conservación, pulsos eléctricos de alta intensidad (PEAI), y altas presiones hidrostáticas (APH), para el control de *Cronobacter sakazakii* en fórmula láctea infantil: desarrollo de modelos predictivos y valoración de la exposición. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.

- Pineda-Alonso, D., Salucci, M., Lázaro, R., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1999). Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, *13*, 104-111.
- Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., Elez-Martínez, P., de Ancos, B., Martín-Belloso, O., et al. (2006). Effect of refrigerated storage on vitamin C and antioxidant activity of orange juice processed by high-pressure or pulsed electric fields with regard to low pasteurization. *European Food Research and Technology*, *223*, 487-493.
- Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., et al. (2011). Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT-Food Science and Technology*, *44*, 834-839.
- Plozza, T., Craige-Trener, V., & Caridi, D. (2012). The simultaneous determination of vitamins A, E and  $\beta$ -carotene in bovine milk by high performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry (HPLC-MS<sup>n</sup>). *Food Chemistry*, *134*, 559-563.
- Podsdek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. *Food Science and Technology*, *40*, 1-11.
- Poliseli-Scopel, F. H., Hernández-Herrero, M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2013). Characteristics of soymilk pasteurized by ultra high pressure homogenization (UHPH). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *20*, 73-80.
- Polydera, A. C., Stoforos, N. G., & Taoukis, P. S. (2005). Quality degradation kinetics of pasteurised and high pressure processed fresh Navel orange juice: Nutritional parameters and shelf life. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *6*, 1-9.
- Prochaska, L. J., Nguyen, X. T., Donat, N., & Piekutowski, W. V. (2000). Effects of food processing on the thermodynamic and nutritive value of foods: literature and data base survey. *Medical Hypotheses*, *54*, 254-262.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*, 3396-3402.
- Putchala, M. C., Ramani, P., Sherlin, H. J., Premkumar, P., & Natesan, A. (2013). Ascorbic acid and its pro-oxidant activity as a therapy for tumours of oral cavity – A systematic review. *Archives of Oral Biology*, *58*, 563-574.
- Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H., & McClements, D. J. (2012). Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene-enriched nanoemulsions: influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chemistry*, *132*, 1221-1229.
- Raileanu, C., Lenco, G., & Rotaru, G. (2009). Process of variance analysis-monofactorial ANOVA method applied to study of drinks with milk and fruit juice addition. *Annals Food Science and Technology*, *10*, 380-384.
- Rajan, S., Pandrangi, S., Balasubramaniam, V. M., & Yousef, A. E. (2006). Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores in egg patties by pressure-assisted thermal processing. *LWT Food Science and Technology*, *39*, 844-851.
- Ramaswamy, H., & Marcotte, M. (2005). Food processing: Principles and Applications. CRC Press. Taylor & Francis Group. ISBN: 978-0-203-48524.
- Ramaswamy, H., & Tang, J. (2008). Microwave and radio frequency heating. *Food Science and Technology International*, *14*, 423-427.

