

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales
sometidos a distintas condiciones de almacenamiento

Paola del Carmen Calderón Hidalgo

Química Bióloga

Guatemala, julio de 2007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

Determinación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales
sometidos a distintas condiciones de almacenamiento

Informe de Tesis

Presentado por

Paola del Carmen Calderón Hidalgo

para optar el título de

Química Bióloga

Guatemala, julio de 2007

ÍNDICE

	Pág
I. Resumen	01
II. Introducción	03
III. Antecedentes	04
A. Radicales libres	04
1. Generalidades	04
2. Enfermedades asociadas a radicales libres	05
B. Antioxidantes	06
1. Generalidades	06
2. Antioxidantes endógenos	06
3. Antioxidantes exógenos	08
4. Alimentos fuente de antioxidantes	13
C. Jugos frutales	14
1. Composición de los jugos frutales	14
2. Propiedades de los jugos frutales	15
3. Preservantes utilizados en jugos frutales	15
4. Estudios relacionados	17
D. Medición de propiedades antioxidantes	18
1. Determinación de capacidad antioxidante total por el método de DPPH	18
2. Determinación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin- Ciocalteu	19
3. Determinación de vitamina C por cromatografía líquida de alta resolución	19
IV. Justificación	21
V. Objetivos	22
VI. Hipótesis	23
VII. Materiales y métodos	24
A. Universo y muestra	24
B. Recursos	24
C. Procedimientos	26

1.	Selección de la muestra	26
2.	Manejo de la muestra	27
3.	Determinación de capacidad antioxidante total	29
4.	Determinación de compuestos fenólicos	30
5.	Determinación de vitamina C	31
6.	Diseño estadístico y análisis de datos	32
VIII.	Resultados	33
IX.	Discusión de resultados	39
X.	Conclusiones	43
XI.	Recomendaciones	44
XII.	Referencias	45
XIII.	Anexos	51

I. RESUMEN

La realización de la presente investigación pretendía determinar la variación de las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo).

Las propiedades antioxidantes fueron medidas como actividad antioxidante total, compuestos polifenólicos y vitamina C, en jugos comerciales de naranja tanto naturales como con preservantes. Los jugos fueron sometidos a tres temperaturas de almacenamiento desde el día de su producción hasta la fecha de vencimiento indicada por los productores. Durante este período se determinaron los tres parámetros ya indicados en cinco puntos en el tiempo a tres temperaturas.

La actividad antioxidante total fue medida por el método del DPPH y expresada en IC_{50} en μ l de muestra; los compuestos fenólicos totales se determinaron por el método de Folin Ciocalteu y se expresaron como equivalentes de μ l de ácido gálico/ml de jugo y la vitamina C fue determinada por HPLC y expresada en mg de ácido ascórbico/ μ l de jugo.

Los resultados obtenidos indican que las condiciones de almacenamiento a las que se someten jugos comerciales de naranja naturales y con preservantes modifican sus propiedades antioxidantes. Se estableció que el tipo de jugo es un factor importante en la variación de propiedades antioxidantes. La actividad antioxidante total se ve modificada por el tiempo de almacenamiento, los compuestos fenólicos totales son afectados por la temperatura de almacenamiento y la vitamina C no sufre variaciones significativas por las condiciones de almacenamiento a las que se sometieron los jugos en este estudio. Aun así, los cambios observados no afectan significativamente las propiedades antioxidantes de los jugos analizados.

De esta forma se puede decir si se desea consumir un jugo comercial de naranja con el mayor potencial de propiedades antioxidantes, éste debe ser natural, debe almacenarse a temperatura ambiente y consumirse hasta el día en que expira. Sin embargo, también deben tomarse en cuenta las características físicas, de sabor y olor que el jugo desarrolla al ser

almacenado a determinadas condiciones, puesto que al momento de ser consumido, además de ser nutritivo y beneficioso para la salud, el jugo debe ser agradable al gusto, a la vista y al olfato.

Consumir alimentos y bebidas de valor nutritivo y medicinal con su mayor potencial nutritivo, refleja la importancia de investigar las modificaciones que sufren las propiedades antioxidantes de los mismos durante su almacenamiento.

II. INTRODUCCIÓN

Los radicales libres son sustancias que en su estructura poseen uno o más electrones no apareados, lo que las hace altamente energéticas e inestables. Los radicales libres tienen la capacidad de interactuar con otras sustancias desencadenando reacciones que dañan el material genético, las proteínas y las membranas celulares. Estos daños se asocian con el desarrollo de enfermedades degenerativas como el cáncer (1-3).

Se reconocen como antioxidantes aquellos sistemas que tienen la propiedad de estabilizar radicales libres (4). Los antioxidantes pueden ser endógenos o exógenos. Los antioxidantes endógenos son los sistemas enzimáticos producidos por el organismo humano (5). Los antioxidantes exógenos son sustancias presentes en alimentos (6,7). Algunos alimentos identificados como fuente de antioxidantes son las verduras, las hierbas, los cereales y las frutas (8-10).

Los jugos frutales son bebidas derivadas de frutas y contienen entre otros, sustancias antioxidantes (11). Los jugos frutales pueden ser consumidos dentro del lapso comprendido hasta la fecha de vencimiento. Durante este período se mantienen las características físicas y microbiológicas del producto. Sin embargo, las propiedades antioxidantes de los jugos pueden variar de acuerdo con las condiciones bajo las que éstos son almacenados (12-13). En el país no se conocían estudios al respecto.

Por lo anterior, el presente estudio se realizó con el objetivo de conocer los posibles cambios en las propiedades antioxidantes de jugos de naranja sometidos a distintas condiciones de almacenamiento. Se determinaron los siguientes parámetros: la actividad antioxidante total por el método de DPPH (difenilpicrilhidrazolio), los contenidos de fenólicos totales y de vitamina C por la reacción de Folin Ciocalteu y HPLC, respectivamente, en distintos tiempos y temperaturas.

La información obtenida en el presente estudio permitió establecer el aporte de antioxidantes de los jugos frutales; además, podrá ser utilizada en estudios que busquen la optimización del almacenamiento adecuado de los jugos frutales para conservar sus cualidades antioxidantes.

III. ANTECEDENTES

A. Radicales Libres

1. Generalidades

Los radicales libres son moléculas independientes e inestables que tienen un electrón impar en una órbita, lo que las hace altamente energéticas y reactivas (1). Estas moléculas buscan otros electrones y causan reacciones de oxidación en cadena que llevan al daño de células y DNA hasta ser eliminadas y retornar a su estado basal (1,9).

El radical libre más sencillo es un átomo del elemento hidrógeno, con un protón y un único electrón (9).

Los radicales libres son generados principalmente como una consecuencia natural del metabolismo humano. Se forman radicales libres a partir de reacciones bioquímicas redox, de reacciones inflamatorias controladas y efectuadas por los fagocitos, de la respuesta ante la exposición a diferentes factores ambientales y tóxicos (14) y de la descomposición térmica de iniciadores de radicales libres incluyendo peróxidos, hiponitritos y compuestos azo (1,15).

Entre los radicales libres más importantes se encuentran: ión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), peroxilo (ROO^-), radical hidroxilo (OH^-), óxido nítrico (NO), ácido hipocloroso (HClO), o la combinación entre ellos: peroxinitrito $ONOO^-$, cloramina ($ClONH_2$) o nitrosaminas (9).

Las fuentes intracelulares más importantes de radicales libres son el transporte de electrones en las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Así mismo, la ubicuidad del oxígeno y su facilidad para captar electrones hacen de éste la mayor fuente endógena de radicales libres. Los linfocitos polimorfonucleares neutrófilos también merecen una especial mención como fuente endógena de radicales libres (5).

2. Enfermedades asociadas a radicales libres

Muchas de las enfermedades degenerativas de envejecimiento son el resultado de la exposición prolongada a radicales libres (1) y la mayor parte de los efectos perjudiciales están causados por las entidades que contienen oxígeno (5).

Las especies de oxígeno reactivas han sido ampliamente asociadas con varias formas de daño celular y tisular así como enfermedades en humanos como cáncer, aterosclerosis, úlcera gástrica y otras condiciones. Así lo documentan varios autores, entre ellos, Steinber D., *et al* en 1989 en el estudio "Modificación de lipoproteínas de baja densidad que incrementan la aterogenicidad del colesterol" (16).

Varias formas de especies oxigenadas, como el superóxido, el peróxido de hidrógeno y los radicales libres hidroxilo, han sido implicadas como los agentes causantes de aberraciones psicológicas, según lo indicado por Vives C., *et al*, en el estudio "Incremento de la Susceptibilidad de las Células Rojas Sanguíneas Microcíticas al Estrés Oxidativo *in vitro*" (17).

De todos los radicales libres, el OH^\cdot es el más dañino, ya que es capaz de destruir enzimas proteolíticas, provocar la ruptura de polisacáridos y causar peroxidación lipídica de la membrana (PLM); lo que altera la permeabilidad de la misma y sus funciones asociadas (5). El peroxinitrito (ONOO^\cdot) puede ocasionar daño directo a las proteínas y al ADN y constituye un potente inductor de la PLM que puede llegar a destruir a las neuronas, las cuales son especialmente sensibles a este proceso (14).

La disfunción neuronal originada por la PLM en la homeostasia iónica incrementa la vulnerabilidad de la célula a la excitotoxicidad y puede promover cascadas de excitotoxicidad por desorganización de los sistemas de regulación en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias. Esto compromete la importante función de secuestro del calcio iónico y promueve así la muerte celular. Este proceso puede ocurrir en diferentes estados degenerativos agudos como la isquemia cerebral y el daño cerebral traumático, así como en procesos degenerativos crónicos como la enfermedad de Alzheimer y la de Parkinson (14).

Los radicales libres alteran también la estructura del material genético produciendo enlaces anómalos entre las dos hélices de bases púricas y pirimidínicas del ADN; con ello se interfiere la normal replicación de las células favoreciendo la aparición de mutaciones con la formación de los hidroperóxidos, que progresan a productos volátiles, polímeros, epóxidos y monómeros. Este mecanismo directo de carcinogénesis se complementa con la capacidad de los radicales libres de activar sustancias procancerígenas, mutagénicas y promotoras (5).

B. Antioxidantes

1. Generalidades

Los antioxidantes se definen como sustancias cuya acción consiste en inhibir o retrasar la tasa de oxidación provocada por los radicales libres (1,4).

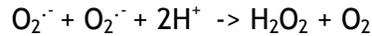
Las funciones que ejercen los antioxidantes se realizan mediante el aumento de la velocidad de ruptura de los radicales libres, mediante la prevención de la participación de iones de metales de transición en la generación de radicales libres o mediante la desactivación o secuestro de radicales libres (4).

Los antioxidantes pueden ser útiles en la prevención de cáncer, en la disminución del dolor de artritis y en el retardo de los efectos del envejecimiento (18).

2. Antioxidantes endógenos

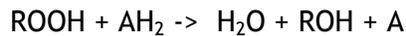
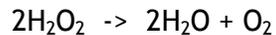
Están constituidos por mecanismos enzimáticos producidos naturalmente por el organismo con la función de protegerlo del estrés oxidativo (5). Los principales mecanismos enzimáticos son:

- a) Superóxido dismutasa (SOD): se encuentra dentro de las células y su función es catalizar la reacción de destrucción de los radicales superóxido mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido a su vez por las actividades catalasa o glutatión peroxidasa.



Se han identificado cuatro clases de SOD: una de ellas contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn. Las demás presentan cofactores mononucleares de Fe, Mn o Ni. FeSODs y MnSODs presentan homologías en cuanto a sus secuencias y estructura tridimensional. Además poseen residuos quelantes idénticos en el sitio activo. En humanos existen tres tipos de SOD: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD citosólica y la SOD extracelular (EC-SOD) (19).

- b) Catalasa: es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula.



Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. La catalasa captura el H_2O_2 antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular (19,20).

- c) Glutatión peroxidasa (GPX): enzima intracelular que contiene Selenio. Remueve los radicales peróxidos al convertir el H_2O_2 y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que formen radicales libres. Es detoxificante y protege contra los efectos dañinos de metales pesados, tabaco y alcohol (4).

