



**El color de los zumos cítricos:  
Implicaciones sensoriales y desarrollo  
metodológico.**

Rocío Fernández Vázquez





**“El color de los zumos cítricos:  
implicaciones sensoriales y  
desarrollo metodológico”**

**Rocío Fernández Vázquez**

**Sevilla, Marzo 2013**



**D. Ana María Cameán Fernández**, Directora del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal de la Universidad de Sevilla y **D. José Manuel Vega Pérez**, Coordinador del Programa de Doctorado en Farmacia

**CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo ha sido realizado dentro del Programa de Doctorado en Farmacia por la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos Dña. Rocío Fernández Vázquez, siendo sus directores Dña. Isabel M<sup>a</sup>. Vicario Romero, D. Francisco José Heredia Mira y Dña. Dolores Hernanz Vila, habiéndose cumplido todos los requisitos legales vigentes,

Y para que conste, se expide y firma el presente certificado en Sevilla, a 13 de Marzo de 2013.



Fdo. Ana M<sup>a</sup> Cameán Fernández



p.o. M. Alvarez Satomaya

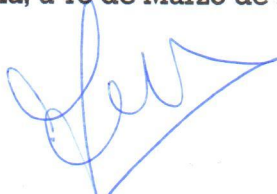
Fdo. José Manuel Vega Pérez





La Tesis titulada "***El color de los zumos cítricos: implicaciones sensoriales y desarrollo metodológico***", presentada por la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **Dña. Rocío Fernández Vázquez** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Área de Nutrición y bromatología del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla), bajo la dirección de los Doctores **Dña. Isabel María Vicario Romero**, Catedrática de la Universidad de Sevilla, **D. Francisco José Heredia Mira**, Catedrático de la Universidad de Sevilla y **Dña. Dolores Hernanz Vila**, Profesora Titular de Universidad de Sevilla. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, autorizan su presentación.

En Sevilla, a 13 de Marzo de 2013

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'Isabel'.

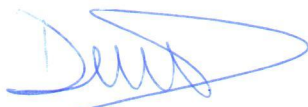
Fdo. Isabel M<sup>a</sup>. Vicario Romero

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'Rocío'.

Fdo. Rocío Fernández Vázquez

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'Francisco'.

Fdo. Francisco José Heredia Mira

A blue ink signature in cursive script, appearing to read 'Dolores'.

Fdo. Dolores Hernanz Vila

Directores de la Tesis





## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a los doctores Isabel Vicario, Dolores Hernanz y Francisco José Heredia, directores de esta tesis. Especial agradecimiento a Francisco Heredia por haberme dado la oportunidad de unirme a su fantástico grupo, a Isabel por su constante apoyo y ayuda, por todo lo que me ha transmitido día tras día, y a Dolores por todo lo que me ha enseñado y por sus palabras de ánimo. Estoy inmensamente agradecida por la confianza que los tres han depositado en mí, por haberme guiado en este proyecto y por haber tenido la suerte de trabajar con tres grandes profesionales y mejores personas.

A Carla Stinco, mi gran compañera y amiga todo este tiempo, por brindarme siempre su ayuda y apoyo, y por todo lo que me ha enseñado.

A Paco Rodríguez, por las innumerables veces que me ha echado una mano con los aspectos “informáticos”, y por supuesto por su sincera amistad.

A todos mis compañeros del grupo de Color y Calidad de los Alimentos, especialmente a los que comparto conmigo el día a día: M<sup>a</sup>José, Belén, M<sup>a</sup>Jesús, Jose Miguel, Julio, Fran, M<sup>a</sup>Luisa, Lourdes, Antonio, Ana, Paula, Rocío... Por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, porque de todos he aprendido montones de cosas y por haberme apoyado cuando lo he necesitado no sólo en lo personal sino también formando parte de mis catas.

A Felix, Luisa y Eva por su continua disponibilidad para resolver los “problemillas técnicos o burocráticos” que surgen.

A M<sup>a</sup>Jesús Vilches y todo el personal del CIDERTA, especialmente a Valeria, por haberme acogido con los brazos abiertos durante mi estancia en Huelva.

To Doctor Ian Fisk for directing my stay at the University of Nottingham. To him and Robert Linforth, Joanne Hort and Louise Hewson; I really appreciate all the things they taught me during my stay. I also would like to thank May, Candy, Rubén, Maxime, Carolina, Mai Ke, Agnes, Julie... and all the people who made those months much easier.

A Carolina Chaya, por la ayuda y disponibilidad incondicional que me brindó desde el día que me conoció. También agradezco la oportunidad que me dio de trabajar con ella en la Universidad Politécnica de Madrid, en un tiempo breve pero muy productivo.

A mis amigas de la carrera: Blanca, Vanesa, Elena y Miriam, porque con ellas empezó todo. Muchas gracias por todos los buenos momentos que hemos

pasado, por apoyarme y entenderme tanto y tan bien, y por hacer que esta amistad siga como el primer día, a pesar de la distancia.

A mis amigas “de toda la vida”: Loli, Rhut, Fri, Miriam, Cristina y Saray; porque habéis compartido conmigo infinidad de buenos momentos y habéis sabido estar también en los complicados. Contar con vuestra amistad es un verdadero privilegio para mí. También a Rocío por haberse convertido en un gran apoyo en tan poco tiempo.

Muy especialmente quiero dar las gracias a Fernando. Por escucharme siempre, y animarme tantas veces. Por haber aguantado mis ausencias, por su paciencia, por su apoyo, por todo su cariño y su capacidad para sacarme una sonrisa aunque tenga un mal día. Muchas gracias por formar parte de mi vida.

Finalmente quiero dar las gracias a toda mi numerosa familia, por hacerme sentir siempre respaldada y apoyada. A mi hermana Cristina, por ser una estupenda hermana mayor, y por su ayuda, sobre todo desde que estoy en Sevilla. Y muy especialmente quiero agradecer a mis padres todo lo que han hecho y hacen por mí cada día. Porque ellos siempre están ahí, escuchándome, apoyándome, aconsejándome y animándome cuando lo necesito. Muchas gracias porque sin vosotros no lo habría conseguido.

Quizás me haya extendido un poco, pero me siento muy afortunada por todos los que me rodean y tenía que aprovechar esta oportunidad para agradecerlo...

**!!!MIL GRACIAS A TODOS!!!**

Para la realización de este trabajo se ha contado con el apoyo institucional del proyecto de Excelencia de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía **“Implicaciones nutricionales y sensoriales del color de zumos cítricos andaluces y su influencia en la aceptación por el consumidor”** (P08-AGR03784), del que la doctora Isabel María Vicario Romero es investigadora principal, y la Beca Predoctoral asociada a dicho proyecto.



***A mis padres***

***A mis abuelos***



# ÍNDICE

---

➤ <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>I</b>
➤ <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
➤ <b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VII</b>
➤ <b>RESUMEN / ABSTRACT</b> .....	<b>1</b>
➤ <b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. EL ZUMO DE NARANJA	
1.1. La naranja dulce.....	5
1.1.1. Partes de la naranja .....	5
1.1.2. Variedades .....	6
1.2. El zumo de naranja.....	9
1.2.1. Definición .....	9
1.2.2. Producción y consumo.....	10
1.2.3. Procesado tecnológico .....	12
2. EL ANÁLISIS SENSORIAL	
2.1. Definición.....	17
2.2. Antecedentes históricos.....	18
2.3. Los sentidos y los atributos sensoriales .....	20
2.4. Factores que influyen en la evaluación sensorial.....	22
2.5. Los jueces en la evaluación sensorial .....	23
2.6. Aplicaciones de la evaluación sensorial en la industria.....	25
2.7. Herramientas para el análisis sensorial .....	27
2.7.1. Tipos de pruebas.....	28
2.7.2. Escalas de medida .....	32
2.8. El análisis sensorial en el zumo de naranja.....	35
2.8.1. Técnicas de análisis sensorial aplicadas al zumo de naranja.....	36
3. EL COLOR	
3.1. Medida del color.....	43
3.1.1. El espacio de color CIELAB .....	45
3.2. El color del zumo de naranja .....	48



3.2.1. Aplicación de la colorimetría triestímulo al análisis del color del zumo de naranja .....	51
3.2.2. Medida del color .....	51
3.3. Relación del color del zumo con otros atributos sensoriales .....	61
4. EL AROMA	
4.1. El aroma de los alimentos .....	63
4.2. El aroma en el zumo de naranja.....	65
4.2.1. Componentes volátiles característicos del zumo de naranja. ....	67
4.2.2. Análisis instrumental del aroma en el zumo de naranja.....	69
4.2.3. Evaluación sensorial del aroma en el zumo de naranja .....	76
➔ <b>OBJETIVOS</b> .....	79
➔ <b>METODOLOGÍA</b>	
1. PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS	
1.1. Determinación del pH.....	83
1.2. Determinación de la acidez total.....	84
1.3. Fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.....	85
1.4. Contenido de pulpa .....	87
1.5. Contenido de lípidos en pulpa.....	88
2. ANÁLISIS DEL COLOR	
2.1. Medida del color por espectrorradiometría .....	90
2.2. Medida del color por espectrofotometría .....	91
2.3. Análisis de imagen digital.....	93
3. MEDIDA DE LA DISTRIBUCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	94
4. ANÁLISIS DE VOLÁTILES	
4.1. Determinación de volátiles por cromatografía de gases .....	95
4.2. Determinación de volátiles por APCI-MS (Ionización Química a Presión Atmosférica con espectrometría de masas).....	98
4.2.1. Análisis del espacio de cabeza estático.....	98
4.2.2. Análisis del espacio de cabeza dinámico .....	99
4.2.3. Análisis <i>in vivo</i> .....	99

5. PRUEBAS SENSORIALES	
5.1. Pruebas discriminativas .....	101
5.2. Prueba descriptiva .....	104
5.3. Ensayos hedónicos.....	104
6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS	
6.1. Análisis descriptivo y exploratorio .....	106
6.2. Modelo Lineal General. Análisis de la Varianza (ANOVA).....	106
6.3. Pruebas no paramétricas: Prueba de Wilcoxon .....	107
6.4. Análisis discriminante .....	107
6.5. Técnicas de regresión.....	108
6.6. Análisis estadísticos para las pruebas de comparación por parejas.....	110
6.7. Análisis estadísticos para las pruebas triangulares .....	110
6.8. Análisis estadísticos para las pruebas de ordenación .....	111
6.9. Análisis estadísticos aplicados a estudios de consumidores.....	114

## ➤ RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Capítulo 1. NUEVAS APORTACIONES A LA METODOLOGÍA INSTRUMENTAL PARA LA MEDIDA DEL COLOR EN ZUMO DE NARANJA.