- Ramaswamy, H. S., Shao, Y., Bussey, J., & Austin, J. (2013). Screening of twelve *Clostridium botulinum* (group I) spores for high-pressure resistance at elevated-temperatures. *Food and Bioprocesses*, *91*, 403-412.
- Randhawa, M. A., Rashid, A., Saeed, M., Javed, M. S., Khan, A. A., et al. (2014). Characterization of organic acids in juices of some Pakistani citrus species and their retention during refrigerated storage. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, *24*, 211-215.
- Rao, A. V. & Rao, L. G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, *55*, 207-216.
- Rasanayagam, V., Balasubramaniam, V. M., Ting, E., Sizer, C. E., Bush, C., et al. (2003). Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing. *Journal of Food Science*, *68*, 254-259.
- Rastogi, N. K. (2003). Application of high intensity pulsed electric fields in food processing. *Food Reviews International*, *19*, 229-251.
- Rastogi, N. K., Raghavarao, K. S. M. S., Balasubramaniam, V. M., Niranjana, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *47*, 69-112.
- Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., et al. (2011). Effect of thermal and non-thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. *Food Research International*, *44*, 1875-1887.
- Real Decreto 1044/1987, de 31 de julio, por el que se regula la elaboración de zumos de uva en armonización con la normativa comunitaria. BOE núm. 207, de 29 de agosto de 1987, páginas 26773 a 26774.
- Real Decreto 1050/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de zumos de frutas y de otros productos similares, destinados a la alimentación humana. BOE núm. 184, de 2 de agosto de 2003, páginas 29970 a 29974.
- Real Decreto 1518/2007, de 16 de noviembre, por el que se establecen parámetros mínimos de calidad en zumos de frutas y los métodos de análisis aplicables. BOE núm. 294, de 8 de diciembre de 2007, páginas 50632 a 50639.
- Real Decreto 650/2011, de 9 de mayo, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria en materia de bebidas refrescantes. BOE núm. 119, de 19 de mayo de 2011, páginas 50089 a 50093.
- Real Decreto 781/2013, de 11 de octubre, por el que se establecen normas relativas a la elaboración, composición, etiquetado, presentación y publicidad de los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. BOE núm. 245, de 12 de octubre de 2013, páginas 83295 a 83303.
- Reglamento (CE) nº 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. DOUE núm. 43, de 14 de febrero de 1997, páginas 1 a 15.
- Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DOUE núm. 31, de 1 de febrero de 2002, páginas 1 a 24.
- Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. DOUE núm. 139, de 30 de abril de 2004, páginas 1 a 54.

Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. DOUE núm. 70, de 16 de marzo de 2005, páginas 1 a 16.

Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO núm. 338, de 22 de diciembre de 2015, páginas 1 a 33.

Reglamento (CE) n° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. DOUE núm. 404, de 30 de diciembre de 2006, páginas 9 a 25.

Reglamento (CE) n° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de diciembre de 2006, sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos. DOUE núm. 404, de 30 de diciembre de 2006, páginas 26 a 38.

Reglamento (CE) n° 1331/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 por el que se establece un procedimiento de autorización común para los aditivos, las enzimas y los aromas alimentarios. DOUE núm. 354, de 31 de diciembre de 2008, páginas 1 a 6.

Reglamento (CE) n° 1332/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre enzimas alimentarias y por el que se modifican la Directiva 83/417/CEE del Consejo, el Reglamento (CE) n° 1493/1999 del Consejo, la Directiva 2000/13/CE, la Directiva 2001/112/CE del Consejo y el Reglamento (CE) n° 258/97. DOUE núm. 354, de 31 de diciembre de 2008, páginas 7 a 15.

Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. DOUE núm. 354, de 31 de diciembre de 2008, páginas 16 a 33.

Reglamento (CE) n° 1334/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aromas y determinados ingredientes alimentarios con propiedades aromatizantes utilizados en los alimentos y por el que se modifican el Reglamento (CEE) n° 1601/91 del Consejo, los Reglamentos (CE) n° 2232/96 y (CE) n° 110/2008 y la Directiva 2000/13/CE. DOUE núm. 354, de 31 de diciembre de 2008, páginas 34 a 50.

Reglamento (UE) n° 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n° 1924/2006 y (CE) n° 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE, y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n° 608/2004 de la Comisión. DOUE núm. 304, de 22 de noviembre de 2011, páginas 18 a 63.

Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita R., et al. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic pressure processing: A review. *LWT - Food Science and Technology*, *44*, 1251-1260.