Está formada por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La GPX comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) usando glutatión reducido (GSH), y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo.



El ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo, pero la catalasa es más importante al momento de proteger contra el estrés oxidativo severo. En células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H₂O₂ es la GPX, ya que la catalasa presenta mucha menos afinidad por el H₂O₂ (20).

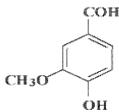
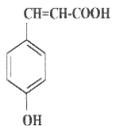
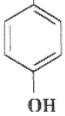
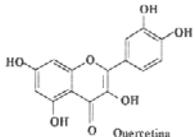
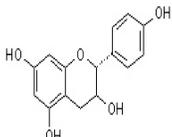
3. Antioxidantes exógenos

Son un grupo de vitaminas, minerales y fitoquímicos presentes en alimentos. La función antioxidante ejercida por estos compuestos se hace efectiva al ingresar al organismo a través de la dieta. Hay muchos antioxidantes en la naturaleza pero los principales son la vitamina C, la vitamina E y los tocoferoles (6).

Los principales efectos de las vitaminas antioxidantes son como secuestradores de radicales libres. La vitamina C y el β-caroteno actúan como eliminadores de singletes de oxígeno y la vitamina E y el β-caroteno actúan como antioxidantes rompe cadenas (1).

- a) Compuestos fenólicos: los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) (4).

Dependiendo de su estructura química, los compuestos fenólicos se agrupan en diferentes clases:

Grupo	Descripción	Ejemplo
Fenoles, ácidos fenólicos y ácidos fenil acéticos	Formados por grupos fenoles simples. Están presentes en la mayoría de especies vegetales	 <p>Vanilina</p>
Ácidos cinámicos, cumarinas, isocumarinas y cromonoles	Generalmente se les encuentra en forma de derivados	 <p>Ácido <i>p</i>-cumárico</p>
Lignanós y neolignanós	Son metabolitos de plantas de bajo peso molecular. Se forman por acoplamiento oxidativo de unidades <i>p</i> -hidroxifenilpropano.	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$  <p><i>p</i>-hidroxifenilpropano</p>
Flavonoides	Sustancias polifenólicas de bajo peso molecular. Su estructura se conforma por dos anillos benceno unidos por un anillo pirona.	 <p>Quercetina</p>
Taninos. hidrolizables y no hidrolizables	Compuestos fenólicos hidrosolubles con peso molecular entre 500-3000 D Son capaces de unirse a proteínas y otras macromoléculas.	 <p>Catequina</p>

Fuente: (4).

La capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos depende de su estructura molecular, la cual influye en la facilidad con la que un átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo aromático puede ser donado a un radical libre y en la habilidad del fenol de soportar un electrón no apareado (21-22). La estructura Odihidroxi en el anillo B se considera determinante en la neutralización radical y/o

el potencial oxidativo. Este es el sitio radical para los polifenoles con un enlace 2-3 saturado (15).

La forma específica de inhibir la oxidación de cada uno de los compuestos fenólicos no está clara pero pueden actuar mediante la quelación de cobre, la captación de radicales alcoxi y peroxi o mediante la donación de hidrógeno y regeneración de α -tocoferol por medio de la reducción del radical α -tocoferoxil (4).

Para que un compuesto fenólico sea clasificado como antioxidante debe ser capaz tanto de formar radicales estables que no puedan actuar en oxidaciones posteriores como de retrasar o prevenir la auto oxidación o la oxidación mediada por un radical libre cuando aquél (el compuesto fenólico), se encuentre en una concentración baja con relación al sustrato que va a ser oxidado (4).

En 1996 Hertog M., y Hollman P. realizaron la investigación “Efectos Potenciales para la Salud del Flavonoide Quercitina Proveniente de la Dieta”. En esta investigación se determinó que la ingesta de dietas ricas en compuestos fenólicos está asociada con una expectativa más larga de vida, gracias a la actividad antioxidante relacionada con dichos compuestos (23).

La capacidad anticarcinogénica de los compuestos polifenólicos se debe a que interfieren en distintas etapas en el desarrollo de tumores malignos mediante la protección del ADN ante el daño oxidativo; de este modo inactivan a carcinógenos con lo que se inhibe la expresión de los genes mutágenos y la actividad de las enzimas encargadas de la activación de pro carcinógenos (4).

Gey F., Stahelin H. y Eichhólzer M. demostraron, en un estudio epidemiológico realizado en 1993, que los compuestos fenólicos son capaces de prevenir la oxidación de las LDL-C (lipoproteínas de baja densidad) y retrasar el desarrollo de la aterosclerosis (24). Estos hallazgos se apoyan con lo demostrado por Ho C. *et al*, en el estudio “Efecto Antioxidativo del Extracto Polifenólico Preparado a

Partir de Varios Tés Chinos”, en el que se concluyó que los polifenólicos suprimen la ocurrencia de la peroxidación lipídica en tejidos biológicos y en fracciones subcelulares (25). Así mismo, se ha demostrado que los polifenólicos ejercen acciones como mediadores celulares y en la transcripción genética regulada, según lo concluido en el estudio “Inducción de la Expresión de los Genes c-fos y c-jun por Antioxidantes Fenólicos” realizado por Choi H. y Moore D. (26).

El estudio “Uso y Propiedades de los Flavonoides Cítricos” realizado en 1997 por Benavente-Garcisa O., *et al*, reveló que los compuestos fenólicos exhiben propiedades antioxidantes como anticancerígenos, antivirales, antiinflamatorios, vasodilatadores e inhibidores de la agregación plaquetaria humana (27).

Bomser J., *et al*, reportan en el estudio “Actividad Anticancerígena *in vitro* de Extractos de Fruta Obtenidos de Especies *vaccinium*” que los flavonoides como las antocianinas, flavonoles y proantocianidinas, actúan como reductores de las tasas de mortalidad debidas a enfermedades cardiaco coronarias, gracias a que pueden reforzar las paredes capilares con lo que se asegura una normal circulación sanguínea (28).

- b) Vitamina C (Ácido ascórbico): es un poderoso antioxidante soluble en agua hidrosoluble); figura en primera línea en la defensa antioxidante del plasma. Es un poderoso inhibidor de la oxidación de los lípidos, protector de los efectos del tabaco, actúa contra las enfermedades cardiacas, el cáncer y otros trastornos degenerativos (9).

La actividad antioxidante de esta vitamina se deriva de su habilidad para secuestrar radicales en fase acuosa (29).

La vitamina C es lábil a la luz, el oxígeno, el calor, las enzimas y los metales (30).

- c. Vitamina E (Tocoferol): principal antioxidante, soluble en lípidos. Se encuentra en las membranas y en las lipoproteínas y aumenta su acción en presencia del Zinc (31).

Previene la oxidación de las grasas al bloquear la reacción en cadena de la peroxidación lipídica a través de la eliminación de radicales peroxilo intermediarios. Protege a las células y a los sistemas circulatorio e inmunológico y evita el envejecimiento prematuro. Es importante en la protección frente a la aterosclerosis y, en lactantes, frente a la retinopatía de la premadurez (9).

La vitamina E es la primera línea de defensa contra la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. La actividad antioxidativa de los tocoferoles es debida principalmente a su habilidad para donar sus hidrógenos fenólicos a los radicales libres (14).

- d) β -caroteno: el β -caroteno y otros carotenoides como licopeno y zeaxantinas son poderosos antioxidantes liposolubles y han demostrado efectos protectores contra enfermedades cardiovasculares y oculares, así como contra cáncer de piel y de estómago. Actúan como antioxidantes a través de un mecanismo eliminador de singletes de oxígeno o radicales libres (1,9, 32).

Palozza P. y Krinsky N. realizaron en 1991 el estudio “Inhibición de la Peroxidación de Lípidos Microsomales Mediada por Radicales tanto por el α -tocoferol como por el β -caroteno”. Se concluyó que el β -caroteno protege a los lípidos de la autooxidación por radicales libres al inhibir la propagación y al promover la terminación de la reacción de oxidación en cadena (33).

- e) Minerales

- Zinc: participa en la lucha contra los radicales libres e interviene en el metabolismo de la SOD y de la Vitamina E, entre otras funciones (18).

- Selenio: importante para la acción de la enzima glutatión peroxidasa y de la vitamina E. Relacionado con un menor riesgo de tumores de piel, hígado, colon y mama (18).

4. Alimentos fuente de antioxidantes

Está ampliamente documentada la asociación entre la ingesta de frutas y vegetales con la reducción de riesgos de enfermedades crónicas como cardiovasculares y cáncer (6, 8). Esto ha sido demostrado en diversos estudios entre lo que se encuentra "Vitaminas antioxidantes y el riesgo de enfermedades de la arteria coronaria" realizado por Gaziano J. en 1994 (34).

En la siguiente tabla se mencionan los alimentos que contienen algunos de los principales antioxidantes:

Antioxidantes presentes en algunos alimentos.

Antioxidante	Alimento
Compuestos polifenólicos	Manzanas, cebollas, té y vino
Vitamina C	Naranja, limón, frutilla guayaba, mango, piña, caqui, melón, fresas, bayas, kiwi. brócoli, pimiento, repollo, tomate, brasicáceas (verduras de la familia de la col),
Vitamina E	Aceites vegetales, de las nueces, cereales, choclo, maní, aceitunas, germen de cereales o cereales de grano entero, vegetales de hoja verde y frutos secos.
β -caroteno	Verduras de color verde o coloración rojo-anaranjado-amarillento como zanahorias, espinacas y calabazas. Frutas como albaricoques, cerezas, melón y melocotón.
Selenio	En carnes, pescados, marisco, cereales, huevos, frutas y verduras.
Zinc	Carnes y vísceras, pescados, huevos, cereales completos y legumbres.

Fuente: (9)

C. Jugos frutales

Son jugos de fruta los que se obtienen al aplicar presión mecánica sobre frutas frescas o los que se obtienen a partir de concentrados de zumos de fruta por dilución con agua. Se elaboran en la industria para su consumo directo o como productos intermedios para fabricar jaleas, bebidas refrescantes, licores o productos de confitería (11).

1. Composición de los jugos frutales

Los nutrientes que aportan los jugos frutales en general y, el jugo de naranja en particular, se presentan en el anexo 1.

El contenido de polifenoles en los zumos de frutas oscila generalmente entre 2 y 500 mg/L dependiendo del tipo analizado, aunque zumos de ciertas variedades de naranja poseen concentraciones mucho mayores (hasta 700 mg/ml). Las mayores concentraciones se han encontrado en la pulpa de la naranja, donde se detectan valores del orden de 31 mg/100 g de peso fresco (4).

Entre los productos frutales, el jugo de naranja debe ser resaltado debido a que este producto es considerado una fuente importante de flavonoides (7), una fuente excelente de vitamina C y una buena fuente de ácido fólico y potasio (35).

En 1998, Howell A. *et al*, encabezaron el estudio “Inhibición de la Adherencia de *Escherichia coli* p-fimbriada a la Superficie de la Célula Uroepitelial por Extractos de Proantocianidina a partir de arándanos”. El estudio permitió concluir que los jugos de arándanos contienen proantocianidinas que son útiles en el tratamiento de infecciones del tracto urinario (36).

2. Propiedades de jugos frutales

Los jugos ejercen una intensa acción depuradora sobre el organismo y ayudan a eliminar las toxinas del tracto digestivo. Son un medio para potenciar los procesos inmunológicos, desintoxicar el sistema y protegerlo contra las enfermedades y el envejecimiento prematuro. Son fáciles de absorber y rápidos de asimilar por el organismo, incluso cuando el aparato digestivo sea muy lento o esté en malas condiciones (37).

Las frutas y las hortalizas se encuentran entre las mejores fuentes de antioxidantes. Sin embargo, estas moléculas, al igual que muchos nutrientes, se destruyen fácilmente durante la cocción, por lo que es más eficaz consumir las frutas y hortalizas crudas. Esta es una de las razones por las que los jugos son beneficiosos, debido a que a través de éstos los nutrientes, en especial los antioxidantes, se obtienen de forma más íntegra (37).