• Antecedentes .....	117
• Sección I. Estudio del color de los zumos de naranja comerciales (espectrorradiometría) y utilidad de las coordenadas colorimétricas para su clasificación. ....	120
- Objetivos .....	120
- Muestras .....	120
- Resultados y discusión.....	120
• Sección II. Puesta a punto de la metodología para el análisis de imagen de los zumos de naranja y su evaluación visual. Influencia de las condiciones de medida .....	123
- Objetivos .....	123
- Muestras .....	123
- Resultados y discusión.....	123
• Sección III. Correlación Espectrorradiometría - Análisis de Imagen ....	129
- Objetivos .....	129
- Muestras .....	129
- Resultados y discusión.....	130
• Conclusiones.....	133

*Publicaciones: “Estudio preliminar sobre la utilidad del color para clasificar los zumos de naranja según su elaboración”*

*“Digital image analysis and visual evaluation of orange juice: influence of different measurements conditions”*

## **Capítulo 2. EVALUACIÓN INSTRUMENTAL Y VISUAL DE ZUMOS DE NARANJA DE DISTINTAS VARIEDADES, Y ESTUDIO DE CONSUMIDORES**

- Antecedentes ..... 135
- Objetivos..... 136
- Muestras..... 137
- Resultados y discusión ..... 137
- Conclusiones..... 140

*Publicación: “Visual and instrumental evaluation of orange juice color: a consumers’ preference study”*

## **Capítulo 3. EVALUACIÓN VISUAL DEL ZUMO DE NARANJA: ENTRENAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE UMBRAL.**

- Antecedentes ..... 143
- Objetivos..... 144
- Muestras..... 145
- Resultados y discusión ..... 354
- Conclusiones..... 145

*Publicación: “Colour training and colour differences thresholds in orange juice”.*

## **Capítulo 4. INFLUENCIA DEL COLOR EN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL DEL ZUMO DE NARANJA Y LA EVALUACIÓN HEDÓNICA DEL CONSUMIDOR**

- Antecedentes ..... 153
- Objetivos..... 140
- Muestras..... 140
- Resultados y discusión ..... 145
- Conclusiones..... 15

*Publicación: “Color influences sensory perception and liking of orange juice”*

## **Capítulo 5. EFECTO DEL PROCESADO INDUSTRIAL (DESAMARGADO) EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES DEL ZUMO DE NARANJA**

- Antecedentes ..... 161
- Objetivos..... 162
- Muestras..... 162
- Resultados y discusión ..... 164

- Conclusiones..... 168  
*Publicación: "Industrial Orange Juice Debittering: Effect on volatile compounds and overall quality attributes".*

**Capítulo 6. PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS NOVEDOSAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS DEL ZUMO DE NARANJA (ANÁLISIS IN-VITRO E IN-VIVO) Y ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA PULPA EN LA LIBERACIÓN DE VOLÁTILES**

- Antecedentes ..... 169
- Objetivos..... 171
- Muestras..... 171
- Resultados y discusión ..... 172
- Conclusiones..... 177  
*Publicación: "Headspace delivery of limonene from the serum and non-serum fractions of orange juice in-vitro and in-vivo"*

- **CONCLUSIONES GENERALES / GENERAL CONCLUSIONS ..... 179**
- **REFERENCIAS..... 183**
- **ANEXO A. COLORIMETRÍA ..... 197**
- **ANEXO B. TABLAS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS ESTADÍSTICOS..... 209**



## ÍNDICE DE TABLAS

1. Variedades de naranja clasificadas en grupos .....	8
2. Factores que pueden afectar al análisis sensorial.....	23
3. Descriptores utilizados en la evaluación de la fase gustativa del zumo .....	38
4. Descriptores utilizados en la evaluación de la fase olfativa del zumo .....	39
5. Otros descriptores utilizados en la evaluación del zumo .....	40
6. Volátiles identificados en OJ frescos, usando GC-FID y GC-MS .....	66
7. Variedades de naranjas y mandarinas analizadas .....	129
8. Coeficientes de correlaciones simples .....	132
9. Coeficientes de correlación ( $R^2$ ) obtenidos entre las valoraciones del panel entrenado y los parámetros colorimétricos .....	148





## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Partes de la naranja.....	6
2. Naranja Valencia Late .....	7
3. Naranja Washington.....	7
4. Naranja Sanguinelli .....	8
5. Porcentajes de consumo de zumos de distintas frutas. ....	10
6. Producción andaluza de cítricos (2008) .....	12
7. Lavado industrial de naranjas .....	13
8. Extractor de zumo FMC.....	14
9. Envasado aséptico .....	15
10. Papel del análisis sensorial en el desarrollo y mejora de productos .....	26
11. Ejemplo de gráfico “tela de araña”.....	31
12. Árbol de decisión para la elección de las pruebas sensoriales.....	32
13. Escala facial.....	33
14. Escala no estructurada.....	34
15. Escala estructurada hedónica.....	34
16. Escala LAM.....	35
17. Espacio de color CIELAB.....	46
18. Cabina de iluminación controlada VeriVide .....	52
19. Ejemplo del test de Ishihara.....	54
20. Test de Farnsworth–Munsell 100 Hue.....	54
21. Atlas Munsell .....	55
22. Carta de colores del sistema DIN.....	56
23. Representación del sistema OSA-UCS .....	56

24. Estándares de color del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos ..	57
25. Fundamento de un colorímetro .....	58
26. Esquema de un espectrofotómetro de reflectancia difusa. ....	59
27. Esquema de un espectrorradiómetro.....	59
28. Sistema DigiEye: Cabina de iluminación, cámara digital y ordenador .....	61
29. Esquema de un cromatógrafo de gases .....	72
30. Esquema de un cromatógrafo de gases equipado con puerto de olfacción.....	73
31. Esquema de la fuente APCI .....	74
32. pHmetro Grinson.....	83
33. Espectrofotómetro de diodos UV-Vis HP 8453.....	85
34. Recta de calibrado del ácido gálico .....	86
35. Centrífuga Allegra X-12R Centrifuge .....	88
36. Espectrorradiómetro CAS 140-B. ....	91
37. Colorímetro Hunterlab Color Quest XE .....	92
38. Sistema DigiEye y carta de color estándar para calibración.....	93
39. Analizador de tamaño de partículas.....	94
40. Rectas de calibrado de los compuestos volátiles .....	97
41. Espectrómetro de masas Platform LCZ .....	98
42. Recta de calibrado del limoneno para APCI-MS estático .....	99
43. Ensayo APCI <i>in vivo</i> .....	100
44. Ejemplo de recta de calibrado del limoneno para APCI-MS <i>in vivo</i> .....	100
45. Prueba de comparación por parejas.....	102
46. Prueba triangular .....	103
47. Prueba de ordenación.....	103

---

48. Localización de las muestras: (a) en el plano $a^*b^*$ y (b) en valores de $L^*$ , analizados por espectrorradiometría .....	130
49. Localización de las muestras: (a) en el plano $a^*b^*$ y (b) en valores de $L^*$ , por análisis de imagen digital. ....	131
50. Disposición de las muestras en la evaluación visual.....	149
51. Esquema del proceso de desamargado .....	163



**ABREVIATURAS**

AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
AOV	Valor de actividad odorante
APCI-MS	Ionización química a presión atmosférica con espectrometría de masas
API	Ionización a Presión Atmosférica
ASE	Equivalentes de estándar en medio acuoso
BaB	Fondo negro
BaG	Fondo gris
BaW	Fondo blanco
CIE	Comisión Internacional de la Iluminación
COJ	Zumo de naranja control
COJ-I	Zumo comercial 1
COJ-II	Zumo comercial 2
DOJ	Zumo desamargado
DP	Proceso de desamargado
DS	Desviación estándar
F	Fisher
FID	Detector de ionización de llama
FOJ	Zumo procedente de naranjas frescas
GC	Cromatografía de gases
GCO	Cromatografía de gases con detección olfatométrica
GOJ	Zumo de naranja verdoso
H <sub>0</sub>	Hipótesis nula
H <sub>1</sub>	Hipótesis alternativa
IS	Patrón interno
ISO	Organización internacional de estandarización
NF	Navel Foyos
NP	Navel Powel
OJ	Zumo de naranja
PCA	Análisis de componentes principales
QDA	Análisis cuantitativo descriptivo
RAE	Equivalentes de actividad de retinol
RL	Rohde Late

ROJ	Zumo de naranja rojizo
SB	Entorno negro
SDA	Análisis lineal discriminante
SG	Entorno gris
SPME	Microextracción en fase sólida
SW	Entorno blanco
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
VM	Valencia Midnight
ZC	Zumo a base de concentrado
ZE	Zumo procedente de naranjas exprimidas
ZEA	Zumo procedente de naranjas exprimidas conservados a temperatura ambiente
ZER	Zumo procedente de naranjas exprimidas conservados en refrigeración

# *Resumen*







## RESUMEN

El zumo de naranja es uno de los zumos de fruta más populares y de mayor consumo a nivel mundial, debido en gran parte, a sus apreciadas propiedades sensoriales. La importancia del color en el zumo de naranja está ampliamente reconocida, ya que éste es el primer atributo que perciben y valoran los consumidores. En la presente Memoria se ha profundizado en los aspectos metodológicos de su medida instrumental y sensorial en el zumo de naranja, así como en aspectos relacionados con el papel de la composición (contenido en pulpa) en el flavor.

En primer lugar, se ha realizado un estudio metodológico para definir las condiciones óptimas de la medida del color por análisis de imagen digital, una técnica novedosa y escasamente aplicada al zumo de naranja. Por otro lado, se ha profundizado en aspectos del análisis y de la interpretación de la evaluación sensorial del color mediante distintos enfoques. Se ha desarrollado un entrenamiento específico para la evaluación visual de color del zumo, se han realizados estudios para establecer los umbrales de diferenciación de color en el mismo, y se han investigado las preferencias de los consumidores hacia el color en distintas variedades de zumos. También se han estudiado las implicaciones del color en otros atributos sensoriales relacionados con la calidad (sabor y flavor) y finalmente, se han establecido las correlación entre la evaluación instrumental y visual del color. El efecto que el desamargado, una de las etapas menos estudiadas del procesado industrial, tiene en parámetros de calidad del zumo de naranjas relacionados con su percepción sensorial, también ha sido abordado en esta Memoria. Finalmente se ha estudiado el efecto que distintos contenidos de pulpa del zumo tienen en la percepción del flavor, mediante técnicas novedosas APCI-MS *in vitro* e *in vivo*.

Los resultados obtenidos muestran que el fondo, el entorno y el espesor de la muestra influyen en los resultados del análisis de imagen digital del zumo de naranja, por lo que se propone un entorno gris ( $L^* = 50$ ), fondo blanco y un espesor fijo para la realización de las medidas colorimétricas por esta técnica.

Se obtuvieron correlaciones significativas entre espectrorradiometría y análisis de imagen digital en todos los parámetros colorimétricos.