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

- Rodrigo, N., Alegría, A., Barberá, R., & Farre, R. (2002). High-performance liquid chromatographic determination of tocopherols in infant formulas. *Journal of Chromatography A*, 947, 97-102.
- Rodríguez Amaya, D. B. (2001). A guide to carotenoid analysis in food. Washington: ILSI Press. 64 pp. ISBN 1578810728.
- Rodríguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis. En: HarvestPlus Technical Monographs 2. Washington y Cali.
- Rodríguez-Comesaña, M., García-Falcón, M. S., & Simal-Gándara, J. (2002). Control of nutritional labels in beverages with added vitamins: screening of  $\beta$ -carotene and ascorbic acid contents. *Food Chemistry*, 79, 141-144.
- Rodríguez-Roque, M. J., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., Cano, M. P., Elez-Martínez, P., et al. (2015). Impact of food matrix and processing on the in vitro bioaccessibility of vitamin C, phenolic compounds, and hydrophilic antioxidant activity from fruit juice-based beverages. *Journal of Functional Foods*, 14, 33-43.
- Rodríguez-Saona, L. E., Barrett, D. M., & Selivonchick, D. P. (1995). Peroxidase and Lipoxygenase Influence on Stability of Polyunsaturated Fatty Acids in Sweet Corn (*Zea mays* L.) during Frozen Storage. *Journal of Food Science*, 60, 1041-1044.
- Rolle, L., & Guidoni, S. (2007). Color and anthocyanin evaluation of red winegrapes by CIE L\*, a\*, b\* parameters. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 41, 193-201.
- Rollin, F., Kennedy, J., & Wills, J. (2011). Consumers and new food technologies. *Trends in Food Science & Technology*, 22, 99-111.
- Romeu-Nadal, M., Morera-Pons, S., Castellote, A. I., & López-Sabater, M. C. (2006). Determination of gamma- and alpha-tocopherols in human milk by a direct high-performance liquid chromatographic method with UV-vis detection and comparison with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1114, 132-137.
- Ronteltap, van Trijp, J. C. M., Renes R. J., & Frewer, L. J. (2007). Consumer acceptance of technology-based food innovations: Lessons for the future of nutrigenomics. *Appetite*, 49, 1-17.
- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2007). Ultrasound-assisted extraction of isoflavones from soy beverages blended with fruit juices. *Analytica Chimica Acta* 597, 265-272.
- Rostagno, M. A., Villares, A., Guillamón, E., Garcia-Lafuente, A., & Martínez, J. A. (2009). Sample preparation for the analysis of isoflavones from soybeans and soy foods. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2-29.
- Ruiz Tagle, J. L. (16 Noviembre 2011). Evolución del Mercado de zumos y néctares en España. Seminario sobre Calidad e Innovación en el Sector de Zumos y Néctares. Madrid: Asozumos-AEAZN.
- Sadilova, E., Stintzing, F. C., Kammerer, D. R., & Carle, R. (2009). Matrix dependent impact of sugar and ascorbic acid addition on color and anthocyanin stability of black carrot, elderberry and strawberry single strength and from concentrate juices upon thermal treatment. *Food Research International*, 42, 1023-1033.
- Sahari, M.A., Mohsen Boostani, F., & Zohreh, H. E. (2004). Effect of low temperature on the ascorbic acid content and quality characteristics of frozen strawberry. *Food Chemistry*, 86, 357-363.

- Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). Carotenoids from fruit and vegetables: chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, 76, 735-750.
- Sakhale, B. K., Pawar, V. N., & Ranveer, R. C. (2012). Studies on the development and storage of whey based RTS beverage from mango cv. Kesar. *Journal of Food Processing and Technology*, 3, 148. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7110.10001>.
- Sakr, M., & Liu, S. (2014). A comprehensive review on applications of ohmic heating (OH). *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 262-269.
- Salazar-González, C., San Martín-González, M F., López-Malo, A., & Sosa-Morales, M. E. (2012). Recent studies related to microwave processing of fluid foods. *Food and Bioprocess Technology* 5, 31-46.
- Saldeen, K., & Saldeen, T. (2005). Importance of tocopherols beyond  $\alpha$ -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutrition Research*, 25, 877-889.
- Salo-Väänänen, P., Ollilainen, V., Mattila, P., Lehtikoinen, K., Salmela-Mölsä, E., et al. (2000). Simultaneous HPLC analysis of fat-soluble vitamins in selected animal products after small-scale extraction. *Food Chemistry*, 71, 535-543.
- Sampedro, F., Rodrigo, D., & Hendrickx, M. (2008). Inactivation kinetics of pectin methyl esterase under combined thermal-high pressure treatment in an orange juice-milk beverage. *Journal of Food Engineering*, 86, 133-139.
- Sampedro, F., Geveke, D. J., Fan, X., Rodrigo, D., & Zhang, Q.H. (2009). Shelf-Life Study of an Orange Juice–Milk Based Beverage after PEF and Thermal Processing. *Journal of Food Science*, 74, 107-112.
- Sampedro, F., Fan, X., Rodrigo, D. (2010). High hydrostatic pressure processing of fruit juices and smoothies: Research and commercial application. In: Case Studies in Novel Food Processing Technologies: Innovations in Processing, Packaging, and Predictive Modelling. Elsevier Inc., pp. 34-72.
- San Martín, M. F., Barbosa-Cánovas, G. V., & Swanson, B. G. (2002). Food Processing by High Hydrostatic Pressure. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42, 627-645.
- Sánchez, J., de Miguel, C., Ramírez, M. R., Delgado, J., Franco, M. N., & Martín, D. (2012). Efecto de las altas presiones hidrostáticas respecto a la pasteurización térmica en los aspectos microbiológicos, sensoriales y estabilidad oxidativa de un paté de aceituna. *Grasas y aceites*, 63, 100-108.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, P. M. (2003). Effect of high-pressure processing on health-promoting attributes of freshly squeezed orange juice (*Citrus sinensis* L.) during chilled storage. *European Food Research and Technology*, 216, 18-22.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2003b). Vitamin C, provitamin A carotenoids, and other carotenoids in high pressurized orange juice during refrigerated storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 647-653.
- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., Elez-Martínez, P., de Ancos, B., Martín-Belloso, O., et al. (2005). Impact of high pressure and pulsed electric fields on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice in comparison with traditional thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4403-4409.

- Sánchez-Moreno, C., Plaza, L., de Ancos, B., & Cano, M. P. (2006). Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chemistry*, *98*, 749-756.
- Sánchez-Moreno, C., de Ancos, B., Plaza, L., Elez-Martínez, P., & Cano, M. P. (2009). Nutritional approaches and health-related properties of plant foods processed by high pressure and pulsed electric fields. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *49*, 552-576.
- Sánchez-Segarra, P. J., García-Martínez, M., Gordillo-Otero, M. J., Díaz-Valverde, A., Amaro-López, M. A., et al. (2000). Influence of the addition of fruit on the mineral content of yoghurts: Nutritional assessment. *Food Chemistry*, *70*, 85-89.
- Santamaría, M. R. (2010). *Industria alimentaria. Tecnologías emergentes* (Vol. 164). Universidad Politécnica de Cataluña.
- Santos Froes, R. E., Borges Neto, W., Couto e Silva, N. O., Pereira Naveira, R. L., Nascetes, C. C., et al. (2009). Multivariate optimization by exploratory analysis applied to the determination of microelements in fruit juice by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta B*, *64*, 619-622.
- Scherer, R., Poloni Rybka, A. C., Ballus, C. A., Dillenburg Meinhart, A., Teixeira Filho, J., et al. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*, *135*, 150-154.
- Schieber, A., Marx, M., & Carle, R. (2002). Simultaneous determination of carotenes and tocopherols in ATBC drinks by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, *76*, 357-362.
- Schluter, O., Ehlbeck, J., Hertel, C., Habermeyer, M., Roth, A., et al. (2013). Opinion on the use of plasma processes for treatment of foods. *Molecular Nutrition & Food Research*, *57*, 920-927.
- Schudel, P., Mayer, H., & Isler, O. (1992). Determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and fats by high performance liquid chromatography. En A. Dieffenbacher, & W. D. Pocklington (Eds.), *Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives* (pp. 2.432/1-2.432/7). Oxford: E-publishing Inc.
- Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., & Lampi, A. M. (2008). Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*, 152-161.
- Sentandreu, E., Carbonell, L., Carbonell, J. V., & Izquierdo, L. (2005). Effects of heat treatment conditions on fresh taste and on pectinmethylesterase activity of chilled mandarin and orange juices. *Food Science and Technology International*, *11*, 217-222.
- Sentandreu, E., Navarro, J. L., & Sendra, J. M. (2007). Effect of technological processes and storage on flavonoids content and total, cumulative fast-kinetics and cumulative slow-kinetics antiradical activities of citrus juices. *European Food Research and Technology*, *225*, 905-912.
- Serra Bonvehi, J. (2000). Liquid chromatographic determination of tocopherols and tocotrienols in vegetable oils, formulated preparations and biscuits. *Journal of AOAC International*, *83*, 627-634., 2012
- Sharma, R. (2011). Market trends in high pressure processing (HPP) food. Seminario presentado en el Centre for Nutrition & Food Sciences, Brisbane (Australia).