En 1999 se condujo el estudio “Diferenciación de la Actividad y Contenido Flavonoide de la Fracción Extraíble Preparada a Partir de Jugos Cítricos” a cargo de Kawaii S. *et al.* En este estudio se demostró que los flavonoides cítricos son posibles agentes preventivos de cáncer y poseer actividad contra leucemia mieloide aguda (38).

Estudios realizados en 1994 por Galati E. *et al.*, acerca de los efectos biológicos de la hesperidina, un flavonoide cítrico, revelan que este compuesto presenta un amplio rango de propiedades terapéuticas de aplicación médica y clínica, tales como actividades antiinflamatorias, antihipertensivas, diuréticas, analgésicas e hipolipidémicas (39).

3. Preservantes utilizados en jugos frutales

En la industria alimenticia se utiliza compuestos antioxidantes para prevenir el deterioro, rancidez o decoloración causados por la oxidación (40).

Los ácidos utilizados en alimentación tienen dos funciones principales:

- Actúan como antimicrobianos
 - Resaltan el sabor
- a) Ácido cítrico: se encuentra en estado natural en limones y otros zumos cítricos. Actúa como supresor del pardeamiento de frutas y hortalizas y como agente sinérgico de los antioxidantes. Es utilizado como estabilizador de la acidez de las sustancias alimenticias y como secuestrante y saborizante. La dosis recomendada es de 0.3 a 4.0% (41).
- b) Ácido benzoico: se encuentra en estado natural en muchas bayas comestibles. Comúnmente se utilizan sus sales alcalinas (ej. Benzoato de sodio) ya que el ácido benzoico es muy poco soluble en agua. Su uso es como conservante, bactericida y fungicida. Es efectivo solamente en un medio ligeramente ácido. Se emplea en muchos casos en combinación con otros conservantes. La dosis recomendada es de 0.05 a 0.10% (41).
- c) Benzoato de sodio: el benzoato de sodio es la sal sódica del ácido benzoico. Es un conservante bactericida y fungicida comúnmente utilizado en jugos. Este conservante es efectivo solamente en un medio ligeramente ácido. Se emplea en la mayoría en dosis de 0.30% (41).
- d) Sorbato de potasio: el sorbato de potasio es la sal de potasio del ácido sórbico ampliamente utilizado en alimentación como conservante. Comúnmente en la industria alimenticia se utiliza el sorbato de potasio ya que este es más soluble en agua que el ácido sórbico. Es un conservante fungicida y bactericida.

El ácido sórbico y sus sales de sodio y potasio se usan en una concentración menor del 0.3 % en peso para inhibir el crecimiento de hongos y levaduras en los alimentos con un pH hasta de 6.5 (41).

4. Estudios relacionados

Una publicación de 1999, realizada por Iversen K., reportó los efectos del procesamiento y almacenamiento en el contenido de antocianinas y ácido ascórbico en néctares de grosella negra. Se dio a conocer que ocurre un pequeño incremento en el contenido total de antocianinas en el néctar pasteurizado comparado con el jugo crudo (42).

En 2001, Izquierdo A., *et al*, realizaron una investigación en la que se evaluó el contenido de flavonoides en jugos de naranja producidos por diferentes técnicas de procesamiento, así mismo, se estudiaron los cambios en la composición fenólica durante el almacenamiento. Se demostró que el jugo exprimido a mano presentaba cambios importantes ya que disminuía de 724 a 360 mg/L la concentración de flavononas durante las primeras 24 horas de almacenamiento. Los resultados muestran que en el jugo de naranja recién producido, como el caso de los jugos producidos por procesamiento doméstico, las flavononas y otros compuestos fenólicos están principalmente en forma soluble, en jugos comerciales tanto pasteurizados como semipasteurizados, la cantidad de flavononas solubles disminuye dramáticamente hasta alcanzar niveles de 100 mg/L (7).

Ese mismo año, en el estudio “Influencia del cultivo y temperatura de almacenamiento en la capacidad antioxidante del ráspero”, realizado por Wang S. y Stretch A., se demostró que la capacidad antioxidante de esta fruta está influenciada por la temperatura de almacenamiento. Se midió la capacidad de absorbanza de radicales oxígeno, los niveles de antocianina y el contenido total de compuestos fenólicos encontrando que estos tres parámetros aumentaban en concentración de forma directamente proporcional a la temperatura durante el almacenamiento (13).

En el estudio “Actividad Antioxidante de Frutas Tropicales”, desarrollado en el año 2000 por Murillo E., Carrasquilla L. Islam M., se determinó el contenido de ácido ascórbico y compuestos fenólicos totales. Se encontró que los extractos con mayor actividad

antioxidante son ricos en compuestos polifenólicos, los cuales están presentes en mayor porcentaje en guanábana, caimito, guayaba, mangotín y marañón (43).

D. Medición de propiedades antioxidantes

1. Determinación de capacidad antioxidante total por el Método de DPPH

El DPPH (2,2 difenil 1- picrhydrazyl) es un radical estable soluble en metanol que puede aceptar un electrón o radical hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable (44). Debido a que el DPPH reacciona con agentes reductores adecuados, este electrón se aparea y la solución pierde color estequiométricamente con el número de electrones que se toman de la siguiente forma:



La reacción se lleva a cabo en medio orgánico (metanol, etanol, benceno o dioxano) o en medio acuoso-orgánico (50% de etanol) (45). Esta actividad ha sido utilizada para evaluar la actividad antioxidante de plantas, extractos microbianos y alimentos (46-48).

Los resultados de este método son expresados en IC_{50} , el cual se define como la concentración necesaria de muestra para reducir el 50% de la cantidad inicial de DPPH y se expresa como la relación molar de cada componente por radical (20).

Desde el punto de vista metodológico el DPPH es un método fácil y exacto para la medición de actividad antioxidante en frutas y verduras por lo que es recomendado para medir la actividad antioxidante en este tipo de muestras (20, 44). Este método presenta también la ventaja de ser una prueba no enzimática (20).

Una desventaja del método es que es menos sensible que otros métodos para la determinación de antioxidantes hidrofílicos (20).

Este método fue utilizado para la medición de la actividad antioxidante en el pericarpio de la semilla de pimienta japonesa (49) y en el estudio de actividad antioxidante en extracto de *Thymus zygis* (47).

2. Determinación de compuestos fenólicos totales por el método de Folin-Ciocalteu

Los compuestos fenólicos, al igual que las proteínas, reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo coloreado. El color que se forma es debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína, y la reacción de fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína (50). La intensidad del color depende del número de aminoácidos aromáticos presentes. El complejo en el caso de las proteínas es rojo o violeta, y azul en el caso del amonio (50).

El reactivo de Folin-Ciocalteu mide el potencial redox de los compuestos polifenólicos y detecta todos los grupos fenólicos encontrados en extractos, aún cuando éstos contienen proteínas (51).

3. Determinación de vitamina C por cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación en dos fases, una sólida estacionaria y una líquida móvil. El material para análisis se extrae con solventes apropiados y se inyecta presión dentro de las columnas de diámetro angosto. El solvente pasa por un detector que mide una propiedad específica de la solución que está pasando, tal como su naturaleza química, su fluorescencia o su absorbancia. Estas son registradas en una tira de papel o monitor electrónico como picos, los cuales pueden ser medidos manualmente o con computadoras (52).

La HPLC es una técnica sensible, de fácil adaptación a determinaciones cuantitativas exactas e idónea para la separación de especies no volátiles o termolábiles, entre los que se mencionan aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos y vitaminas (53).

Con este método es posible realizar cuantificaciones simultáneas de diversas vitaminas siendo algunas de ellas carotenos, riboflavina, folatos, vitamina C, tiamina y piridoxina. Se ha comprobado que el método es altamente específico y no existen interferencias de otros compuestos, por lo que se utiliza para análisis de rutina (52).

IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala los jugos de fruta se incluyen en la dieta de una gran parte de la población. El consumo de frutas se debe, en parte, a que constituye una forma rápida y práctica de calmar el hambre y la sed, así como por ser una fuente de vitaminas y minerales (29). Recientemente también se les conoce como una fuente de sustancias con capacidad antioxidante, la cual está asociada con la prevención de enfermedades degenerativas (9).

En la literatura se reporta que el contenido químico de jugos y otros productos frutales puede cambiar según las condiciones de almacenamiento en que se colocan desde su producción hasta su consumo final, de esta manera se pueden ver alteradas también sus propiedades nutritivas y antioxidantes (7,12).

Generalmente estos productos se consumen dentro de una fecha establecida por el fabricante (fecha de expiración). La fecha de expiración indica el límite de tiempo en el que el producto mantiene las características físicas, químicas y microbiológicas que lo hacen apto para el consumo humano. Actualmente este criterio no incluye las propiedades antioxidantes. A pesar de que la literatura indica que ocurren cambios en la capacidad antioxidante de jugos de fruta sometidos a almacenamiento, en Guatemala no se conocía el efecto de las condiciones de almacenamiento de los jugos comerciales sobre su capacidad antioxidante.

Por tal motivo, la determinación de los cambios en las propiedades antioxidantes, representadas por capacidad antioxidante total, compuestos polifenólicos y vitamina C, en jugos de naranja comerciales sometidos a diversas condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo), permitió juzgar mejor el valor nutricional del producto en el tiempo posterior a su producción. Los cambios menores de las propiedades antioxidantes entre una y otra condición, suponían que los jugos exhibieran propiedades terapéuticas invariables durante su vida de anaquel (4, 10).

V. OBJETIVOS

A. General

1. Establecer la variación en las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales sometidos a distintas condiciones de almacenamiento (temperatura y tiempo).

B. Específicos

1. Determinar el efecto que ejerce la temperatura de almacenamiento sobre las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales.
2. Determinar el efecto que ejercen distintos tiempos de almacenamiento, dentro de su fecha de expiración, sobre las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales.

VI. HIPÓTESIS

La temperatura y el tiempo de almacenamiento modifican las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo y Muestra

1. Universo

Jugos de naranja comerciales.

2. Muestra

15 jugos de naranja naturales y 15 jugos de naranja con preservantes provenientes del mismo lote.

B. Recursos

a) Equipo

- Agitador vortex
- Baño María (a 90-100 °C)
- Termómetros (Sensibilidad de 1 °C)
- Gradillas
- Balanza analítica (Sensibilidad 0.0001g)
- Balanza semianalítica (Sensibilidad 0.001g)
- Espectrofotómetro (Spectronic 21D)
- Potenciómetro de 0.00 a 19.99 pH
- Horno de 5°C sobre temperatura ambiente a 210°C
- Refrigeradora (a 5 °C)
- Congelador (a -20 °C)

b) Reactivos

Medición de Actividad Antioxidante

- DPPH (Diphenylpicrilhidrazil)
- Hidróxido de sodio
- Acetato de sodio anhidro
- Ácido acético glacial
- Agua destilada
- Nitrógeno gaseoso
- Metanol

Determinación de Compuestos fenólicos Totales

- Reactivo Folin Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Ácido gálico
- Agua destilada

Determinación de vitamina C

- Agua destilada
- Metanol
- Amortiguador de fosfatos pH 3

c) Cristalería

- Vasos de precipitar (50ml)
- Probetas (50ml, 100ml, 200ml)
- Pipetas volumétricas
- Micropipetas (20-100 μ l, 40-200 μ l, 200-1000 μ l)
- Macropipeteadores
- Cubetas de lectura
- Balones aforados (25ml, 100ml, 500ml, 1000ml)
- Agitadores de vidrio

C. Procedimientos

1. Selección de la muestra

Se realizó una visita de prospección para conocer cuántos tipos de jugos se encuentran disponibles para el consumo humano en el área metropolitana. Se visitaron tres puntos de venta: Un hipermercado, un supermercado y un mini mercado.

Se buscaron los tres jugos más abundantes en cada establecimiento. Una vez establecida esta característica, se anotó la siguiente información de cada jugo:

- Precio
- Presentación (Tamaño, contenido neto)
- Sabores
- Fecha de vencimiento
- Ingredientes

Se seleccionaron aquellos jugos obtenidos de la misma fruta que estuvieran disponibles como jugo natural y como jugo con preservantes.