Para el entrenamiento específico en la evaluación visual del zumo de naranja, se propone la intensidad como atributo para evaluar conjuntamente claridad y croma, con buenas correlaciones con los parámetros instrumentales. Además se han establecido los valores umbrales de diferenciación del color específicos para el zumo de naranja en 1.5 unidades CIELAB para un panel entrenado y 2.8 unidades CIELAB para un panel no entrenado.

Por otra parte, se ha comprobado que pequeñas variaciones en el color de los zumos afectan a la percepción del sabor de los mismos, y que la evaluación hedónica esperada (antes de probar el zumo) y real (después de probarlo) de los consumidores también se ve afectada por estas variaciones del color en los zumos de naranja.

Se ha demostrado que el desamargado afecta a los parámetros de calidad del zumo de naranja, principalmente al color, aroma y sabor. Dichas modificaciones pueden ser percibidas por panelistas no entrenados, que muestran preferencia por el aroma de los zumos antes del desamargado. Sin embargo, respecto al gusto y al color, no existen preferencias significativas por los zumos, antes o después de este proceso.

Por último, se ha estudiado el papel de la pulpa, en relación a su aporte de limoneno, en la percepción del flavor. La adición de pulpa aumenta significativamente la concentración de limoneno en el espacio de cabeza estático y la persistencia del mismo en el espacio de cabeza dinámico. Además, aumenta significativamente la liberación del limoneno al aire exhalado después del consumo del zumo de naranja hasta niveles del 10% de pulpa, aunque la percepción sensorial del aroma y el flavor a naranja por parte de los panelistas no se modifica como consecuencia de esta adición.

**ABSTRACT**

Orange juice is one of the most popular fruit juices and one of the most consumed all over the world due, mainly, to its appreciated sensory properties. The importance of colour in orange juice is widely recognised, as it is the first attribute that consumers perceive and evaluate. The present memory has deepened in the methodological aspects of their sensory and instrumental measurement in orange juice, as well as in aspects related to the role of the composition (content in pulp) in the flavor.

First of all, a methodological study has been done in order to define the optimal conditions of colour measurement by digital image analysis, a novel technique and scarcely applied to orange juice. On the other hand, our investigations have deepened into the analysis and interpretation of the sensory evaluation of colour by different approaches. A specific training for the visual evaluation of orange juice colour has been developed; studies have been carried out to establish the colour difference threshold in it, and the consumer preferences towards the orange juice colour in different orange varieties has been investigated. Moreover, implications of colour in other sensory attributes related to quality (taste and flavour) have also been studied and, finally, correlations have been established between instrumental and visual colour evaluation. The effect of debittering, one of the least-studied stages in the industrial processing, in orange juice quality parameters related to sensory perception, has also been dealt with in this Memory. Finally we have studied the effect of different amount of pulp in the flavour perception by novel techniques APCI-MS *in vitro* and *in vivo*.

The results obtained show that the background, the surrounding and the sample's thickness have an influence in the results of the digital image analysis, so grey surrounding ( $L^* = 50$ ), white background and a specific sample's thickness are suggested for colour measurements by this technique. Significant correlations between spectroradiometry and digital image analysis were obtained for all the colorimetric parameters.

For the specific training in orange juice visual evaluation, intensity is proposed as an attribute to jointly evaluate chroma and lightness parameters in orange juice, showing good correlations with instrumental colour parameters. Furthermore, the specific colour-difference threshold values for orange juice colour have been established in 1.5 CIELAB units for a trained observer and 2.8 CIELAB units for non-trained observer.

On the other hand, it has been probed that slight variations in orange juice colour affect its flavour and taste perception, and also the expected liking (before tasting the orange juice) and actual liking (after tasting it) of orange juice consumers'.

It has been proved that debittering affects quality parameters of orange juice, mainly colour, aroma and taste. These modifications can be perceived by non-trained panellists who show a preference for the aroma of non-debittered orange juices. However, concerning taste and colour, significant preferences to orange juice before or after the debittering process are not observed.

Finally, it has been explored the role of the pulp, in relation to its contribution to limonene concentration, on the flavour perception. Pulp addition increases significantly the equilibrium headspace concentration and the persistence of limonene to headspace disturbance. Moreover, it enhances the limonene delivery to the nasal exhaled air, up to 10% of pulp levels, although, sensory perception of aroma and orange flavour by judges is not modified by this addition.

# *Introducción*





## **1. EL ZUMO DE NARANJA**

### **1.1. La naranja dulce**

La naranja dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, es el fruto del naranjo dulce, árbol perteneciente al género Citrus de la familia Rutáceas, que comprende más de 1.600 especies.

El género botánico Citrus es el más importante de la familia, y consta de unas 20 especies con frutos comestibles, siendo el naranjo dulce la especie más importante cultivada de este género. Tras ella le siguen en importancia mandarinos, limoneros, pomelos, limeros y kumquats. No se debe confundir el naranjo dulce con el amargo (*Citrus aurantium* L.), cultivado desde la antigüedad como árbol ornamental y para obtener fragancias de sus frutos.

La naranja dulce es la que se utiliza en la elaboración del zumo de naranja. Las principales condiciones que deberán reunir estas naranjas para la industria elaboradora de zumos son:

- 1.- Alto contenido de zumo: Las variedades que ahora se industrializan alcanzan rendimientos en zumos que pueden llegar hasta el 40%.
- 2.- Elevado porcentaje de sólidos solubles (10,5- 12,0° Brix).
- 3.- Fuerte coloración.
- 4.- Largo periodo de utilización.

A estas condiciones deberíamos añadir otras cualidades no menos importantes para la fabricación de zumos, entre las destacan las responsables de características sensoriales como el contenido de pulpa y el aroma (Jordan, 1999).

#### **1.1.1. Partes de la naranja**

En los frutos se distinguen tres partes:

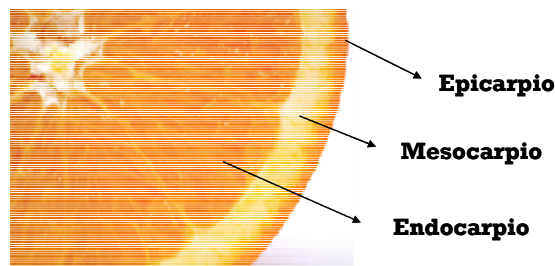
- Epicarpio o flavedo: Contiene las sustancias responsables del color exterior de la fruta (clorofila, carotenos y xantofila) y glándulas oleíferas con



sesquiterpenos que protegen a la fruta de los insectos y microorganismos (Figura 1).

- Mesocarpio o albedo: Constituido por celulosa, hidratos de carbono y sustancias pécticas. El tejido esta formado por células irregulares de color blanco y aspecto esponjoso, con grandes espacios intercelulares llenos de aire. El epicarpio y mesocarpio constituyen el pericarpio (cáscara) (Figura 1).

- Endocarpio: Es la parte comestible de los cítricos y supone el 80% del peso de la fruta. Está formado por 7-12 gajos carnosos también llamados cascos o lóbulos. Los gajos están envueltos por una sutil membrana, en cuyo interior se desarrollan numerosas células glandulosas, ricas en zumo, y que se denominan también celdas o vesículas. Las semillas se ubican en el ángulo interno del lóbulo.



**Figura 1.** Partes de la naranja

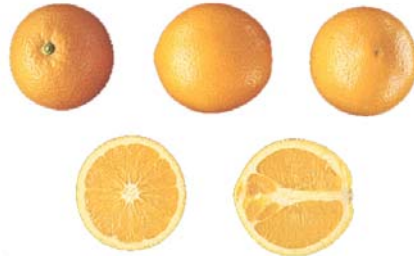
### 1.1.2. Variedades

Las variedades de naranja existentes en España y su aptitud para la industrialización permiten realizar su clasificación en tres grandes grupos:

- Blancas y blancas tardías

Las variedades de este grupo (Tabla 1) proceden de árboles de gran vigor, frondosos, de tamaño medio a grande y hábito de crecimiento abierto, muy vigorosos, en el interior de la copa. Los frutos son de buena calidad con una o muy pocas semillas y de buena conservación. Estas naranjas tienen una coloración amarillo anaranjada, y no poseen ombligo ni pigmentación sanguina. Entre las variedades más importantes de este grupo se encuentra la variedad

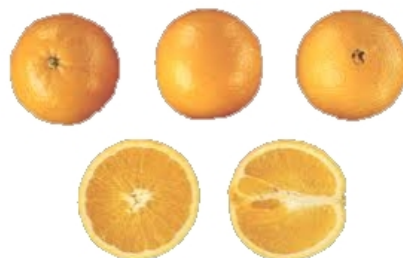
“Valencia Late”. Esta ofrece un gran contenido en sólidos, un gran porcentaje de zumo, buen color y no tiene semillas; su producción es tardía por lo que alcanza buenos precios en el mercado.



**Figura 2.** Naranja Valencia Late

- Navel o umbilicadas.

Llamadas así por el "ombligo" (navel en inglés) que se forma en la base del fruto debido al desarrollo de un nuevo fruto incluido en el principal. Las naranjas del grupo “Navel” (Tabla 1) tienen limitada su aplicación industrial como consecuencia del elevado contenido en limonoides del zumo, entre los que destaca la limonina (glucósido que se hidroliza impartiendo un fuerte sabor amargo a los zumos en el proceso de tratamiento térmico y que lo hace inadecuado para el consumo). Las variedades “Washington Navel”, “Thomson Navel”, “Navelina” y “Navelate”, están entre las variedades de mayor difusión dentro de este grupo.



**Figura 3.** Naranja Washington Navel

- Sanguinas (pigmentadas)

El grupo de las “Sanguinas” (Tabla1) se caracteriza porque son frutos que presentan en el flavedo de la corteza y en la pulpa comestible un color sanguino característico, debido a su contenido en pigmentos rojo oscuros, hidrosolubles, de naturaleza antociánica. Estas naranjas, denominadas rojas o de sangre, poseen zumos de excelente sabor y aroma, aunque tienen el

inconveniente del color rojizo, más o menos pronunciado, característico de los frutos y que en procesado térmico se deteriora por oscurecimiento. Entre las variedades de este grupo destaca la “Sanguinelli”.