- Sharpless, K. E., Margolis, S., & Thomas, J. B. (2000). Determination of vitamins in food-matrix standard reference materials. *Journal of Chromatography A*, 881, 171-181.
- Shook, C. M., Shellhammer, T. H., & Schwartz, S. J. (2001). Polygalacturonase, pectinesterase, and lipoxygenase activities in high-pressure-processed diced tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 664-668.
- Singh, P. K., Kumar, S., Kumar, P., & Baht, Z. F. (2012). Pulsed light and pulsed electric field-emerging non thermal decontamination of meat. *American Journal of Food Technology*, 7, 506-516.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Folin-Cicalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - a review. *Appetite*, 51, 456-467.
- Slavin, M., & Yu, L. (2012). A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. *Food Chemistry*, 135, 2789-2795.
- Sloan, A. E. (2005). Top 10 global food trends. *Food Technology*, 59, 20-32.
- Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 152-158.
- Spencer, J. P. (2008). Flavonoids: modulators of brain function? *The British Journal of Nutrition*, 99, ES60-70.
- Smith, J. S., & Pillai, S. (2004). Irradiation and food safety and scientific status summary. *Food Technology*, 58, 48-55.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Rodrigues, C., & Pandey, A. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 141-149.
- Song, H. P., Byun, M. W., Jo, C., Lee, C. H., Kim, K. S., et al. (2005). Effects of gamma irradiation on the microbiological, nutritional, and sensory properties of fresh vegetable juice. *Food Control*, 18, 5-10.
- Soto-Reyes, N., Rojas-Laguna, R., & Sosa-Morales, M. E. (2012). Modelación del calentamiento dieléctrico (microondas y radiofrecuencia) en sistemas alimenticios modelo. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 19-31.
- Souci, S. W., Frachman, W., & Kraut, H. (2008). *Food composition and nutrition tables*. Ed: MedPharm Scientific Publishers. Stuttgart, Alemania.
- Strobel, M., Heinrich, F., & Biesalski, H. K. (2000). Improved method for rapid determination of vitamin A in small samples of breast milk by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 898, 179-183.
- Sun-Waterhouse, D. (2011). The development of fruit-based functional foods targeting the health and wellness market: a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 899-920.
- Szymczycha-Madeja, A., & Welna, M. (2013). Evaluation of a simple and fast method for the multi-elemental analysis in commercial fruit juice samples using atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 141, 3466-3472.
- Tamaoka, T., Itoh, N., & Hayashi, R. (1991). High pressure effect on Maillard reaction. *Agricultural and biological chemistry*, 55, 2071-2074.

- Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2004). The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58, 100-110.
- Tenorio, M. D., Villanueva, M. J., & Sagar-doy, M. (2004). Changes in carotenoids and chlorophylls in fresh green asparagus (*Asparagus officinalis*, L.) stored under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 357-365.
- Téllez-Luis, S. J., Ramírez, J. A., Pérez-Lame-la, C., Vázquez, M., & Simal-Gándara, J. (2001). Aplicación de la alta presión hidros-tática en la conservación de los alimentos. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 3, 66-80.
- Terra X., Valls, J., Vitrac, X., Mérrillon, J. M., Arola, L., et al. (2007). Grape-seed pro-cyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated RAW 264.7 macro-phages by inhibiting NFkB signaling path-way. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4357-4365.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Hawkins-Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating an-tioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- Tiwari, B. K., Muthukumarappan, K., O'Donnell, C. P., & Cullen, P. J. (2008). Kinetics of freshly squeezed orange juice quality changes during ozone processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6416-6422.
- Tiwari, B. K., O'Donnell, C. P., Muthuku-marappan, K., & Cullen, P. J. (2009). Ascor-bic acid degradation kinetics of sonicated orange juice during storage and comparison with thermally pasteurised juice. *LWT-Food Science and Technology*, 42, 700-704.
- Tiwari, B. K., & Mason, T. J. (2012). Ultra-sound Processing of Fluid Foods. En: *No-vel Thermal and Non-Thermal Technologies for Fluid Foods*. P. J. Cullen, B. K. Tiwari, & V. P. Valdramidis (Eds.). San Diego: Academic Press.
- Tiwari, B. K., Cullen, P. J., Brennan, C. S., & O'Donnell, C. P. (2013). Non thermal processing. En: *Handbook of Plant Food Phy-tochemicals: Sources, Stability and Extraction*. B.K. Tiwari, Nigel P. Brunton and Charles S. Brennan (Eds.). John Wiley & Sons, Ltd.
- Toepfl, S., Mathys, A., Heinz, V., & Knorr, D. (2006). Review: Potential of high hydro-static pressure and pulsed electric fields for energy efficient and environmentally friend-ly food processing. *Food Reviews International*, 22, 405-423.
- Tojo Sierra, R. (2003). Consumo de zumos de frutas y de bebidas refrescantes. Implica-ciones para la salud. *Anales de Pediatría*, 58, 584-593.
- Traber, M. G., & Atkinson, J. (2007). Vita-min E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 4-15.
- Traber, M. G., Frei, B., & Beckman, J. S. (2008). Vitamin E revisited: do new data validate benefits for chronic disease preven-tion? *Current Opinion in Lipidology*, 19, 30-38.
- Tran, M. T. T., & Farid, M. (2004). Ultravio-let treatment of orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technology*, 5, 495-502.
- Troy, D. J., Crehan, C., Mullen, A. M., & Desmond, E. (2001). High pressure tech-nology in the manufacture of minimal-ly-processed meat products. The National Food Centre Research Report No. 47. De-clan J. Troy et al. Dublin; Teagasc, 2001. ISBN 1841702617.