El jugo frutal se consideró natural cuando llenaba lo siguientes requisitos:

- No haber sido sometido a ningún tratamiento industrial
- No contener preservantes.

El jugo frutal con preservantes se consideró así:

- Ser producido por procesos industriales (p. e. pasteurización)
- Contener preservantes

Se encontró un único jugo de naranja que cumplía los requisitos de selección, por lo que éste conformó la muestra. De esta forma se utilizó el jugo natural de naranja y el jugo de naranja con preservantes de la marca seleccionada.

El análisis se realizó a tres diferentes temperaturas y en cinco puntos en el tiempo de vida de anaquel para cada tipo de jugo, por lo que la muestra estuvo constituida por quince jugos naturales y quince jugos con preservantes. Todas las unidades provenían del mismo lote. Se consideró que cada unidad de jugo posee las características representativas del lote muestreado.

2. Manejo de la muestra

El muestreo se realizó en las primeras horas hábiles de la mañana a fin de evitar que la temperatura ambiental de horas posteriores ejerciera efectos adversos sobre la muestra. Se adquirieron quince unidades de cada tipo de jugo (natural y con preservantes). Los jugos con preservantes se adquirieron directamente de la planta productora el día de su producción y los jugos naturales se adquirieron en el punto de venta.

La muestra se trasladó al lugar de análisis, a temperatura ambiente, en un periodo no mayor de una hora posterior a la recolección; cuando esto no fue posible, la muestra se refrigeró a $5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en una hielera portátil.

Una vez transportada al lugar de análisis, la muestra se dividió en tres grupos y se almacenó a las siguientes temperaturas:

- 5 unidades a temperatura de refrigeración (5°C)
- 5 unidades a temperatura ambiente promedio (20°C)
- 5 unidades a temperatura ambiente máxima promedio (35°C)

Estas temperaturas se seleccionaron porque son aquellas a las que pueden ser sometidos los jugos durante el proceso de comercialización, es decir, desde el lugar de fabricación hasta la adquisición y consumo.

La muestra se almacenó durante el período que abarcó la fecha de vencimiento del producto. Durante este lapso se realizaron análisis en los siguientes tiempos:

- Día de producción (Día de recolección de la muestra),
- $\frac{1}{4}$ del tiempo de vida de anaquel*
- $\frac{1}{2}$ del tiempo de vida de anaquel
- $\frac{3}{4}$ del tiempo de vida de anaquel
- Día de vencimiento del producto.

*Tiempo de vida de anaquel: tiempo, expresado en días, que transcurre entre la fecha de fabricación y la fecha de vencimiento. Se tomó el dato proporcionado por el fabricante.

Estas mediciones se realizaron con el fin de aumentar la probabilidad de encontrar el momento en el que ocurren cambios significativos de las propiedades antioxidantes de los jugos.

A cada temperatura y tiempo se tomó una unidad de jugo para determinar los siguientes tres parámetros:

- Capacidad antioxidante total
- Compuestos fenólicos totales
- Vitamina C

Los análisis se realizaron por duplicado con la metodología descrita más adelante.

Los valores determinados a temperatura ambiente, el día de recolección de la muestra, fueron utilizados como valores iniciales para las tres temperaturas.

3. Determinación de capacidad antioxidante total (39)

a) Preparación de reactivos

DPPH

- Se preparó el volumen necesario de acuerdo a la relación 2.19 mg de DPPH en 10 ml de metanol.

Amortiguador de acetatos pH 6:

- Se preparó el volumen necesario de acuerdo con lo siguiente:
- 2.72 g de acetato de sodio anhidro en 100 ml de agua destilada.
- 47.5 ml de acetato de sodio y 2.4 ml de ácido acético.
- 24 g de NaOH en 100 ml de agua destilada.
- Se ajustó la solución a pH 6.0 con NaOH

b) Medición de actividad antioxidante

Se determinó la absorbancia del jugo puro a 517 nm. Con base en esto se estableció las diluciones necesarias para la determinación de antioxidantes.

A tubos previamente rotulados se agregó lo que se indica en la siguiente tabla:

Reactivo / Volumen ml	Blanco	Control	Control de ensayo	Ensayo
Amortiguador de acetatos	1.0	1.0	1.0	1.0
Metanol	2.0	1.5	1.9	1.4
Muestra	---	---	0.1	0.1
DPPH	---	0.5	---	0.5

Las mezclas se agitaron en vortex por 30 segundos y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos protegidas de la luz. Posterior a esto se midió la absorbancia de las mezclas a 517 nm.

El porcentaje de reducción del DPPH se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Abs. Control} - \text{abs. Muestra}]}{\text{Abs. Control}} * 100 = \%$$

4. Determinación de compuestos fenólicos totales (48)

a) Preparación de soluciones

Para la curva patrón:

- Se disolvió 1 mg de ácido gálico en 1 ml de agua destilada (Solución A)
- Se preparó una dilución 1:10 de la solución A en agua destilada (Solución B). La solución se preparó en el momento de su utilización.
- Se preparó una solución al 10% de carbonato de sodio (10 mg de carbonato de sodio en 90 ml de agua destilada).

b) Medición

Se midió una curva patrón con estándares de ácido gálico de la siguiente forma:

	H ₂ O (ml)	Ácido gálico (ml)	Folin (ml)	Na ₂ CO ₃ 10% (ml)
Blanco	4.000	0.000	0.400	1.600
P ₁	3.975	0.025	0.400	0.800
P ₂	3.950	0.050	0.400	0.800
P ₃	3.900	0.100	0.400	0.800
P ₄	3.850	0.150	0.400	0.800
P ₅	3.800	0.200	0.400	0.800
P ₆	3.750	0.250	0.400	0.800

La medición de compuestos fenólicos totales en los jugos se efectuó agregando a tubos rotulados lo siguiente:

	H ₂ O (ml)	Extracto (ml)	Folin (ml)	Na ₂ CO ₃ 10% (ml)
M ₁	3.95	0.05	0.40	0.80
M ₂	3.90	0.10	0.40	0.80

Cada tubo se mezcló y se colocó en baño de maría a una temperatura de 90^o - 100^o C por un minuto. Se dejaron enfriar los tubos y se leyó la absorbancia de cada uno a 765 nm.

Los Eq. de ácido gálico se calcularon a partir de la curva patrón mediante una ecuación de la recta:

$$\text{Eq. ácido gálico} = \frac{\text{Abs} - m}{b}$$

5. Determinación de vitamina C

a) Preparación de Reactivos:

- Fase móvil: Amortiguador de fosfatos pH 3 y metanol en una relación de 95:5
- Todos los reactivos a utilizar se filtraron previo a iniciar las inyecciones.

b) Determinación

- Se inyectaron estándares de ácido ascórbico para obtener una curva patrón.
- Se filtraron los jugos utilizando membranas de 20 μm de poro.
- Se inyectó una cantidad adecuada de jugo.
- Se interpretó la curva graficada por el sistema.

Para obtener los valores de vitamina C, las áreas obtenidas se integraron a una ecuación de la recta basada en la curva patrón.

6. Diseño estadístico y análisis de datos

Tipo de estudio: Prospectivo, longitudinal, experimental.

Se aplicó un diseño factorial con tres factores y niveles mixtos:

- Tipo de jugo (natural y procesado)
- Tiempo de almacenamiento (día de fabricación, $\frac{1}{4}$ del tiempo de vida de anaquel, $\frac{1}{2}$ del tiempo de vida de anaquel, $\frac{3}{4}$ del tiempo de vida de anaquel y día de vencimiento)
- Temperatura de almacenamiento (5°C, 20°C y 35°C.)

Los resultados se tabularon y se expresaron de la siguiente forma:

- a) Capacidad Antioxidante Total: en IC_{50} en μl de jugo.
- b) Compuestos fenólicos Totales: en equivalentes de ácido gálico en $\mu\text{g/ml}$ de jugo.
- c) Vitamina C: en mg de ácido ascórbico/ml de jugo.

Se realizó un análisis de varianza con un nivel de confianza del 95 por ciento ($\alpha = 0.05$). En este análisis se estableció si existe diferencia de las propiedades antioxidantes entre las distintas temperaturas, los distintos tiempos y por efecto combinado de estas dos variables.

VIII. RESULTADOS

En el estudio se utilizaron quince unidades de jugo de naranja natural y quince unidades de jugo de naranja con preservantes. Los jugos de naranja natural se adquirieron en la presentación de envases plásticos de un litro, con cuatro días de vida de anaquel reportados en la etiqueta. Estos jugos se producen exprimiendo directamente la fruta y no se aplica ningún tratamiento o proceso posterior a la extracción.

Los jugos de naranja con preservantes se adquirieron en la presentación de envase plástico de ocho onzas, con un periodo de vencimiento de doce días. En la etiqueta se mencionaban como ingredientes los siguientes: jugo de naranja, agua y ácido cítrico. La producción de estos jugos conlleva un proceso de pasteurización estándar.

Los jugos fueron almacenados a 5°C, 20°C y 35°C. Esto refleja la temperatura de refrigeración, la temperatura ambiente promedio y la temperatura ambiente cálida que son más comunes en Guatemala.

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos de actividad antioxidante total, compuestos fenólicos totales y vitamina C en jugos naturales de naranja almacenados en tres temperaturas diferentes durante cinco días. Como se puede observar, la actividad antioxidante total en los jugos naturales aumenta en el transcurso del tiempo en las tres temperaturas de almacenamiento. El valor más alto obtenido es de 12.07 IC₅₀ en µl de jugo, correspondiente al día 4 a 35°C y el más bajo se obtuvo al inicio del almacenamiento con un valor de 16.90 IC₅₀ en µl de jugo. Es importante recordar que el valor de IC₅₀ es inversamente proporcional a la actividad antioxidante total, es decir que a menor valor de IC₅₀ mayor actividad antioxidante total.

Respecto a los compuestos fenólicos totales, se observa que el valor más alto obtenido fue a 35°C en el día 4 de almacenamiento, siendo este valor 1884.48 Eq. de

ácido gálico en $\mu\text{g/ml}$ de jugo. El valor más bajo obtenido fue el de 1278.79 Eq. de ácido gálico en $\mu\text{g/ml}$ de jugo correspondiente al día 3 de almacenamiento a 5°C .

La vitamina C presentó el valor más bajo de concentración en el día 4 de almacenamiento a 5°C al obtenerse 568.22 mg de ácido ascórbico/ml de jugo y el valor más alto obtenido fue de 942.53 mg de ácido ascórbico/ml de jugo correspondiente al inicio del almacenamiento.

Tabla 1

Actividad antioxidante total, compuestos fenólicos totales y vitamina C de jugos de naranja naturales almacenados a diferentes tiempos y temperaturas.

Temperatura/día	Actividad antioxidante total IC_{50} en μl	Compuestos fenólicos totales (Eq. ácido gálico en $\mu\text{g/ml}$ de jugo)	Vitamina C (mg de ácido ascórbico/ml jugo)
Día 0 (Inicial)	16.90 ± 2.80	1346.00 ± 62.09	942.53 ± 30.21
5°C	Día 1	16.12 ± 0.62	1471.31 ± 0.69
	Día 2	15.37 ± 0.76	1366.64 ± 19.20
	Día 3	14.55 ± 1.06	1278.79 ± 76.62
	Día 4	12.90 ± 1.35	1308.60 ± 21.18
20°C	Día 1	16.12 ± 2.06	1518.12 ± 58.12
	Día 2	15.39 ± 1.07	1678.68 ± 45.63
	Día 3	14.30 ± 0.80	1742.44 ± 34.64
	Día 4	13.36 ± 0.84	1675.16 ± 23.16
35°C	Día 1	15.07 ± 0.68	1648.80 ± 21.77
	Día 2	14.86 ± 1.75	1772.32 ± 25.74
	Día 3	13.24 ± 0.29	1701.12 ± 37.64
	Día 4	12.07 ± 0.23	1884.48 ± 50.85

Guatemala, julio 2003

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos de actividad antioxidante total, compuestos fenólicos totales y vitamina C en jugos de naranja con preservantes almacenados en tres temperaturas diferentes durante doce días.