**Figura 4.** Naranja Sanguinelli

**Tabla 1.** Variedades de naranja clasificadas en grupos

<b>Blancas y blancas tardías</b>	<b>Navel o umbilicadas</b>	<b>Sanguinas (pigmentadas)</b>
Ambersweet	Bahianinha	Doble fina
Barberina	Barnfield	Entre fina
Berna	Fisher	Maltaise
Cadenera	Fukumoto	Moro
Castellana	Leng	Sanguinelli
Comuna	Navelate	
Delta Seedles	Navelina	
Hamlin	Navel Caracara	
Macetera	Navel Chislett	
Midknight	Navel Lane Late	
Natal	Navel Foyos	
Pera	Navel Powel	
Salustiana	Navel Ricalate	
Shamouti	Newhall	
Valencia Late	Rhode Summer	
Valencia Delta	Rhode Late	
Verna	Thomson Navel	
	Washington Navel	

## **1.2. El zumo de naranja**

### **1.2.1. Definición**

El zumo de frutas se define como un producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido a partir de frutas sanas y maduras, frescas o conservadas por el frío, de una o varias especies, que posea el color, el aroma y el sabor característicos de los zumos de la fruta de la que procede. En el caso de los cítricos, el zumo debe proceder del endocarpio de la fruta (Directiva 2001/112/CE, 2001).

De acuerdo con la legislación actual (Real Decreto 1050/2003) dependiendo del tratamiento industrial al que son sometidos, se pueden encontrar distintos tipos de zumos:

- Zumos frescos de fruta: Son los zumos obtenidos a través de frutos sanos, frescos, maduros y lavados obtenidos mediante procesado industrial autorizado. Estarán constituidos por el líquido solo, clarificado, o por el líquido y pulpa en suspensión correspondientes al endocarpio y estarán exentos de restos de epicarpio, mesocarpio y semillas.

- Zumo de frutas concentrado: Es el producto obtenido a partir de zumo de frutas de una o varias especies, por eliminación física de una parte determinada del agua. Cuando el producto esté destinado al consumo directo, dicha eliminación será de al menos un 50 %.

- Zumo de frutas a base de concentrado: Designa el producto obtenido mediante la incorporación al zumo de frutas concentrado de la cantidad de agua extraída al zumo en el proceso de concentración y la restitución de los aromas, y en su caso, la pulpa y celdillas perdidas del zumo, pero recuperados en el proceso de producción del zumo de frutas de que se trate o de zumos de frutas de la misma especie.

- Zumo de frutas deshidratado o en polvo: Designa el producto obtenido a partir de zumo de frutas de una o varias especies por eliminación física de la práctica totalidad del agua.

- Néctar de frutas: Se entiende por néctar de frutas el producto susceptible de fermentación, pero no fermentado, obtenido por adición de agua y de azúcares y/o miel a los productos definidos anteriormente.

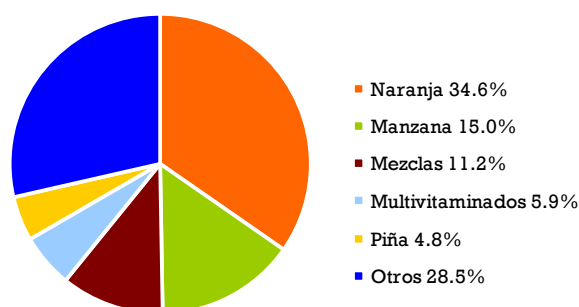
### 1.2.2. Producción y consumo

#### El consumo de zumos de frutas y néctares en la UE

El consumo total de zumos y néctares en la Unión Europea se situó en 10.771 millones de litros en 2011, según datos de la Asociación de la Industria de Zumos y Néctares de la Unión Europea (Canadean, 2011).

El mercado europeo representa un total de 11.275 millones de litros. Del total, un 51,3% corresponde a marca blanca (que progresa sobre el 44% de 2005), y un 48,7% a marca de fabricante.

En cuanto a las frutas de procedencia, el zumo más popular es el procedente de la naranja, que supone un tercio del total de los zumos del mercado mundial. El siguiente zumo más consumido es el de manzana pero su porcentaje desciende al 15%.



**Figura 5.** Porcentajes de consumo de zumos de distintas frutas.

En general, el consumo de naranja fresca está disminuyendo debido a que está siendo reemplazado por el consumo de zumo de naranja. Según la FAO, en la Comunidad Europea el consumo per cápita de naranjas frescas se redujo de

13 a 9,7 kg, mientras que el consumo de naranja procesada, casi se duplicó y se situó en torno a los 30 Kg (en equivalentes de fruta fresca).

### **Consumo de zumos en España**

El consumo español de zumos y néctares en 2011 fue de 1.068 millones de litros, lo cual sitúa a nuestro país en casi un 10% del mercado total europeo, y en cuarto lugar por detrás de Alemania, Francia y Reino Unido, y por delante de Italia. En cuanto al consumo per cápita, los españoles consumimos menos zumos que los alemanes pero más que los habitantes del Reino Unido y próximos al nivel de los países escandinavos o muy desarrollados (Suecia y Holanda) (Canadean, 2011).

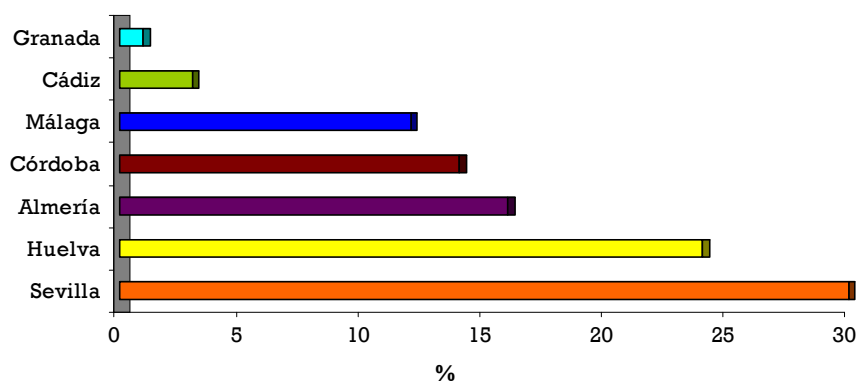
Los meses de verano representan el periodo de mayor consumo de zumos y néctares. De hecho, según el panel de consumo alimentario del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MARM), un significativo porcentaje de aproximadamente el 50% del consumo en el hogar de estos productos corresponde al periodo de junio a septiembre.

Respecto a las frutas de procedencia, el mercado de zumos y néctares español está concentrado fundamentalmente en tres, que captan el 68,5% del consumo total y que crecen por encima de la media sectorial en el último año, excepto en el caso del melocotón. El zumo de naranja es el más consumido, con un 28,6% del mercado y un 2% de progresión durante 2011, seguido de la piña (con una cuota del 20%) y el melocotón (19,7%). Hay que destacar el desarrollo que están experimentando los productos que combinan varias frutas en su composición (por ejemplo melocotón y uva), llegando a presentar un crecimiento anual del 10% y la existencia de néctares sin azúcares añadidos. Otra novedad en el mercado han sido los productos “funcionales” a base de zumos, incluyendo también aquellos que mezclan zumo con leche y leche se soja.

En Andalucía, el sector citrícola es fundamental en la economía. Es la región con mayor incremento productivo correspondiente al cultivo de cítricos en comparación con el resto de comunidades autónomas productoras (Valencia,

Murcia o Cataluña), y se ha consolidado como la segunda región productora de cítricos en España, tan sólo por detrás de la Comunidad Valenciana y muy por encima de Murcia. Además se prevé un crecimiento en los próximos años, ya que un 13% de las plantaciones son jóvenes y aún no han entrado en producción (Consejería de Agricultura Pesca y Alimentación, 2011).

Sevilla, Huelva y Córdoba destacan de entre las provincias andaluzas con mayor superficie citrícola de naranjo, habiendo experimentado incrementos muy considerables (144%, 51% Y 184%, respectivamente) desde el 2000 al 2008. Huelva y Sevilla también presentan altos porcentajes de superficie dedicada al cultivo de mandarina y Málaga, por su parte, destaca de entre todas las provincias andaluzas en superficie destinada al cultivo de limonero.



**Figura 6.** Producción andaluza de cítricos (2008)

### 1.2.3. Procesado tecnológico

Las etapas normalmente realizadas en la industria de los zumos cítricos son:

- Selección previa a la entrada en planta: Antes de la llegada a las instalaciones de elaboración, se realiza un seguimiento de la fruta en el campo para cosecharla en el punto óptimo de madurez.

- **Recepción:** La fruta llega a la planta procesadora a granel en camiones. Por medio de una plataforma hidráulica se vacía dentro de una tolva de alimentación. Antes de pasar a la línea de procesado es analizada para garantizar que cumple con los estándares de calidad establecidos (adecuado rendimiento de zumo, porcentaje de sólidos solubles, acidez...). Una vez verificado este cumplimiento se da el visto bueno para que se pueda procesar.

- **Lavado:** Constituye la primera etapa de la línea de procesado. Su objetivo es garantizar la higiene eliminando la suciedad y parte de la cera natural. En esta etapa la fruta es sometida a un lavado enérgico con agua, generalmente mediante el rociado de una cortina de agua, mientras gira sobre rodillos rotativos (Figura 7).



**Figura 7.** Lavado industrial de naranjas

- **Selección:** La fruta pasa por una cinta de inspección donde las que no son aptas son eliminadas. De esta manera solamente la fruta idónea se convertirá finalmente en zumo.

- **Extracción de zumo:** La extracción de un zumo cítrico ha de hacerse de forma rápida para evitar daños irreparables a la calidad y evitando que pasen al zumo elementos que producen amargor y que se encuentran en la piel, semillas, membranas, etc. La extracción industrial se realiza mediante extractores específicos como el FMC (“Food Machinery Corporation”) o el extractor Brown. Posteriormente se tamiza el producto para eliminar parte de la pulpa así como restos de corteza y de la piel del gajo, que puedan quedar (etapa de clarificación o acabado). En ocasiones, cuando la madurez de las



naranjas no es la adecuada, es necesario un proceso de desamargado para eliminar la limonina, principal responsable del amargor. Este proceso puede realizarse mediante enzimas bacterianos inmovilizados o por adsorción (Ting y col., 1979).



**Figura 8.** Extractor de zumo FMC

- Tratamiento del zumo (pasteurización o concentración): Para asegurar que el producto no se va a alterar, los zumos y néctares de frutas se someten a un tratamiento térmico que será distinto según el tipo de zumo que se desee obtener.

Una posibilidad es la pasteurización, que es un proceso esencial para conseguir un periodo de larga vida en los zumos vegetales; en ella se consigue la eliminación de microorganismos patógenos a base de calentar el zumo a una temperatura dada durante un tiempo determinado. Sin embargo, en el caso de los zumos de los frutos cítricos resulta más importante la inactivación de las enzimas naturalmente presentes, en especial la actividad de la enzima pectinmetilesterasa (PME) responsable de la inestabilidad de la turbidez natural del zumo, para ello deben alcanzarse condiciones de temperatura-tiempo más enérgicas (hasta 98 °C durante 30 segundos) que las necesarias para lograr la destrucción microbiana, a su bajo pH.