- Trujillo, F. J., & Geveke, D. J. (2014). Non-thermal Processing By Radio Frequency Electric Fields. En: *Emerging Technologies for Food Processing*. Da-Wen Sun(Ed.). National University of Ireland, Dublin, Ireland.
- Tsou, C. L. (1986). Location of the active sites of some enzymes in limited and flexible molecular regions. *Trends in Biochemical Sciences*, 11, 427-429.
- Uemura, K., Takahashi, C., & Kobayashi, I. (2010). Inactivation of *Bacillus subtilis* spores in soybean milk by radio-frequency flash heating. *Journal of Food Engineering*, 100, 622-626.
- UNICEF (2013). Bienestar infantil en los países ricos: un panorama comparativo. Report Card n° 11. Florencia: Oficina de Investigación de UNICEF. [www.unicef.es/sites/www.unicef.es/files/Bienestarinfantil\\_UNICEF.pdf](http://www.unicef.es/sites/www.unicef.es/files/Bienestarinfantil_UNICEF.pdf)
- United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service. New Technology Information Table. Última actualización: 03-06-2015. <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/regulatory-compliance/new-technologies/new-technology-information-table>.
- Unni, L. E., Chauhan, O. P., & Raju, P. S. (2015). Quality changes in high pressure processed ginger paste under refrigerated storage. *Food Bioscience*, 10, 18-25.
- Vadivambal, R., & Jayas, D. S. (2010). Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials - a review. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 161-171.
- Vaclavik, V. (1998). Fundamentos de ciencia de los alimentos. Editorial Acribia S.A., Zaragoza. España.
- Valdez-Fragoso, A., Mújica-Paz, H., Welte-Chanes, J., & Torres, J. A. (2011). Reaction Kinetics at High Pressure and Temperature: Effects on Milk Flavor Volatiles and on Chemical Compounds with Nutritional and Safety Importance in Several Foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4, 986-995.
- Valero, M., Recrosio, N., Saura, D., Munoz, N., Martí, N., et al. (2007) Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering*, 80, 509-516.
- Valls, J., Millán, S., Martí, M. P., Borràs, E., & Arola, L. (2009). Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7143-7172.
- Varela-Santos, E., Ochoa-Martínez, A., Tbillo-Munizaga, G., Reyes, J. A., Pérez-Won, M., et al. (2012). Effect of hydrostatic pressure (HHP) processing on physicochemical properties, bioactive compounds and shelf-life of pomegranate juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 13-22.
- Vásquez-Caicedo, A. L., Schilling, S., Carle, R., & Neidhart, S. (2007). Effects of thermal processing and fruit matrix on  $\beta$ -carotene stability and enzyme inactivation during transformation of mangoes into purée and néctar. *Food Chemistry*, 102, 1172-1186.
- Vázquez Oderiz, M. L., Vázquez Blanco, M. E., López Hernández, J., Simal Lozano, J., & Romero Rodríguez, M. A. (1994). Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 77, 1056-1059.
- Vega-Gálvez, A., López, J., Torres-Ossandón, M. J., Galotto, M. J., Puente-Díaz, L., et al. (2014). High hydrostatic pressure effect on chemical composition, color, phenolic acids and antioxidant capacity of Cape gooseberry pulp (*Physalis peruviana* L.). *LWT - Food Science and Technology*, 58, 519-526.

- Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herero, M. M., Guamis-López, B., & Roig-Sagués, A. X. (2012). Impact of ultra high pressure homogenization on pectin methylesterase activity and microbial characteristics of orange juice: A comparative study against conventional heat pasteurization. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *13*, 100-106.
- Velázquez-Estrada, R. M., Hernández-Herero, M. M., Rüfer, C. E., Guamis-López, B., & Roig-Sagués, A. X. (2013). Influence of ultra high pressure homogenization processing on bioactive compounds and antioxidant activity of orange juice. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *18*, 89-94.
- Verlinde, P., Oey, I., Hendrickx, M., & van Loey, A. (2008). High-pressure treatments induce folate polyglutamate profile changes in intact broccoli (*Brassica oleraceae* L. cv. *Italica*) tissue. *Food Chemistry*, *111*, 220-229.
- Vervoort, L., van der Plancken, I., Grawet, T., Timmermans, R. A. H., Mastwijk, H. C., et al. (2011). Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric fields processes for mild pasteurization of orange juice. Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *12*, 466-477.
- Vervoort, L., Van der Plancken, I., Grauwet, T., Verlinde, P., Matser, A., et al. (2012). Thermal versus high pressure processing of carrots: A comparative pilot-scale study on equivalent basis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *15*, 1-13.
- Wall, M. M. (2006). Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa* sp.) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis*, *19*, 434-445.
- Wan, J., Coventry, J., Swiergon, P., Sanguansri, P., & Versteeg, C. (2009). Advances in innovative processing technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety – pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends in Food Science and Technology*, *20*, 414-424.
- Wang, Y., Liu, F., Cao, X., Chen, F., Hu, X., et al. (2012). Comparison of high hydrostatic pressure and high temperature short time processing on quality of purple sweet potato nectar. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *16*, 326-334.
- Wang, X., Ouyang, Y., Liu, J., Zhu, M., Zhao, G., et al. (2014). Fruit and vegetable consumption and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *British Medical Journal*, *349*, 1-14.
- WHO (2003). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint FAO/WHO Expert consultation. WHO Technical report series 916. Geneva, World Health Organization.
- WHO (2004). Global strategy on diet, physical activity and health. Geneva, World Health Organization. ISBN 92-4-59222-2.
- WHO (2008) 2008-2013 Action Plan for the Global Strategy for the prevention and Control of Noncommunicable Diseases. Geneva, World Health Organization. ISBN 978-92-4-159741-8.
- WHO (2013). Vienna Declaration on Nutrition and Non-communicable Diseases in the Context of Health 2020. European Ministerial Conference, Vienna, World Health Organization.
- Winiarska-Mieczan, A., & Nowak, K. (2008). Determining the content of some minerals in fruit and vegetable baby juices. *Journal of Elementology*, *13*, 433-442.