Tabla No. 2

Actividad antioxidante total, compuestos fenólicos totales y vitamina C de jugos de naranja con preservantes almacenados a diferentes tiempos y temperaturas

Temperatura/día	Actividad antioxidante total IC ₅₀ en µl de jugo	Compuestos fenólicos totales (Eq. ácido gálico en µg/ml de jugo)	Vitamina C (mg de ácido ascórbico/ml jugo)	
Día 0 (Inicial)	42.34 ± 2.90	796.54 ± 1.35	361.51 ± 5.50	
5°C	Día 3	37.80 ± 3.09	757.29 ± 9.95	361.22 ± 0.21
	Día 7	33.19 ± 2.88	661.96 ± 25.08	360.44 ± 11.63
	Día 10	31.08 ± 3.85	622.71 ± 0.63	362.58 ± 10.67
	Día 12	29.48 ± 1.92	506.82 ± 0.69	369.39 ± 3.92
20°C	Día 3	36.59 ± 1.32	708.69 ± 5.98	322.06 ± 30.93
	Día 7	34.82 ± 3.90	925.51 ± 1.95	318.98 ± 0.15
	Día 10	33.35 ± 0.92	742.34 ± 30.78	283.94 ± 40.12
	Día 12	35.87 ± 0.39	613.44 ± 13.91	278.69 ± 13.70
35°C	Día 3	39.22 ± 2.85	708.69 ± 4.59	263.50 ± 18.75
	Día 7	32.74 ± 1.00	1338.60 ± 21.18	350.70 ± 16.60
	Día 10	31.58 ± 2.45	682.52 ± 8.56	329.58 ± 12.63
	Día 12	31.19 ± 0.03	628.32 ± 13.25	249.58 ± 0.15

Guatemala, agosto 2003

Se observa que, para los jugos de naranja con preservantes, la mayor actividad antioxidante total se da en el día 12 de almacenamiento a 5°C con un valor de 29.48 IC₅₀ en µl de jugo, mientras que la menor actividad antioxidante total se observa al inicio del almacenamiento pues se obtuvo un valor de 42.34 IC₅₀ en µl de jugo.

Se observa también que la mayor cantidad de compuestos fenólicos totales se presentó en los jugos almacenados a 35°C en el día 7, siendo el valor obtenido 1338.60 Eq. ácido gálico en µg/ml de jugo. La menor concentración de fenólicos totales se obtuvo en los jugos almacenados a 5°C en el día 12 siendo el valor obtenido 506.82 Eq. ácido gálico en µg/ml de jugo.

En lo referente a la vitamina C, se observa que la mayor concentración de ésta se obtuvo en el jugo almacenado por 12 días a 5°C, siendo el valor obtenido 359.39 mg de ácido ascórbico/ml de jugo. La menor concentración de vitamina C, se encontró en el jugo almacenado por doce días a 35°C con un dato de 249.58 mg de ácido ascórbico/ml de jugo.

Para poder apreciar de mejor forma los resultados presentados en las tablas 1 y 2, se elaboraron gráficas en donde se muestra el efecto de cada uno de los parámetros medidos durante el almacenamiento a distintas temperaturas por el periodo de vida útil para ambos tipos de jugo. Las gráficas pueden observarse en la sección de Anexos, anexo 3.

En la gráfica 1 se presentan los resultados obtenidos de actividad antioxidante total. Se observa que la actividad antioxidante total se incrementa al almacenar los jugos naturales durante cuatro días y al almacenar los jugos con preservantes durante doce días. Otra característica importante que se puede apreciar en esta gráfica es la diferencia de actividad antioxidante total entre los dos tipos de jugos almacenados, es claro que el jugo de naranja natural tiene mayor actividad antioxidante total que el jugo de naranja con preservantes, ya que el primero tiene valores de IC₅₀ más bajos que el segundo.

En la gráfica 2 se presentan los resultados de compuestos fenólicos totales. Se puede observar que existen distintos comportamientos en función de la temperatura y en función del tipo de jugo. Los jugos de naranja naturales presentan una tendencia a incrementar los valores de los compuestos fenólicos al almacenarlos durante cuatro días a 20°C y 35°C; sin embargo al almacenarlos a 5°C no se presenta esa tendencia.

Los jugos con preservantes, al final del periodo de almacenamiento de 12 días, presentan un ligero descenso de compuestos fenólicos totales, siendo de especial interés los picos de incremento que se observan al séptimo día de almacenamiento a 20°C y 35°C. Este incremento corresponde al 16% y al 68% respecto de la concentración inicial en el jugo almacenado a 20°C y 35°C respectivamente.

También es importante observar que los jugos de naranja natural presentan un mayor contenido de compuestos fenólicos totales con relación a los jugos de naranja con preservantes.

En la gráfica 3 se presentan los resultados obtenidos de vitamina C. Se observa que los jugos de naranja natural tienen más contenido de vitamina C que los jugos de naranja con preservantes. En los jugos de naranja natural se observa un descenso en la concentración de vitamina C con el transcurso del tiempo de almacenamiento a las tres temperaturas de medición, mientras que en los jugos de naranja con preservantes se tiende a mantener más estable dicha concentración tanto en función del tiempo como de la temperatura de almacenamiento.

El análisis de varianza efectuado a los resultados se encuentra detallado en la sección de anexos, Anexo 4 y su interpretación se resume a continuación en la tabla No. 3. Este análisis se realizó con el fin de determinar la significancia que tiene el tipo de jugo y los parámetros de almacenamiento (temperatura y tiempo) respecto de la actividad antioxidante total, los compuestos fenólicos totales y la vitamina C en los jugos de naranja comerciales.

Tabla No. 3. Análisis de varianza para las propiedades antioxidantes en jugos de naranja comerciales.

Parámetro/Factor	Temperatura	Tiempo
Actividad antioxidante total	No significativo (P = 0.170)	Significativo (P = 0.004)
Compuestos fenólicos Totales	Significativo (P = 0.007)	No significativo (P = 0.118)
Vitamina C	No significativo (P = 0.900)	No significativo (P = 0.920)

En esta tabla se puede observar que, para la actividad antioxidante total el efecto del tiempo de almacenamiento sí es estadísticamente significativo ($P=0.004$) en ambos tipos de jugo. Contrario a esto, el efecto de la temperatura de almacenamiento de los dos tipos de jugo no fue estadísticamente significativa para la actividad antioxidante total ($P=0.170$). La tabla también demuestra que los cambios en la concentración de compuestos fenólicos totales son significativos en función de la temperatura de almacenamiento, no así en función del tiempo de almacenamiento ($P=0.007$ y $P=0.118$, respectivamente). Como se observa, las variaciones en el contenido de vitamina C en jugos naturales y con preservantes fueron no significativas estadísticamente ni en función de la temperatura ni del tiempo de almacenamiento ($P=0.900$ y $P=0.920$, respectivamente).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El estudio realizado determinó la variación en las propiedades antioxidantes de jugos de naranja comerciales (naturales y con preservantes), sometidos a diferentes temperaturas y periodos de almacenamiento.

Las distintas temperaturas de almacenamiento no causaron cambios significativos en la actividad antioxidante total de los jugos naturales ni de los jugos con preservantes ($P=0.170$); sin embargo el tiempo de almacenamiento sí fue significativo ($P=0.004$) pues al final del almacenamiento se observa mayor actividad antioxidante total en los dos tipos de jugos. El incremento en la actividad antioxidante total en los jugos de naranja natural fue en promedio del 25% y en los jugos de naranja con preservantes el incremento fue del 24%.

Los compuestos fenólicos totales sí fueron afectados significativamente por las distintas temperaturas de almacenamiento ($P=0.007$), no así por el tiempo de almacenamiento ($P=0.118$). Los cambios más importantes son los observados en los jugos naturales almacenados a 20°C y 35°C, en donde, al final del almacenamiento, hubo un incremento del 24% y 40%, respectivamente en la concentración de compuestos fenólicos totales. En los jugos con preservantes almacenados a 20°C y 35°C en el séptimo día de almacenamiento, también se observa un cambio importante pues también se nota un incremento en la concentración del 16% y 68%, respectivamente.

El incremento en los compuestos fenólicos totales puede estar relacionado con las reacciones enzimáticas y no enzimáticas que producen compuestos fenólicos; en el caso de los jugos naturales, esto se vio favorecido por temperaturas de almacenamiento de 20°C y 35°C. Lo mismo se puede observar en el lapso de 0 a 7 días de almacenamiento en los jugos con preservantes. Apoya esta explicación el hecho de que los jugos almacenados a 35°C fueron los que tuvieron mayor incremento, lo que concuerda con el hecho conocido de que con incrementos de temperatura, se incrementa la velocidad de estas reacciones. El descenso en la concentración de compuestos fenólicos que se observa en el lapso de 7 a 12 días de almacenamiento en

los jugos con preservantes podría significar la degradación de estos compuestos fenólicos debido probablemente a su poca estabilidad (19).

El incremento observado en la concentración de compuestos fenólicos totales puede ser parte del incremento observado también en la actividad antioxidante de los jugos analizados.

En cuanto a la vitamina C, se observó una disminución de su contenido en los jugos naturales mientras que en los jugos con preservantes esta concentración se mantuvo relativamente. El comportamiento en el contenido de vitamina C fue dependiente de la temperatura de almacenamiento. Es importante observar que los jugos naturales fueron los que tuvieron la mayor pérdida de vitamina C. Esta disminución de vitamina C está ampliamente documentada: las frutas y los zumos en general pierden vitamina C durante el almacenamiento, la pérdida depende mucho de la temperatura, siendo mucho menor a una temperatura próxima a 0°C (11).

La temperatura donde hubo más variación porcentual de vitamina C fue a 5°C. Por el momento no se cuenta con la explicación a este comportamiento.

Similar a este estudio, en 2000 Gao X., *et al* (54) reportó una significativa reducción en el contenido de ácido ascórbico durante el almacenamiento de algunas frutas. De igual forma, 1993 Albrecht J., reportó que la lechuga completa perdía ácido ascórbico durante el almacenamiento, pérdida que podía ser provocada por la oxidación de dicho compuesto (30).

Por el contrario, en los jugos con preservantes, las variaciones en la concentración de vitamina C fueron menores debido a que, a este tipo de jugos se les agrega sustancias antioxidantes, como ácido cítrico, lo que incrementa la estabilidad de esta vitamina. Adicional a esto, se sabe que las pérdidas de ácido ascórbico se producen durante el almacenamiento de los zumos que han sido sometidos a tratamiento térmico. La magnitud de la pérdida es, en primer término función de la temperatura y del tiempo de almacenamiento. Para zumos almacenados en latas a 22°C es previsible

una pérdida mensual de 1-2%, sin embargo almacenados a 8-9°C las pérdidas son casi insignificantes, pero aumentan rápidamente a temperaturas superiores a 25°C (11).

El análisis estadístico del efecto del tiempo de almacenamiento sobre los valores de los tres parámetros estudiados (actividad antioxidante total, compuestos fenólicos totales, vitamina C) se hizo comparando el valor de cada parámetro al inicio del tiempo de almacenamiento y al final del mismo. En este sentido para los dos tipos de jugo se puede observar que la actividad antioxidante total fue significativamente mayor al final del almacenamiento a cualquier temperatura en jugos naturales (almacenados 4 días) y en los jugos con preservantes (almacenados 12 días).

En conjunto, los compuestos fenólicos totales al final del tiempo de almacenamiento, no variaron significativamente respecto de los valores iniciales, sin embargo, al considerar por aparte jugos naturales y jugos con preservantes, se puede notar que los jugos naturales (especialmente los almacenados a 20°C y 35°C) tenían mayor contenido de compuestos fenólicos totales que al inicio del almacenamiento. Por el contrario, el contenido de compuestos fenólicos totales en los jugos con preservantes al final del periodo de almacenamiento (12 días) fue menor que al inicio de este proceso.