Otra opción es la concentración. En esta etapa lo que se hace es eliminar parte del agua del zumo. Tiene que efectuarse a temperaturas bajas hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 65 °Brix. Finalmente el zumo concentrado es enfriado hasta alcanzar 1°C para pasar al almacenamiento o directamente a máquinas de llenado. La ventaja de esta etapa es que se reduce

la cantidad a almacenar y se abarata el transporte. Posteriormente, a la hora de su envasado final se incorpora el agua extraída en el proceso de concentración para dar lugar al zumo o néctar correspondiente.

- Envasado: El zumo o néctar es envasado en su envase final para ser distribuido y que llegue al consumidor. Los zumos se envasan por medio de envasadoras asépticas. Los envases mas comúnmente utilizados son Tetra Pak o PET.



**Figura 9.** Envasado aséptico

- Subproductos: En el proceso de obtención de zumos cítricos se producen gran cantidad de residuos, tales como cortezas, pulpas y semillas. El rendimiento en zumo es del 40-50% del peso total de fruta. Sacar un beneficio económico a los subproductos, evitando a su vez la problemática medioambiental de su eliminación, es de gran importancia. Los subproductos más usuales son los destinados hacia alimentación de ganado y producción de aceite de semillas, materia prima para la industria confitera, concentrados para bebidas refrescantes, aislamiento de pigmentos naturales, aislamiento de diferentes productos para la industria farmacéutica, producción de ácido láctico, pectinas y alcohol, y por último obtención de aceites esenciales (Jordan, 1999).

Todas las etapas que se realizan en la industria para obtener los zumos de naranja tendrán efectos más o menos acusados en las propiedades finales del zumo de naranja, tanto nutricionales como sensoriales. Algunas de ellas han sido ampliamente estudiadas (Lee y Coates, 2003; Perez-Cacho y Rouseff, 2008; Stinco C.M. y col., 2010). Sin embargo, algunos procesos como el desamargado,

no han sido estudiados a nivel industrial, por lo que no existen trabajos que profundicen en el cambio que éste puede suponer en las propiedades sensoriales del zumo de naranja. Así, la presente Memoria incluye un estudio del efecto de dicho proceso tecnológico sobre la calidad sensorial del zumo de naranja.

## 2. ANÁLISIS SENSORIAL

### 2.1. Definición

La norma UNE 87-001-94 (Asociación Española de Normalización, 1994) define el análisis sensorial como el examen de las propiedades organolépticas de un producto.

Etimológicamente, la palabra sensorial viene del latín “*sensus*”, que quiere decir “sentido”.

En la actualidad, existen métodos instrumentales físicos o químicos para medir atributos como el color, la textura y el aroma en los alimentos. Estos métodos, son de gran utilidad en el control de calidad de la industria alimentaria y se caracterizan por su rapidez y reproducibilidad. Sin embargo, presentan limitaciones e inconvenientes ante determinados componentes de un alimento, bien porque estos sean numerosos o porque las interacciones entre ellos sean complejas. En este sentido, el análisis sensorial puede dar una visión integradora de la calidad sensorial de un producto, aspecto de gran importancia teniendo en cuenta que al final, el éxito de un alimento depende de las reacciones subjetivas del consumidor (Ibáñez Moya y Barcina Angulo, 2001). Así, la evaluación sensorial es una técnica de medición y análisis tan importante como los métodos químicos, físicos o microbiológicos.

En el análisis sensorial intervienen varias disciplinas, entre ellas la psicofisiología, que explica como nuestros sentidos se impresionan así como su posterior interpretación y respuesta en el cerebro; la psicología, que propone la forma de transformar una técnica claramente subjetiva en un instrumento de medida objetivo; la estadística, mediante la cual se extraen conclusiones a través de la transformación y reducción de los datos; y la sociología, que teniendo en cuenta los usos y las costumbres de los colectivos a los que se dirigen los productos, ayuda en la interpretación de los resultados (Ibáñez Moya y Barcina Angulo, 2001).

## **2.2. Antecedentes históricos**

En la antigüedad algunos alimentos producidos en determinadas regiones o ciertos pueblos, se reconocían y apreciaban ya por ciertas características organolépticas y así nos han llegado a través de las citas de los escritores clásicos: los aceites y vinos de Lesbos, las ostras de Tarento, los dátiles de Egipto, los aceites de Al-andaluz, etc. (Valls y col., 1999).

Ya en Francia, en el año 1312, existía la Asociación de Gourmets-Catadores de Vino, y hay documentos franceses del año 1793 que hablan del “Degustador”, como aquella persona cuyo trabajo es catar el vino para definir su calidad y por consiguiente, fijar su precio justo.

Pasada esta primera etapa, empieza a desarrollarse con la industria alimentaria cierto concepto de calidad sensorial aunque entonces ésta sólo se refería a la opinión personal del dueño o encargado de la fábrica. En 1940 comienza la tecnificación de la producción de alimentos y con ella el control de los procesos desde un punto de vista biológico y químico, presuponiendo que mediante dicho control se conseguiría un producto final de calidad.

Durante la Segunda Guerra Mundial, se observó que aunque las raciones suministradas a los soldados norteamericanos eran correctas desde el punto de vista nutricional, éstas eran rechazadas por sus cualidades organolépticas. Se intensificaron entonces los estudios de carácter científico en el área de la evaluación sensorial así como el interés por los estudios de aceptabilidad de los alimentos. A partir de aquí, y hasta la década de los 60, los laboratorios de las fuerzas armadas norteamericanas fueron los pioneros en las investigaciones sobre la aceptabilidad de los alimentos (Ibáñez Moya y Barcina Angulo, 2001).

Entre los años 50 y 70, se empiezan a plantear los problemas que surgen en la medida y control de la calidad sensorial. Se definen los atributos primarios que integran la calidad sensorial (aspecto, sabor y textura), y se desarrollan y adaptan las pruebas sensoriales al control de la calidad de los alimentos. Simultáneamente se estudia de forma comparativa la utilidad de las distintas

pruebas (Peryam y Swartz, 1950), el tratamiento estadístico de las respuestas obtenidas (Harrison y Elder, 1950) y se pone de manifiesto la necesidad de un conocimiento básico del proceso por el cual se realiza la evaluación de un alimento.

A partir de los años 70, el análisis sensorial se desarrolla rápidamente, a pesar de que, en un principio se dudara de su carácter objetivo y fiable como medida de calidad, debido a la subjetividad inherente al ser humano como instrumento de medida. Frente a esa idea, se puede argumentar que los órganos de los sentidos se pueden entrenar para obtener respuestas objetivas cuando son estas últimas las que interesan (Ibáñez Moya y Barcina Angulo, 2001). Se han publicado numerosos trabajos, en los que se estudian las características, las técnicas, la metodología, los tratamientos estadísticos, etc., que influyen en la evaluación sensorial (Banfield y Harries, 1975; O'Mahony, 1979).

La necesidad de sistematización inherente al análisis sensorial ha llevado a que los diferentes Centros de Normalización desarrollen y publiquen normas y directrices a las que deben ajustarse las valoraciones sensoriales, para lo cual, previamente se han definido términos, condiciones y formas de obtener y presentar resultados. En España, las normas UNE definen los diferentes aspectos relacionados con el análisis sensorial como su definición, términos a emplear, directrices para el análisis de las muestras, distintos tipos de pruebas, etc. (Valls y col., 1999).

Hoy en día no cabe duda de que la evaluación sensorial tiene el carácter de ciencia y se utiliza como herramienta objetiva con un aceptable grado de precisión y reproducibilidad.

### **2.3. Los sentidos y los atributos sensoriales**

Los sentidos son los medios con los que el ser humano percibe y detecta el mundo que lo rodea (Anzaldúa Morales, 1994), así, a través de ellos se percibe la información que se maneja en los procesos de evaluación sensorial.

El ser humano tiene cinco sentidos: la vista, el oído el olfato, el gusto y el tacto.

La vista: es la capacidad de detectar las ondas electromagnéticas dentro de la luz visible por el ojo e interpretar por el cerebro la imagen. La luz penetra en el ojo a través de la pupila y proyecta la imagen de los objetos sobre la retina. La proyección produce ciertas reacciones químicas en algunas sustancias de la retina, y el estímulo debido a la energía de las reacciones se transforma en una señal nerviosa. Ésta es transmitida al cerebro por el nervio óptico y allí es interpretada como la imagen del objeto.

El oído: es el sentido de la percepción de vibraciones del medio que oscilen entre 20 y 20000 Hz. Estas vibraciones son transmitidas hacia las orejas, y luego amplificadas por el tímpano y los huesecillos del oído medio y por el oído interno, y detectadas e interpretadas por el cerebro. El sonido se puede también detectar como vibraciones conducidas a través del cuerpo por el tacto. Las frecuencias que están fuera del campo citado, más bajas y más altas, solamente se detectan de esta manera.

El olfato: Este sentido nos permite percibir el olor de lo que nos rodea. El órgano mediante el cual funciona el sentido del olfato es la nariz, o más propiamente dicho, todo el sistema nasal, donde la nariz es la parte externa y visible. En el interior de la nariz existen regiones cavernosas cubiertas de una mucosa pituitaria, la cual lleva hacia células y terminaciones nerviosas que reconocen los distintos olores, transmitiendo al cerebro la sensación olfativa. Las sustancias olorosas llegan a las fosas nasales y se difunden a través de la membrana mucosa para ponerse en contacto con las terminaciones nerviosas. El cerebro interpreta la señal correspondiente a cada sustancia como un olor (Ackerman, 2011).

El gusto: La percepción del gusto se debe a un reconocimiento químico de la estructura de las sustancias. Los receptores para el gusto son las papilas gustativas que se encuentran principalmente en la lengua, pero también están localizadas en el paladar y cerca de la faringe. Las papilas gustativas pueden detectar cuatro gustos básicos: salado, dulce, amargo, y agrio. La lengua también puede detectar un sabor llamado "umami" por receptores sensibles a los aminoácidos. El mensaje nervioso de las papilas llega al cerebro, donde es interpretado.

El tacto: Sirve para percibir una variedad de sensaciones tales como la temperatura del medio y de los objetos, el peso de éstos o las características de su superficie. El sentido del tacto está localizado en las terminaciones nerviosas que están situadas justo debajo de la piel de todo el cuerpo. Estas terminaciones transportan las sensaciones hacia el cerebro. El número de receptores varía en toda la piel por lo que hay sectores de la piel que poseen mayor sensibilidad que otros.

Por atributos sensoriales entendemos, en general, todo lo que se percibe a través de los sentidos. Según diversos estudios (Anzaldúa Morales, 1994; de Penna, 1982; Meilgaard y col., 2007; Szczesniak, 1998) los atributos sensoriales pueden dividirse de acuerdo a los sentidos por los que son percibidos en:

- Apariencia: Generalmente se detecta a través de la vista que comprende el color, el brillo, la forma y puede dar una idea de la textura.

- Gusto: El gusto se detecta en la cavidad bucal, específicamente en la lengua, donde se perciben los sabores.