- Wolbang, C. M., Fitos, J. L., & Treeby, M. T. (2008). The effect of high pressure processing on nutritional value and quality attributes of *Cucumis melo* L. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9, 196-200.
- Woodside, J. V., McGrath, A. J., Lyner, N., & McKinley, M. C. (2015). Carotenoids and health in older people. *Maturitas*, 80, 63-68.
- Xiao, C. W. (2008). Health effects of soy protein and isoflavones in humans. *The Journal of Nutrition*, 138, 1244-1249.
- Xiaowei, M., Hongxia, W., Liqin, L., Quansheng, Y., Songbiao, W., et al. (2011). Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulturae*, 129, 102-107.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Maa, Y., et al. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, 106, 545-551.
- Yadav, R. B., Yadav, B. S., & Kalia, N. (2010). Development and storage studies on whey-based banana herbal (*Mentha arvensis*) beverage. *American Journal of Food Technology*, 5, 121-129.
- Zell, M., Lyng, J. G., Morgan, D. J., & Cronin, D. A. (2009). Development of rapid response thermocouple probes for use in a batch ohmic heating system. *Journal of Food Engineering*, 93, 344-347.
- Zhang, C., Trierweiler, B., Li, W., Butz, P., Xu, Y., et al. (2011). Comparison of thermal, ultraviolet-c, and high pressure treatments on quality parameters of watermelon juice. *Food Chemistry*, 126, 254-260.
- Zhang, J., Hou, X., Ahmad, H., Zhang, H., Zhang, L., et al. (2014). Assessment of free radicals scavenging activity of seven natural pigments and protective effects in AAPH-challenged chicken erythrocytes. *Food Chemistry*, 15, 57-65.
- Zheng, X., Yu, Y., Xiao, G., Xu, Y., Wu, J., et al. (2014). Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 23, 61-67.
- Zhou, C. L., Liu, W., Zhao, J., Yuan, C., Song, Y., et al. (2014). The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and physical-chemical characteristics of Pumpkin (*Cucurbita maxima* Duch.) during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, 24-34.
- Zhu, X., Guo, W., & Wu, X. (2012). Frequency- and temperature-dependent dielectric properties of fruit juices associated with pasteurization by dielectric heating. *Journal of Food Engineering*, 109, 258-266.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., Frásquet, I., & Frígola, A. (2007). Vitamin C, vitamin A, phenolic compounds and total antioxidant capacity of new fruit juice and skim milk mixture beverages marketed in Spain. *Food Chemistry*, 103, 1365-1374.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2007b). Carotenoids and colour of fruit juice and milk beverages mixtures. *Journal of Food Science*, 72, 457-463.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2010). Ascorbic acid in orange juice-milk beverage treated by high intensity pulsed electric fields and its stability during orange. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 84-90.