Algunos estudios han reportado resultados similares al de éste. En 2000 Skrede G., Wrolstad R. Y Durst R., reportan que durante el procesamiento del arándano para la producción de jugo, ocurren pérdidas considerables de compuestos fenólicos como glucósidos flavonoles, de antocianinas y de polifenólicos (12).

Gil A., *et al* estudiaron en 2001 la disponibilidad *in vitro* de varios compuestos fenólicos en jugos de naranja. Demostraron que en los jugos producidos por procesamiento doméstico, las flavononas y otros compuestos fenólicos están presentes en forma soluble, principalmente. El hallazgo de que los compuestos fenólicos están presentes en forma soluble en los jugos de naranja producidos domésticamente explica porqué, luego de pasar por procesos de pasteurización parcial o completa, la cantidad estos compuestos disminuye, con una consecuente disminución en su concentración. De

ahí el hecho de que en los jugos procesados se encuentre una menor concentración de compuestos fenólicos respecto de los jugos naturales (44).

Un resultado diferente fue reportado por Iversen C. en 1999 (42). Este estudio reveló un pequeño incremento en el contenido de antocianinas totales en el néctar de mora pasteurizado comparado con el jugo crudo. Se cree que esto pudo deberse a que se liberaron pequeñas cantidades de antocianinas de las partículas frutales durante la pasteurización. La retención de antocianinas y de vitamina C durante la producción de néctar depende del proceso así como de la naturaleza de la materia prima.

En general, el trabajo demostró que la actividad antioxidante total incrementa a cualquier temperatura y durante la vida de anaquel de los jugos naturales. Los valores de actividad antioxidante tienden a aumentar especialmente en los jugos que están almacenados a mayores temperaturas, lo mismo ocurre en la primera fase de almacenamiento de los jugos con preservantes. También se determinó que el contenido de compuestos fenólicos totales de los jugos analizados no sufre variaciones significativas respecto del tiempo de almacenamiento. En cuanto a la vitamina C se demostró que no hay pérdidas significativas durante la vida de anaquel de los jugos naturales y con preservantes almacenados a distintas temperaturas.

Se concluye entonces que el valor de los jugos de naranja naturales y con preservantes como fuente de antioxidantes, no varía significativamente durante su vida de anaquel cuando se almacenan a distintas temperaturas, pudiendo estos jugos ser una fuente relativamente mejor de compuestos antioxidantes al final de su vida de anaquel pues el contenido de antioxidantes tiende a incrementar. Este incremento puede ser atribuido a la presencia de compuestos fenólicos o la de a otros no determinados en este estudio; sin embargo no puede relacionarse o atribuirse con la concentración de vitamina C, pues esta disminuyó en las condiciones de almacenamiento estudiadas.

X. CONCLUSIONES

1. El tiempo de almacenamiento aumentó significativamente los valores de actividad antioxidante total de los jugos de naranja comerciales.
2. La temperatura de almacenamiento disminuyó significativamente la concentración de compuestos fenólicos totales de los jugos de naranja comerciales.
3. El tiempo y la temperatura de almacenamiento no afectaron significativamente la concentración de vitamina C de los jugos de naranja comerciales.
4. Los jugos de naranja comerciales no pierden significativamente propiedades antioxidantes en las condiciones de almacenamiento trabajadas.

XI. RECOMENDACIONES

1. Confirmar si se repite el comportamiento de los compuestos fenólicos totales en condiciones de almacenamiento similares.
2. Determinar si existe correlación entre la capacidad antioxidante total y el contenido de fenólicos.
3. Confirmar si al final de la vida de anaquel del jugo de naranja natural almacenado a 20°C y 35°C las características sensoriales sean aceptables para consumo humano.

XII. REFERENCIAS

1. Elliot J. Application of Antioxidant Vitamins in Foods and Beverages. *Food Tech.* 1999;53:46-48.
2. Matsingou T., Kapsokefalou M., Salipoglou A. In Vitro Antioxidant Activity of Black Tea and Mediterranean Herb Infusion Toward Iron Under Simulated Gastrointestinal Conditions. *J. Food Sci.* 2000;65:1060-1065.
3. Yamaguchi F., *et al.* Free Radical Scavenging Activity and Antiulcer Activity of Garcinol from *Garcinia indica* Fruit Rind. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:2320-2325.
4. Martínez I., Periago M., Ros G. Significado Nutricional de los Compuestos Fenólicos de la Dieta. *Archivos Lat. Nutr.* 2000;50:5-15.
5. Majem L., Barteina A., Verdú M. *Nutrición y Salud Pública.* España : Masson, 1994. (pp. 203-205, 353-357)
6. Howard L., *et al.* β -Carotene and Ascorbic Acid Retention in Fresh and Processed Vegetables. *J. Food Sci.* 1999;64:929-936.
7. Izquierdo A., *et al.* *In vitro* Availability of Flavonoids and Other Phenolics in Orange Juice. *J. Agric. Food Chem.* 2000;49:1034-1041.
8. Gorinstein S. Comparative Contents of Dietary Fiber: Total Phenolics and Minerals in Persimmons and Apples. *J. Agric. Food Chem.* 2001;49:952-957.
9. Halliwell B. Antioxidantes. 636-642. (En : Ekhard E., Ziegler E., Filer L. *Conocimientos Actuales Sobre Nutrición.* 7 ed. México: Instituto Internacional de Ciencias de la Vida, 1996. XV+731p.)
10. Amakura Y., *et al.* Influence of Jam Processing on the Radical Scavenging Activity and Phenolic Content in Berries. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:6292-6297.

11. Astiasarán I., Martínez J. Alimentos Composición y Propiedades. España: Interamericana Mc Graw-Hill, 2000. 364p. (pp. 194-197, 203-204, 299-302).
12. Skrede G., Wrolstad R., Durst R. Changes in Anthocyanins and Polyphenolics During Juice Processing of Highbush Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) J. Food Sci. 2000;65:357-364.
13. Wang S., Stretch A. Antioxidant Capacity in Cranberry is Influenced by Cultivar and Storage Temperature. J. Agric. Food Chem. 2001;49:969-974.
14. Roche. Patología de los Radicales Libres y su Prevención con Vitaminas Antioxidantes; El β -caroteno, la Vitamina E y la Vitamina C en la Profilaxis de las Enfermedades. Doc. Tec. 12p(p3-9).
15. Yokozawa T., *et al.* Antioxidative Activity of Green Tea Treated with Radical Initiator 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride. J. Agric. Food Chem. 2000;48:5068-5073.
16. Steinberg D., *et al.* Beyond Cholesterol. Modification of Low-density Lipoprotein that Increase its Atherogenicity. N. Engl. J. Med. 1989;320:915-924.
17. Vives J., *et al.* Increased Susceptibility of Microcytic Red Blood Cells to *in vitro* Oxidative Stress. Eur. J. Hematol. 1995;55:527-533.
18. Pszczda D. Antioxidants Take Center Stage. Food Tech. 1998;52:140-155.
19. Niwa T., *et al.* Antioxidative Properties of Phenolic Antioxidants of Phenolic Antioxidants Isolated from Cort Steep Liquor. J. Agric. Food Chem. 2001;49:177-182.
20. Silva F., *et al.* Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship Among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters. J. Agric. Food Chem. 2000;48:2122-2126.
21. Burns J., *et al.* Relationship Among Antioxidant Activity, Vasodilation Capacity and Phenolic Content of Red Wines. J. Agric. Food Chem. 2000;48:220-230.

22. Yurttas H., Schafer H., Worthesen J. Antioxidant Activity of Nontocopherol Hazelnut (*Corylus* spp.) Phenolics. *J. Food Sci.* 2000;65:273-279.
23. Hertog M, Hollman P. Potential Health Effects of the Dietary Flavonoid Quercetin. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1996;50:63-66.
24. Gey K., Stahelin H., Eichhölzer M. Poor Plasma Status of Carotene and Vitamin C is Associated with Higher Mortality from Ischemic Heart Disease and Stroke. *Clin Invest.* 1993 ;71 :3-6.
25. Ho C., *et al.* Antioxidative Effect of Polyphenol Extract Prepared from Various Chinese Teas. *Prev. Med.* 1992;21:520-525.
26. Choi H., Moore D. Induction of c-fos and c-jun gene Expression by Phenolic Antioxidants. *Mol. Endocrinol.* 1993;7:1596-1602.
27. Benavente O., *et al.* Use and Properties of Citrus Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 1997 ;45 :4505-4515.
28. Bomser J., *et al.* *In vitro* Anticancer Activity of Fruit Extracts from *Vaccinium* Species. *Planta Med.* 1996;62:212-216.
29. Kristenson M., *et al.* Antioxidant State and Mortality from Coronary Heart Disease in Lithuanian and Awedish Men: Concomitant Cross Sectional Study of Men Aged 50. *BMJ.* 1997;314:629:633.
30. Barry-Ryan C., O'Beirne D. Ascorbic Acid Retention in Shredded Iceberg Lettuce as Affected by Minimal Processing. *J. Food Sci.* 1999;64:350-352.
31. Villedo C., *et al.* *Biología.* 3 ed. México: Interamericana McGraw-Hill, 1996. XXXIV+1193p. (902-903).
32. Tai C., Chen B. Analysis and Stability of Carotenoids in the Flowers of Daylily (*Heemerocallis disticha*) as Affected by Various Treatments. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:5962-5968.

33. Palozza P., Kronsky N. The Inhibition of Radical Initiated Peroxidation of Microsomal Lipids by Both α -tocopherol and β -carotene. *Free Radical Biol Med.* 1991;11:407-414.
34. Gaziano J. Antioxidant Vitamins and Coronary Artery Disease Risk. *Am. J. Med.* 1994;97:18-28.
35. Katz F., Giese J. Science Gives Specialty Juice a Big Slice of the Market. *Food Tech.* 1998;52:44-48.
36. Howell A., *et al.* Inhibition of the Adherence of p-fimbriated *Escherichia coli* to Uroepithelial-cell surfaces by Proanthocyanidin Extracts from Cranberries. *N. Engl. J. Med.* 1998 ;339 :1085-1086.
37. Alimentos Antioxidantes. *Revista Consumer.* 2000;48. (en línea). Guatemala. Consultado 14 marzo 2002. Disponible en <http://www.revista.consumer.es>.
38. Kawaii S., *et al.* HL-60 Differentiating Activity and Flavonoid Content of the Readily Extractable Fraction Prepared from Citrus Juices. *J. Agric. Food Chem.* 1999 ;47 :128-135.
39. Galati E., *et al.* Biological Effects of Hesperidin, a Citrus Flavonoid; Antiinflammatory and Analgesic Activity. *Il Farmaco.* 1994;49:709-712.
40. Giese J. Antioxidants:Tools for Preventing Lipid Oxidation. *Food Tech.* 1996;11:73-80.
41. Aditivos para Alimentos. (en línea). Guatemala. Consultado 14 marzo 2002. Disponible en <http://www.geocities.com/grupoindustrialaisa>.
42. Iversen C. Black Currant Nectar: Effect of Processing and Storage on Anthocyanin and Ascorbic AcidContent. *J. Food Sci.* 1999;64:37-41.
43. Murillo E., Carrasquilla L., Islam M. Actividad Antioxidante en Frutas Tropicales. *Rev. Lat. Quím.* 2000;28:84-85.

44. Gil M., *et al.* Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship With Phenolic Composition and Processing. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:4581-4589.
45. Brand W., Cuvelier M., Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm.-Wiss.u.Technol.* 1995;28:25-30.
46. Da Porto C., *et al.* Antiradical Properties of Commercial Cognans Assessed by the DPPH Test. *J.Agric. Food Chem.* 2000;48:4241-4245.
47. Soares J., *et al.* Antioxidant Activity of Some Extracts of *Thymus zygis*. *Free Rad. Res.* 1997;26:469-478.
48. Hu C., Kitts D. Studies on the Antioxidant Activity of *Echinacea* Root Extract. *J.Agric. Food Chem.* 2000;48:1466-1472.
49. Hisatomi E., *et al.* Antioxidative Activity in the Pericarp and Seed of Japanese Pepper (*Xanthoxylum piperitumi* DC). *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:4924-4948.
50. Plummer D. *Introducción a la Bioquímica Práctica.* Colombia: McGraw-Hill Latinoamericana, 1981. 345p. (p. 137).
51. Zielinski H., Kosłowska H. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Cereal Grains and Their Different Morphological Fraction. *J. Agric. Food Chem.* 2000 ;48 :2008-2016.
52. Skoog D., Leary J. *Análisis Instrumental.* 4 ed. España: McGraw-Hill, 1994. XIV+935. (p.731-732).
53. Sun F., *et al.* *In vivo* Antioxidative Activity of Propolis Evaluated by the Interaction with Vitamins C and E and the Level of Lipid Hydroperoxides in Rats *J.Agric. Food Chem.* 2000;48:1462-1465.
54. Gao X., *et al.* Changes in Antioxidant Effects an their Relationship to Phytonutrients in Fruits of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation) *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1485-1490.