- Textura: Se detecta mediante el sentido del tacto, que está localizado prácticamente en la superficie de todo el cuerpo. Mediante el tacto se pueden conocer las características mecánicas, geométricas y de composición de muchos materiales, incluidos los alimentos.

- Aroma: El aroma se percibe por medio del olfato, que se encuentra en la cavidad nasal.



- Sonido: Su receptor es el oído y se le conoce por la intensidad, altura y timbre.

- Flavor: Define a una sensación compleja, siempre agradable, que se obtiene por la estimulación de varios sentidos que incluyen gusto, olfato, tacto, y probablemente vista y oído, junto con un fuerte componente psíquico que hacen muy difícil su descripción. Este componente psíquico relaciona todas las sensaciones percibidas dando una percepción agradable o desagradable del conjunto (Valls y col., 1999).

#### **2.4. Factores que influyen en la evaluación sensorial**

A diferencia de las medidas instrumentales, la evaluación sensorial, puede verse afectada por factores psicológicos o fisiológicos. Debemos ser conscientes de estos factores y elegir o diseñar procedimientos adecuados que eliminen o reduzcan este efecto (Kemp y col., 2009). Las principales fuentes de error que se pueden encontrar se dividen en factores psicológicos, fisiológicos y culturales (Tabla 2).

El primer grupo incluye aquellos errores causados por la propia psicología de los individuos incluyendo errores como la sugestión, distracción, habituación, el error de tendencia central o los efectos provocados por contraste y convergencia, el orden de la muestra o la proximidad.

Dentro de los factores fisiológicos se incluyen aquellos aspectos físicos de los panelistas que pueden interferir en la evaluación sensorial, como ciertas enfermedades o condiciones físicas. También se encuentran dentro de este grupo los errores motivados por las respuestas del individuo a los estímulos, como la adaptación, la potenciación o la sinergia.

Finalmente los factores culturales tienen en cuenta aquellos errores motivados por el hecho de que en las pruebas participen evaluadores de diferentes culturas o localización geográfica. El profesional del análisis sensorial debe ser consciente del impacto que esto puede tener en el análisis

sensorial. Por ejemplo, para algunas culturas, los números utilizados para codificar los productos pueden tener connotaciones importantes, comer en público puede ser considerado como un tabú social o las restricciones espirituales pueden influir en la selección de la muestra. Además, el uso de una escala puede variar entre culturas.

**Tabla 2.** Factores que pueden afectar al análisis sensorial.

<b>Factores psicológicos</b>	<b>Factores fisiológicos</b>
Error de aceptación	Adaptación
Error de sugestión	Interacción entre estímulos
Error de distracción	Potenciación
Error lógico	Sinergia
Efecto de halo y proximidad	Supresión
Efecto de orden	Condiciones físicas
Habituaación	<b>Factores culturales</b>
Inversión de atributos	Connotaciones de los números
Efectos de contraste y convergencia	Problemas con la traducción
Error de tendencia central	
Error de motivación	

## 2.5. Los jueces en la evaluación sensorial

La selección de las personas que forman parte de un proceso de evaluación sensorial es un factor del que depende en gran parte el éxito y la validez del resultado del proceso de evaluación sensorial (de Penna, 1982; Watts, 1989; Damasio y Costell, 1991; Espinosa, 2007).

Es necesario determinar, en primer lugar, el número de jueces que deben participar. Después, hay que seleccionarlos, explicarles de forma adecuada cómo han de realizar sus evaluaciones y darles el entrenamiento si fuera necesario (Anzaldúa Morales, 1994).

El número de jueces requerido para realizar una determinada prueba de análisis sensorial depende de varios factores, entre los que se encuentran el

objetivo de la prueba, el procedimiento a seguir y el entrenamiento que ello implica, la variabilidad del producto y la repetibilidad y coherencia de los resultados de los jueces. Existen cuatro tipos de jueces.

- Juez experto

El juez experto es una persona que tiene gran experiencia en un determinado tipo de alimento, posee gran sensibilidad para percibir las diferencias entre las muestras y para distinguir y evaluar las características del alimento (Larmond, 1985; Ackerman, 2011). Su habilidad, experiencia y criterio hacen que sólo sea necesaria su respuesta para realizar la valoración del alimento. Estos jueces deben mantenerse “en forma” y deben abstenerse por completo del tabaco, alcohol, las drogas, y el uso de alimentos muy condimentados. Además, nunca deben consumir el producto con el que trabajan fuera de las pruebas.

- Juez entrenado

Es una persona que posee una buena sensibilidad para la detección de propiedades sensoriales y ha recibido una formación y preparación en el ámbito de la evaluación sensorial. Estas personas deben abstenerse, como los jueces expertos, de hábitos que alteren su capacidad de percepción del gusto y el olfato. Los jueces entrenados participan principalmente en pruebas sensoriales descriptivas o en pruebas discriminativas complejas. Cuando se llevan a cabo este tipo de pruebas, el número de participantes debe ser de siete como mínimo y 15 como máximo (Larmond, 1985), aunque no existe un acuerdo definitivo sobre el número de personas que deben integrar un equipo sensorial analítico descriptivo (Ibáñez Moya y Barcina Angulo, 2001).

- Juez semientrenado

Es un término muy poco específico. Se trata de personas que son seleccionadas por su agudeza sensorial y han sido preparadas para participar en pruebas discriminantes sencillas, que no requieren términos definidos exhaustivamente ni realizarse con demasiada frecuencia. Las pruebas con

jueces semientrenados deben realizarse con un mínimo de 10 jueces y un máximo de 20 o 25 (Larmond, 1985).

- Juez consumidor

El juez afectivo es el sujeto que no están vinculadas a pruebas sensoriales, ni trabajan con alimentos como investigadores o empleados de fábricas procesadoras de alimentos, ni efectúan evaluaciones sensoriales periódicas. Es importante escoger jueces que sean los consumidores habituales o potenciales del producto a evaluar.

El objetivo que suelen perseguir los procesos de evaluación sensorial en los que intervienen este tipo de juez, es conocer la aceptación, preferencia o nivel de agrado que estas personas tienen con relación al producto evaluado.

En general, el número de jueces afectivos en cada prueba debe ser grande para minimizar la variación propia de la subjetividad de las respuestas, de forma que sólo aparezcan las diferencias más importantes del producto sujeto a estudio.

## **2.6. Aplicaciones de la evaluación sensorial en la industria**

El papel de la evaluación sensorial es de gran importancia en todas las etapas de producción y desarrollo de la industria alimentaria, ya que es imprescindible conocer las características y la aceptabilidad del producto.

El campo para aplicar el análisis sensorial es muy amplio. Así, puede ser utilizado en los distintos departamentos de producción, ventas, control de calidad y desarrollo de un producto de una empresa alimentaria (Figura 10). El análisis sensorial sirve de herramienta de coordinación constante entre los distintos departamentos interdependientes de la empresa, lo cual ayuda a un mejor conocimiento y cumplimiento de sus objetivos (Ibáñez Moya y Barcina Angulo, 2001).



**Figura 10.** Papel del análisis sensorial en el desarrollo y mejora de productos alimentarios (Pagliarini y col. (1991))

Las aplicaciones que tiene la evaluación sensorial en la industria, se detallan a continuación (Stone y Sidel, 1995):

- Control del proceso de fabricación: Influencia en el cambio de materia prima, ingredientes y cambios en las condiciones del proceso (Hougaard y col., 2011).

- Desarrollo del producto: La investigación y el desarrollo de productos es otra de las aplicaciones del análisis sensorial. El estudio de defectos sensoriales o atributos deseables tras la modificación de una fórmula es una etapa necesaria para la industria (Cruz y col., 2010; Henriques y col., 2009).

- Estudios de vida útil: La vida útil de los alimentos en la mayoría de los casos ya no está definida sólo por el aspecto sanitario (riesgo para la salud) sino también por el rechazo desde el punto de vista sensorial. Los defectos sensoriales en el alimento suelen aparecer mucho más rápido que la pérdida de inocuidad. Cuando las empresas necesitan determinar la fecha de vencimiento

de un alimento pueden llevar a cabo un estudio completo para evaluar las características sensoriales del alimento a lo largo de su vida útil (Fernández y col., 2009).

- Establecimiento de los límites y grados de calidad: La calidad es un término complejo, difícil de definir y de carácter multidimensional. Después de asegurar la calidad nutricional y sanitaria, es necesario comprobar que se ha alcanzado una calidad sensorial adecuada (Serrem y col., 2011; Vallverdú-Queralt y col., 2013).

- Caracterización del producto: Es necesaria la caracterización sensorial y la correlación con las características fisicoquímicas del producto para definir su perfil sensorial (Guárdia y col., 2010).

- Estudio comparativo de muestras, estudio de aceptación con consumidores: la evaluación sensorial es muy útil para establecer la relación de un producto con otros similares que pudieran competir con él en el mercado. Así, las pruebas de aceptación y preferencia de consumidor son de gran interés para la industria (Sorenson y col., 2011).

Se puede concluir que la evaluación sensorial desempeña un papel de gran importancia en numerosas actividades relacionadas con los alimentos, siendo de especial interés para la industria aplicar los resultados del análisis sensorial y asociar éstos con datos obtenidos de manera instrumental (Ibáñez Moya y Barcina Angulo, 2001).

## **2.7. Herramientas para el análisis sensorial**

El análisis sensorial es la técnica más fiable para evaluar la percepción humana de la apariencia, sabor, textura, y demás atributos de cualquier producto alimenticio. Se utiliza para describir o caracterizar un producto (por el panel entrenado) o para el examen de su aceptación por los consumidores (por panel de consumidores) (Rouseff y col., 2009).

### **2.7.1. Tipos de pruebas**

Para evaluar las diferencias, semejanzas, calidad, intensidad de los atributos sensoriales y la aceptación o el rechazo de un producto, se han desarrollado diferentes pruebas sensoriales.

Existen diversas formas de clasificarlas, aunque todos los autores coinciden en que éstas se dividen en dos grandes grupos (Watts, 1989; Stone y Sidel, 2004) por una parte, las pruebas analíticas, orientadas al producto y compuestas por las pruebas discriminativas y descriptivas, que describen y diferencian los productos, y, por otra, las pruebas afectivas (orientadas al consumidor), que tienen como objetivo estudiar las preferencias y aversiones de los consumidores al producto objeto de estudio. Así, en función del objetivo del estudio tendremos que seleccionar una u otra prueba de todas las disponibles (Figura 12).

#### **- Pruebas discriminativas**

En las pruebas discriminativas se desea conocer si existen diferencias o no entre dos o más muestras, en alguna característica o teniéndolas en cuenta todas conjuntamente. No requieren el entrenamiento previo del evaluador, por lo que son muy prácticas para ciertas situaciones que pueden plantearse en la industria así como para investigación.

Existen diversos ensayos que pueden utilizarse para estudiar si existen diferencias entre productos.

- Pruebas de comparación pareada: En estas pruebas se presentan dos muestras al juez y se le pide que las compare en cuanto a alguna característica sensorial e indique cual de las dos tiene mayor intensidad de dicha propiedad.

- Prueba "A" - No "A": Es una variante de la prueba de comparación pareada. Se le presenta al sujeto una serie de muestras, parte de la misma está constituida por la muestra "A", mientras que otra parte es diferente de la muestra "A". Para cada muestra, se debe determinar si es o no idéntica a "A".

- Prueba triangular: Es una de las pruebas más utilizadas. Al panelista se le presentan tres muestras simultáneamente: dos de ellas son iguales y una diferente. Se le pide señalar la diferente.

- Prueba dúo-trío: Es una alternativa a la prueba triangular, en ella se presenta a los panelistas tres muestras simultáneas, de las cuales una de ellas está marcada como muestra de referencia y dos muestras están codificadas, con números aleatorios. Una de las muestras codificadas es igual a la muestra patrón y la otra es diferente. El panelista debe probar primero la muestra de referencia y luego las muestras codificadas e indicar cuál es igual a la muestra patrón.

- Prueba dos de cinco: En esta prueba se presentan cinco muestras, de las cuales dos pertenecen a una serie y tres a otra. La persona consultada debe agrupar los dos juegos de muestras.

- Prueba de ordenamiento: Consiste en ordenar un grupo de muestras de acuerdo a la intensidad de un atributo concreto.

#### - Pruebas descriptivas

Estas pruebas, permiten describir de una manera muy precisa el producto, por medio de descriptores. Se pide a los jueces que utilicen descriptores para describir el producto y medir las intensidades correspondientes. Cabe señalar que con la información generada no pueden estimarse las preferencias o el gusto del consumidor.

En este tipo de pruebas, la definición de los atributos sensoriales es de especial relevancia en el análisis descriptivo, ya que uno de los objetivos es el de establecer una terminología compartida e interpretada del mismo modo por todos los jueces analíticos. Algunos atributos sensoriales no pueden ser descritos por un solo criterio, sino como una combinación o agrupación de varias características que conformen el atributo en cuestión (Civille y Szczesniak, 1973; Damasio y Costell, 1991).



Podemos encontrar distintas técnicas de evaluación descriptiva, entre ellas encontramos las siguientes:

- **Perfil de flavor:** Este análisis es un método cualitativo y semi-cuantitativo que consiste en describir el olor y sabor integral de un producto, así como sus atributos sensoriales individuales (Damasio y Costell, 1991). A través de él se definen el orden de aparición de cada atributo, grado de intensidad de cada uno de ellos, sabor residual e impresión general del sabor y el olor. Permite obtener un cuadro sensorial completo de todos los atributos sensoriales relacionados con el aroma y el sabor del producto estudiado.

- **Análisis del perfil de textura:** El análisis del perfil de la textura de un producto, particularmente de un alimento, presenta cierta complejidad a la hora de evaluar sus características y su intensidad (Costell, 2002). La prueba de perfil de la textura comprende características mecánicas y características geométricas.

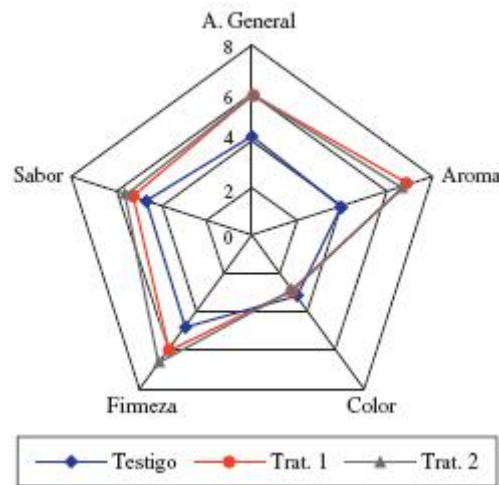
- **Análisis de tiempo-intensidad:** Los jueces deben evaluar la intensidad de algún atributo concreto en determinados momentos a lo largo periodo de tiempo establecido.

- **Perfil de libre elección:** Se realiza con panelistas no entrenados o consumidores, cada uno de ellos elige un grupo de atributos y los evalúa en distintas escalas.

- **Análisis cuantitativo descriptivo:** La prueba de análisis cuantitativo descriptivo (QDA) (Stone y col., 2004) está basada en las pruebas de análisis del flavor y de la textura ya descritas anteriormente. Esta técnica permite evaluar cuantitativamente todas las características sensoriales en distintos productos y requiere un número no muy elevado (entre ocho y doce) de panelistas entrenados.

En los análisis descriptivos mediante la utilización de escalas comunes para todos los jueces es frecuente la elaboración de gráficos (especialmente “telas de araña”) para presentar de forma sencilla la descripción sensorial del

producto. Estas representaciones permiten además comparar de forma visual las diferencias sensoriales entre productos (Figura 11).



**Figura 11.** Ejemplo de gráfico "tela de araña"

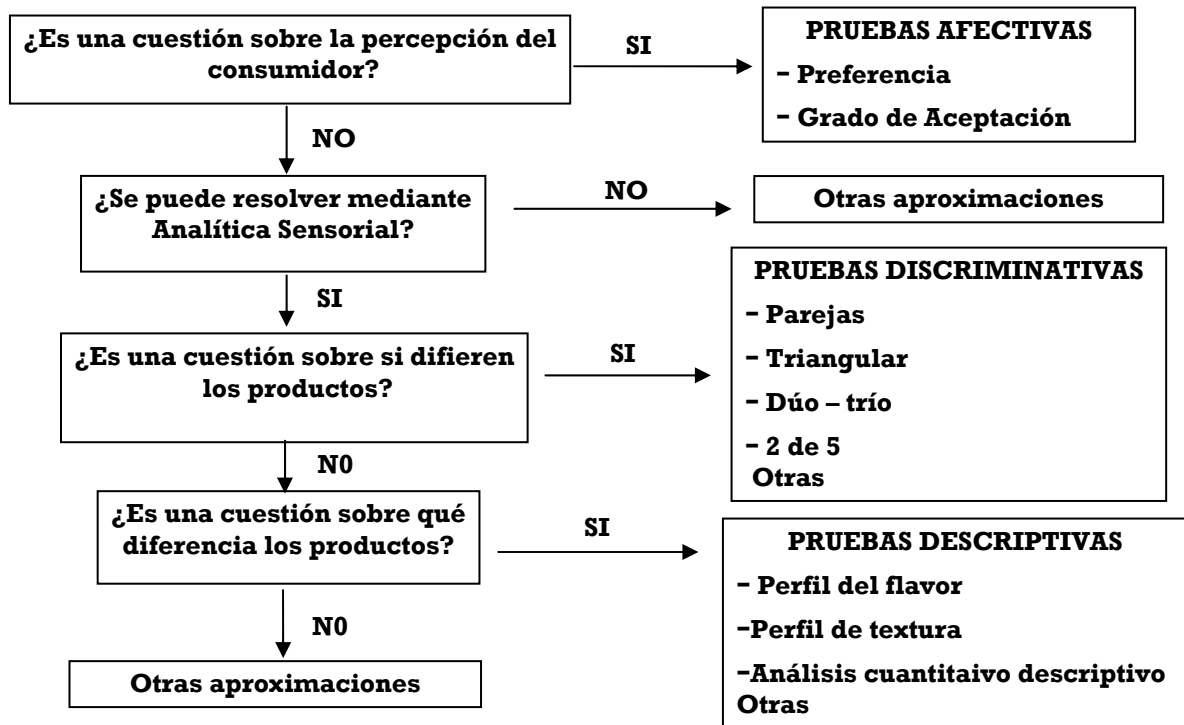
#### - Pruebas afectivas

En estas pruebas el juez expresa su reacción subjetiva ante un producto, indicando si le gusta o no, si lo acepta o lo rechaza, o si lo prefiere a otro (Larmond, 1985).

Para las pruebas afectivas es necesario contar con un mínimo de 30 jueces no entrenados que deben ser consumidores habituales o potenciales del alimento que se quiere evaluar. Dentro de estas pruebas encontramos:

- Pruebas de preferencia: En estas pruebas se desea conocer si los jueces prefieren una cierta muestra sobre otra.

- Pruebas de aceptación o grado de satisfacción: Son las pruebas para recoger las respuestas de los jueces acerca de cuanto les gusta o disgusta un alimento. Para llevar a cabo estas pruebas se utilizan escalas hedónicas. En este tipo de pruebas también se incluyen aquellas destinadas a conocer el deseo de la persona de adquirir el producto.



**Figura 12.** Árbol de decisión para la elección de las pruebas sensoriales

### 2.7.2. Escalas de medida

Para obtener resultados adecuados en los procesos de evaluación sensorial, las escalas que se deben utilizar tienen que ser útiles a los jueces, fáciles de utilizar, válidas y sensibles a las diferencias (Majou, 2001). Se pueden distinguir fundamentalmente cuatro tipos de escalas (Stevens, 1951):

- Nominales: Los jueces clasifican cada muestra en una de las categorías que conforman la escala ordenada.

- Ordinales: Escala en la que los puntos de referencia forman una progresión continua o una progresión de conceptos pre-establecidos.

- De intervalo: Escala en la que se indican diferencias o distancias entre magnitudes. La ventaja de esta escala es que al poseer puntos intermedios de

anclaje, no queda al completo criterio de los jueces, pero hay que definir cada uno de estos puntos para establecer un marco de referencia.

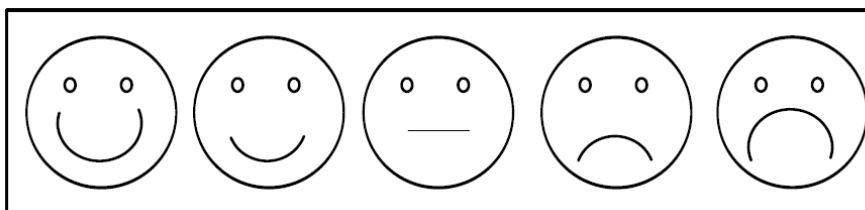
- Proporcionales: Escala en la que los números se escogen de manera que a cocientes iguales correspondan cocientes de percepción sensorial iguales.

También pueden utilizarse otro tipo de escalas como son las escalas faciales, las escalas hedónicas y las escalas de acción.

- Escalas hedónicas: Es una escala afectiva, generalmente se utilizan etiquetas con expresiones que van desde *me gusta muchísimo*, hasta *me disgusta muchísimo*, pasando por *ni me gusta ni me disgusta*.

- Escalas faciales: Las escalas faciales son de gran utilidad en aquellos casos donde el valor cultural de los jueces es muy bajo o variable. Son muy utilizadas en pruebas con niños (Figura 13).