55. Moreiras O., Carbajal A., Cabrera L. Tablas de Composición de Alimentos. España: Ediciones Pirámides, 1995. 110p. (pp.70-73).
56. Menchú M., *et al.* Tabla de Composición de Alimentos de Centro América. Guatemala: INCAP, 1996. 91p. (p. 27).
57. Potter N., Hofchikis J. Ciencias de los Alimentos. España: Editorial Acribia, 1995. XIV+667p. (pp.476-478)

XIII. ANEXOS

Anexo 1
Valor nutritivo de jugos frutales en 100 gramos de porción comestible

Compuesto	Jugos de otras frutas ^a	Jugo de Naranja ^b
Agua (%)	88.10	89.60
Energía (kcal)	45.00	40.00
Proteína total (g)	0.40	0.40
Grasa total (g)	0.00	0.30
Carbohidratos (g)	11.50	9.30
Cenizas (g)	-----	0.40
Zinc (mg)	-----	0.05
Calcio (mg)	9.00	11.00
Fósforo (mg)	-----	15.00
Hierro (mg)	0.50	0.70
Vitamina A (mcg)	-----	13.00
Tiamina (B1) (mg)	0.04	0.05
Riboflavina (B2) (mg)	0.01	0.02
Niacina (mg)	0.30	0.20
Vitamina C (mg)	18.50	53.00

Fuente: ^a Moreiras O., *et al.* 1995 (55) y ^b Menchú M., *et al.* 1996 (56).

Anexo No. 2
Producción de jugos frutales

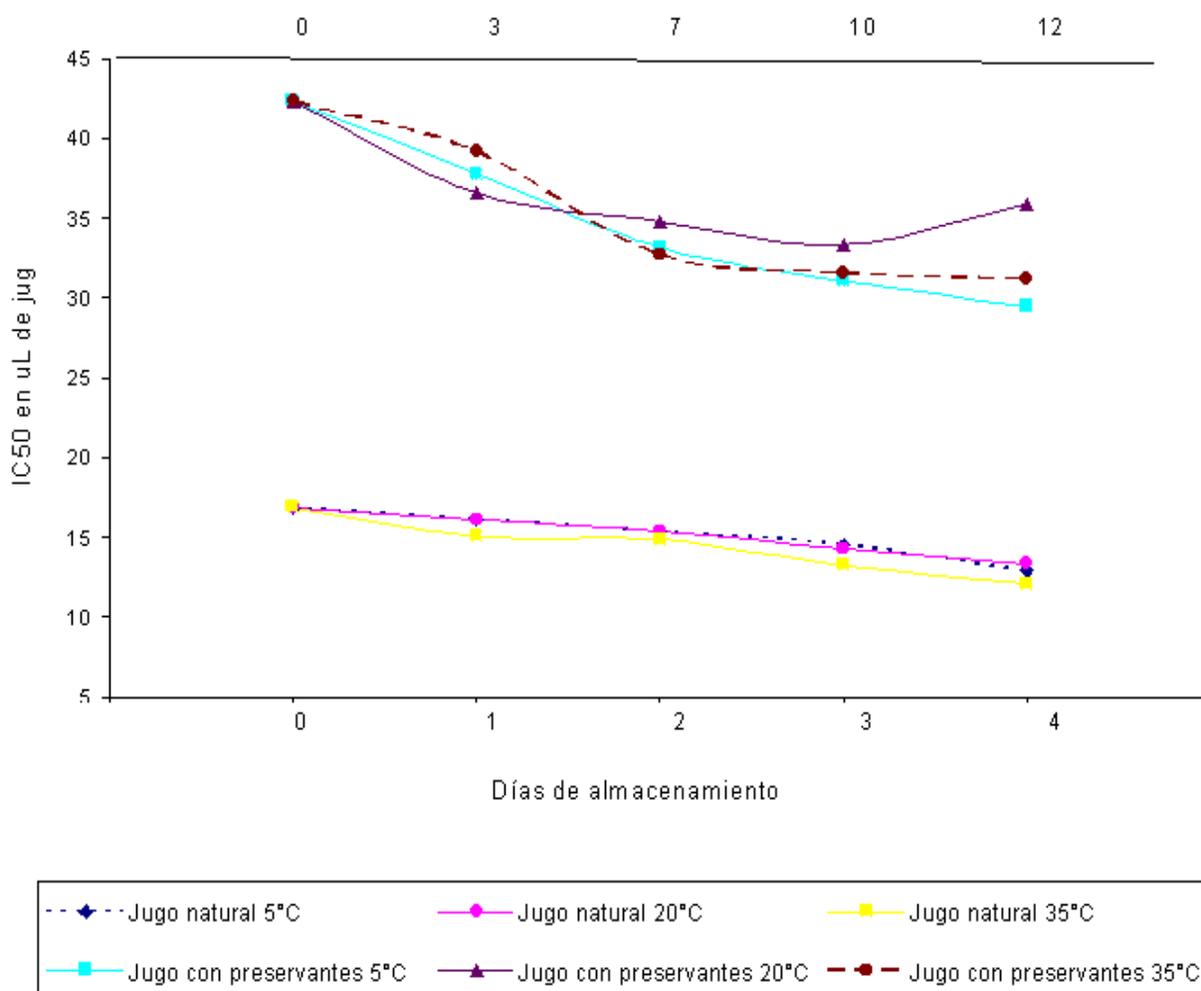
Fase de Producción	Descripción
Preparación de la fruta	Incluye la selección, el lavado, la extracción de semilla y el triturado.
Extracción	Consiste en ejercer presión mecánica sobre la fruta para obtener el jugo. Puede utilizarse extractores, prensas y algunas veces enzimas pectinolíticas.
Clarificación	El objeto de este paso es remover restos de pulpa que contenga el jugo. Se realiza por medio de filtros finos o centrífugas de alta velocidad que separan la pulpa, con base en las diferencias de densidad.
Extracción al aire	Se realiza con el fin de extraer el aire que quede dentro del jugo. Para ello se utiliza un aparato al vacío que reduce al mínimo la destrucción subsecuente de la vitamina C y otros cambios debidos al oxígeno.
Conservación	Esta fase puede realizarse por pasteurización, congelación, almacenamiento en atmósferas de gases inertes, concentración o desecación. Los jugos se pasteurizan para disminuir el crecimiento microbiano e inhibir las enzimas naturales.
Concentración	La concentración se hace necesaria debido a que todos los jugos naturales son bajos en sólidos, para esto se emplea un evaporador al vacío a temperatura moderada para conservar el sabor máximo.
Pasos adicionales	Incluyen la adición de esencia, el enlatado o envasado en botella y la congelación

Fuente: (11, 57).

Anexo No. 3 Gráficas de los resultados

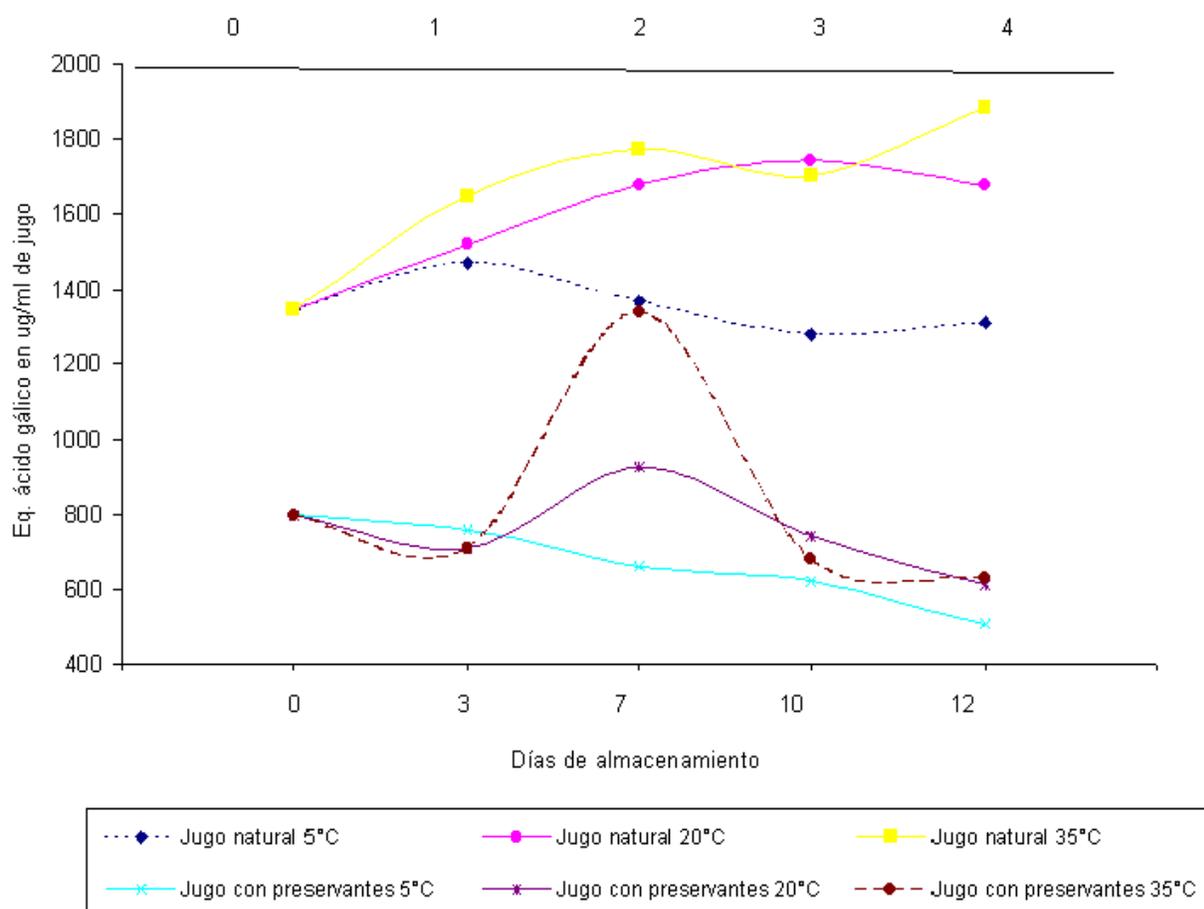
Gráfica 1.

Actividad antioxidante total en jugos de naranja natural y con preservantes almacenados a diferentes tiempos y temperaturas.



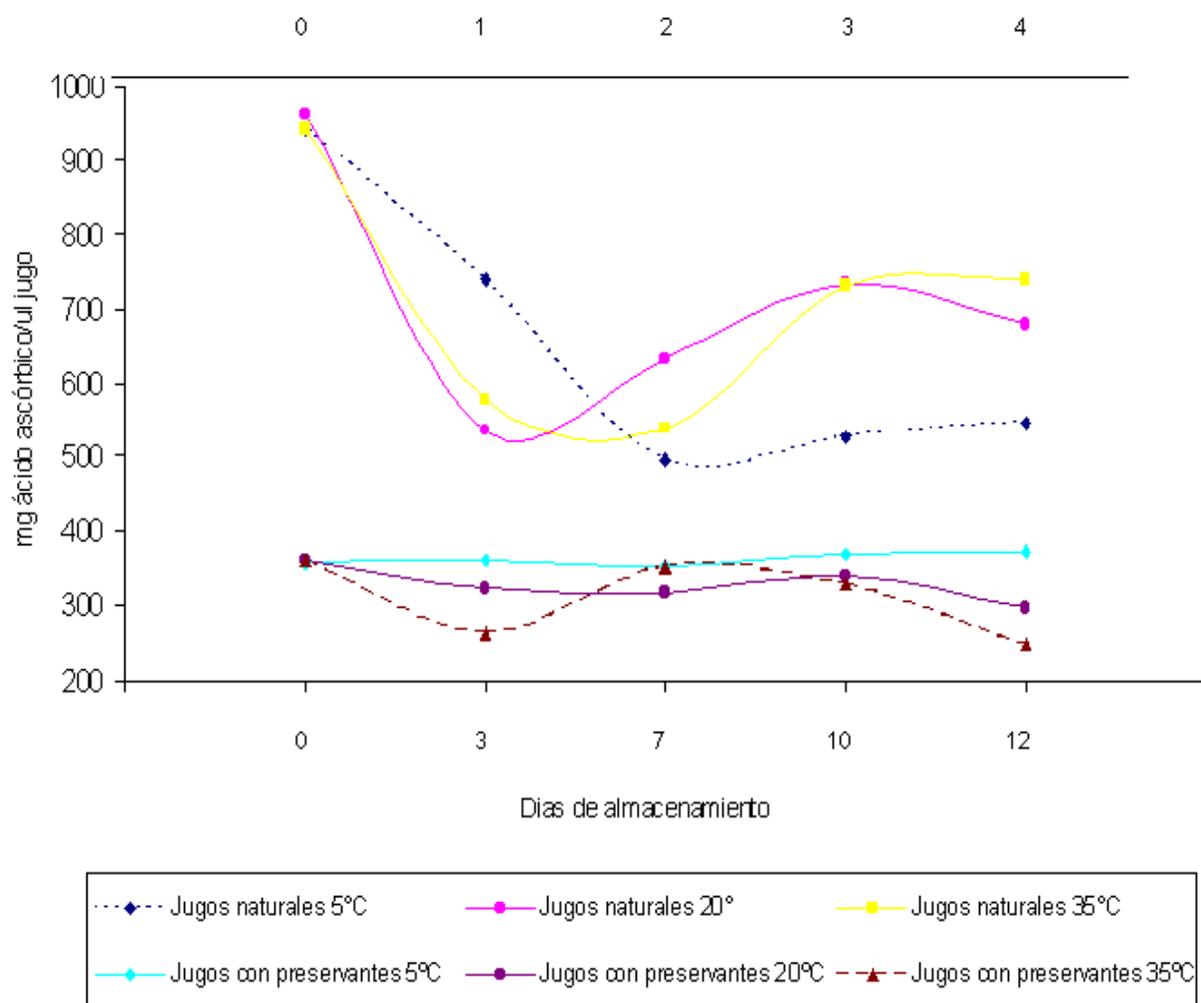
Gráfica 2.

Compuestos fenólicos totales en jugos de naranja natural y con preservantes almacenados a diferentes tiempos y temperaturas.



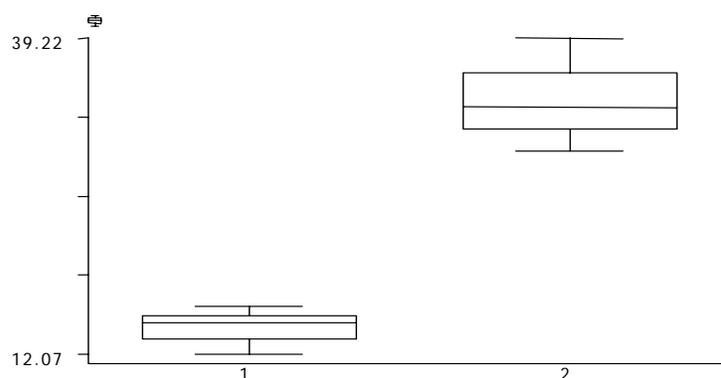
Gráfica 3.

Vitamina C en jugos de naranja natural y con preservantes almacenados a diferentes tiempos y temperaturas.

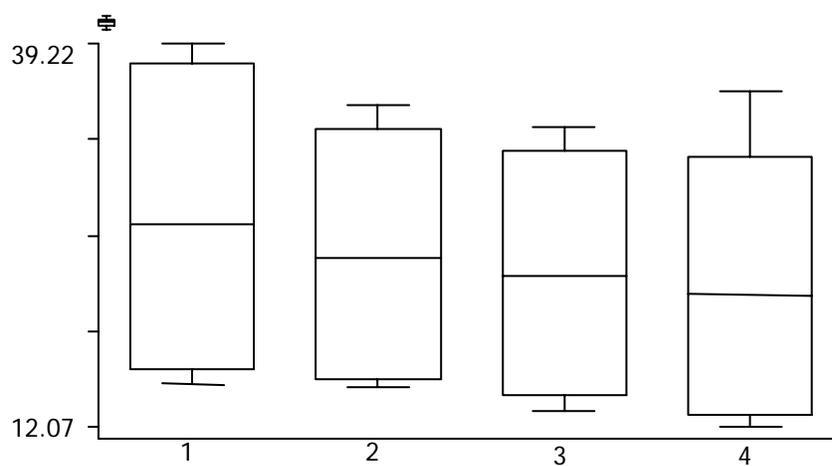


Anexo 4 Análisis Estadístico

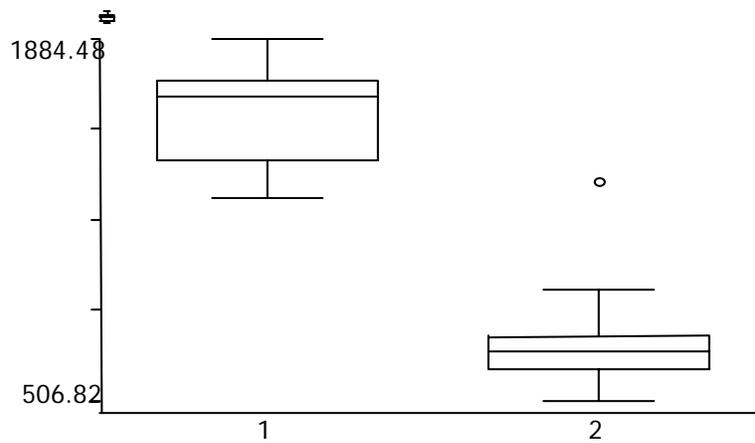
Gráfica 1. Actividad antioxidante en jugos naturales de naranja (1) y jugos de naranja con preservantes (2)



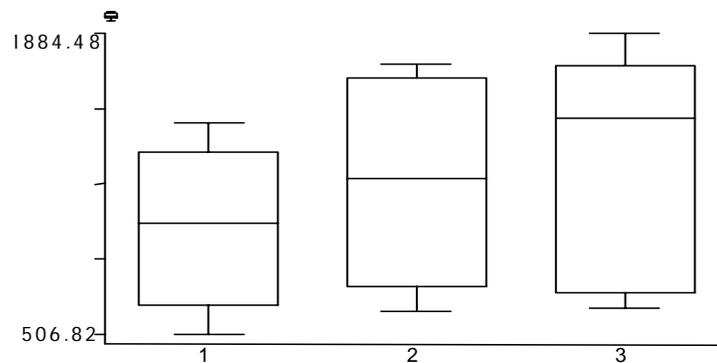
Gráfica 2. Variación de la actividad antioxidante en jugos naturales de naranja y jugos de naranja con preservantes en función de los días de almacenamiento.



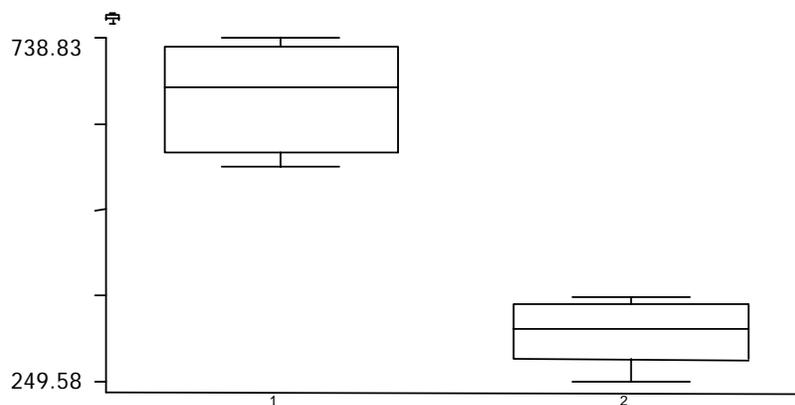
Gráfica 3. Compuestos fenólicos totales en jugos naturales de naranja (1) y jugos de naranja con preservantes(2)



Gráfica 4. Variación de los compuestos fenólicos totales en jugos naturales de naranja y jugos de naranja con preservantes en función de la temperatura de almacenamiento.



Gráfica 5. Vitamina C en jugos naturales de naranja (1) y jugos de naranja con preservantes (2).



- Análisis del efecto sobre la actividad antioxidante total de: tipo de jugo, días de almacenamiento, temperatura de almacenamiento, temperatura-días, jugos-días, jugos-temperatura
(ova ao jugos temp dias temp* dias jugos* dias jugos* temp)

Number of obs = 24 R-squared = 0.9960
 Root MSE = 1.25787 Adj R-squared = 0.9848

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	2379.88863	17	139.993449	88.48	0.0000
jugos	2272.92802	1	2272.92802	1436.53	0.0000
temp	7.64897195	2	3.82448598	2.42	0.1698
dias	67.5889042	3	22.5296347	14.24	0.0039
temp*dias	10.7904871	6	1.79841452	1.14	0.4402
jugos*dias	15.5348339	3	5.17827797	3.27	0.1009
jugos*temp	5.39741099	2	2.69870549	1.71	0.2591
Residual	9.49338927	6	1.58223154		
Total	2389.38202	23	103.886175		

- Análisis del efecto sobre la concentración de compuestos fenólicos totales de: tipo de jugo, temperatura de almacenamiento, días de almacenamiento, temperatura-días, jugos-días, jugos-temperatura.
(anova fenolico jugos temp dias temp* dias jugos* dias jugos* temp)

Number of obs = 24 R-squared = 0.9831
 Root MSE = 121.116 Adj R-squared = 0.9353

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	5124422.84	17	301436.638	20.55	0.0006
jugos	4292240.47	1	4292240.47	292.60	0.0000
temp	372985.468	2	186492.734	12.71	0.0070
dias	131178.728	3	43726.2426	2.98	0.1182
temp*dias	149780.533	6	24963.4221	1.70	0.2672
jugos*dias	130074.77	3	43358.2568	2.96	0.1199
jugos*temp	48162.868	2	24081.434	1.64	0.2700
Residual	88014.7232	6	14669.1205		
Total	5212437.56	23	226627.72		

- Análisis del efecto sobre la concentración de vitamina C de: tipo de jugo, temperatura de almacenamiento, días de almacenamiento, temperatura-días, jugos-días, jugos-temperatura. (anova vitc jugos temp dias temp* dias jugos* dias jugos* temp)

Number of obs = 24 R-squared = 0.9559
 Root MSE = 73.7489 Adj R-squared = 0.8311

Source	Partial SS	df	MS	F	Prob > F
Model	707994.032	17	41646.7077	7.66	0.0094
jugos	658720.481	1	658720.481	121.11	0.0000
temp	1153.31551	2	576.657755	0.11	0.9011
dias	2594.21515	3	864.738384	0.16	0.9201
temp*dias	16384.371	6	2730.7285	0.50	0.7888
jugos*dias	10017.7151	3	3339.23838	0.61	0.6306
jugos*temp	19123.9341	2	9561.96703	1.76	0.2507
Residual	32633.4009	6	5438.90015		
Total	740627.433	23	32201.1927		

Anexo 5

Análisis de varianza para las propiedades antioxidantes en jugos de naranja comerciales según el tipo de jugo.

Parámetro/Factor	Tipo de Jugo
Actividad Antioxidante Total	Significativo
Compuestos Fenólicos Totales	Significativo
Vitamina C	Significativo