-Escalas de acción: Los valores de la escala están representados por términos que indican la acción que pudiera motivar el producto en el consumidor, por ejemplo: *lo comería siempre*, *no lo comería nunca* y otras semejantes.



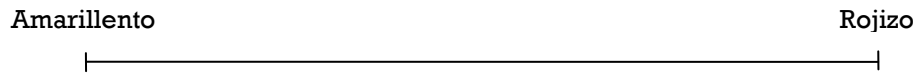
**Figura 13.** Escala facial

Finalmente, si tenemos en cuenta la estructura de la escala, éstas pueden clasificarse en estructuradas y no estructuradas.

- Escalas no estructuradas: Este tipo de escala está únicamente anclada por los dos extremos finales, los cuales están definidos por referencias, así, es

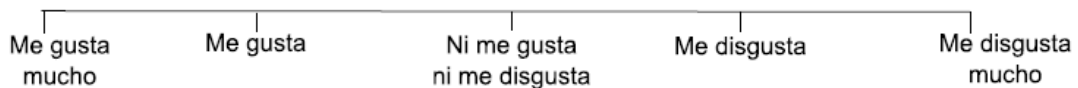
el propio juez quien construye su propia escala (Anzaldúa Morales, 1994) (Figura 15).

**Tono:**



**Figura 14.** Escala no estructurada

- Escalas estructuradas: En este tipo de escala el significado de los distintos puntos de la escala está indicado sobre el cuestionario de un modo lingüístico o numérico (Figura 14).



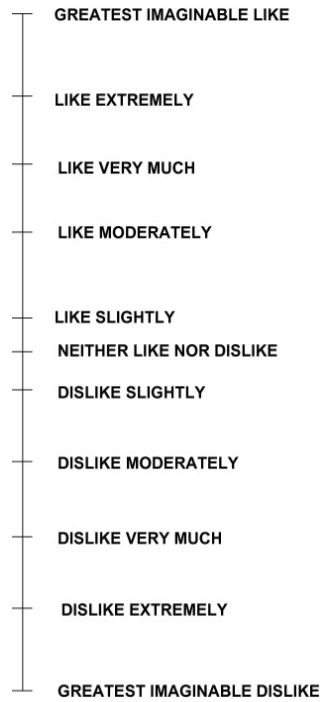
**Figura 15.** Escala estructurada hedónica

➤ *ESCALA LAM (Escala anclada afectiva de magnitudes)*

La escala LAM fue desarrollada específicamente para evaluar el agrado o desagrado que producen estímulos relacionados con la alimentación. Es un instrumento simple y fácil para ensayos tanto de preferencia como de aceptación, y puede usarse también para evaluar la aceptabilidad o preferencia de atributos específicos como por ejemplo la apariencia (Schutz y Cardello, 2001).

El hecho de que esta escala sea bidireccional, debido principalmente a la naturaleza fundamental de lo que se evalúa (aceptación frente a rechazo), es una diferenciación importante respecto a otras escalas desarrolladas anteriormente. Para los consumidores su uso es igual de sencillo que la escala hedónica de 9 puntos y significativamente menos difícil que las escalas de estimación de magnitudes. Otra ventaja de la escala LAM es su mayor

capacidad para diferenciar entre alimentos muy valorados. Además de proporcionar una mejor discriminación que la escala hedónica de 9 puntos (especialmente en los extremos), los estudios actuales muestran que la escala LAM tiene una alta fiabilidad. Por último, la naturaleza gráfica continua de la escala hace que sea susceptible para su codificación informática, facilitando el tratamiento de datos.



**Figura 16.** Escala LAM

## 2.8. El análisis sensorial en zumo de naranja

El OJ es uno de los zumos de frutas más consumido debido en gran parte a la combinación de su deseable sabor, su atractivo color, y los beneficios que aporta para la salud (Rouseff y col., 2009). Estos zumos contienen una compleja mezcla de compuestos que aportan un sabor y flavor característicos que es demandado por los consumidores como un atributo de calidad (Rega y col., 2004).

La gran competitividad existente y las nuevas perspectivas de mercado actual, estimulan a las industrias a desarrollar productos con mejor calidad

sensorial y mayor vida útil, sin olvidar la continua necesidad de reducir los costes de producción. Para superar estos desafíos, la industria cuenta con el conocimiento de las características sensoriales de los productos, así como de las preferencias del consumidor (Cardello y Cardello, 2013).

La calidad sensorial del zumo de naranja es determinante en la aceptación de los consumidores (Petersen y col., 1998). Debido a que los consumidores exigen cada vez más la existencia de zumos comerciales muy similares a los recién hechos, el conocimiento de las propiedades sensoriales de zumos de naranja frescos es importante para la industria de procesamiento de zumo. Así, se han realizado numerosos estudios sobre los aspectos químicos del OJ, centrados en los efectos de las materias primas, la elaboración, el empaquetado, y las condiciones de almacenamiento (Petersen y col., 1998; Shaw y col., 1999; Cerdán-Calero y col., 2013), y algunos trabajos, consideran además las cualidades sensoriales del OJ junto con los aspectos químicos (Lin y col. 1993; Rega y col., 2004; Ruiz Pérez-Cacho y col., 2007).

### **2.8.1. Técnicas de análisis sensorial aplicadas al zumo de naranja**

Diversas pruebas de preferencia, aceptación y discriminativas, se han utilizado para evaluar la calidad sensorial del zumo de naranja (Bettini y col., 1998; Mabesa y Lim, 1991; Pao, 1996; Pieper y col., 1992). Además, algunos investigadores han utilizado métodos descriptivos de análisis, incluyendo análisis cuantitativo descriptivo (QDA) y otros procedimientos que evalúan el perfil sensorial, para describir las características sensoriales de bebidas cítricas (Spoto y col., 1997; Petersen y col., 1998; Stampanoni, 1993).

#### **- Pruebas discriminativas**

Siegmund y col. (2004) compararon zumos y néctares conservados en envases distintos (de cartón laminado y vidrio) para determinar como influían estos envases en las propiedades sensoriales de las bebidas. Así, demostraron

que los envases de cartón provocaban cambios mucho más rápidos en las propiedades sensoriales originales de los zumos que los envases de vidrios.

Otras aplicaciones de este tipo de pruebas en el OJ las encontramos en estudios sobre el efecto de distintos tratamientos de conservación en las propiedades sensoriales del zumo. Nikdel y col. (1993) compararon los tratamientos con microondas frente a la pasteurización mediante pruebas triangulares, concluyendo que estos tratamientos no producen diferente percepción del flavor de los OJs. Por otra parte, las diferencias entre zumos frescos, pasteurizados y tratados con calentamiento óhmico también fueron investigadas por Leizeron y Simoni (2005) mediante pruebas triangulares, demostrando que los panelistas podían diferenciar entre zumos pasteurizados y frescos, pero no entre los zumos frescos y aquellos tratados con calentamiento óhmico. Pieper y col. (1992) comprobaron que un panel experimentado no era capaz de distinguir entre zumos de naranja envasados en vidrio y zumos envasado en paquetes de cartón. Más recientemente, Cerdán-Calero y col. (2013) realizaron diversas pruebas triangulares, para ver el efecto de la reducción de pulpa y la homogenización por alta presión, en la calidad sensorial del zumo.

#### - Tests descriptivos

En la bibliografía actual, encontramos relativamente pocos trabajos que incluyan evaluaciones descriptivas del OJ (Spoto y col., 1997; Petersen y col., 1998; Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Luckow y Delahunty, 2004; Ruiz Perez-Cacho y col., 2008;).

Conocer el perfil sensorial del OJ es primordial para que las industrias consigan un zumo de calidad. Así mismo, es necesario conocer qué cambios pueden producirse en el zumo como efecto del procesado industrial que sufre, el envase o el tiempo de almacenamiento. Para ello, las distintas características del zumo (atributos) deben ser evaluadas por catadores. Existe un amplio número de descriptores que han sido utilizados en la evaluación del OJ (Tablas 3, 4 y 5). Cabe destacar, que, aunque las fases gustativa y olfativa están bastante



estudiadas en los alimentos desde el punto de vista sensorial, en los trabajos descriptivos, no suelen incluirse evaluaciones de la apariencia.

En la tabla 3 se recogen los principales descriptores asignados a la evaluación de la fase gustativa de los zumos. Los descriptores amargo, ácido y dulce, suelen ser incluidos en todas las evaluaciones descriptivas gustativas de los zumos. En los zumos naturales son frecuentes descriptores como “naranja fresca”, mientras que en zumos procesados solemos encontrar términos como “cocido”, “artificial”, o “medicinal”.

**Tabla 3.** Descriptores utilizados en la evaluación de la fase gustativa del zumo de naranja

<b>Descriptor</b>	<b>Referencias</b>
Amargo	Spoto y col., 1997; Petersen y col., 1998; Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Luckow y Delahunty, 2004; Baxter y col., 2005; Frata y col., 2006;; Luckow y col., 2006; Pérez Aparicio y col., 2007; Perez-Cacho y col., 2008; Plotto y col., 2010.
Ácido	
Dulce	
Naranja fresca	Spoto y col., 1997; Petersen y col., 1998; Luckow y Delahunty, 2004; Baxter y col., 2005; Luckow y col., 2006.
Cocido	Spoto y col., 1997; Pérez Aparicio y col., 2007.
Artificial	Luckow y Delahunty, 2004; Pérez Aparicio y col., 2007
Oxidado	Petersen y col., 1998
Piel	Luckow y col., 2006
Cítrico (no naranja)	Pérez Aparicio y col., 2007
Umami	Plotto y col., 2010
Medicinal	Spoto y col., 1997
Aceitoso	
Lácteo	
Maduro	
Metálico	
Terroso	
Astringente	

Los descriptores utilizados en la fase olfativa están incluidos en la tabla 4, donde encontramos una gran variedad de términos tanto con connotaciones positivas, como “fresco” o “floral”, como con connotaciones negativas, como “oxidado” o “fermentado”.

**Tabla 4.** Descriptores utilizados en la evaluación de la fase olfativa del zumo de naranja

<b>Descriptor</b>	<b>Referencias</b>
Naranja fresca	Petersen y col., 1998; Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Luckow y Delahunty, 2004; Baxter y col., 2005; Luckow y col., 2006; Plotto y col., 2010.
Fresco	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Plotto y col., 2010
Cocido	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Frata y col., 2006; Luckow y col., 2006; Perez-Cacho y col., 2008.
Piel	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Perez-Cacho y col., 2008; Plotto y col., 2010.
Maduro	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Luckow y Delahunty, 2004; Baxter y col., 2005.
Frutado (no cítrico)	Lin y col., 1993; Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Perez-Cacho y col., 2008; Plotto y col., 2010.
Verde	Lin y col., 1993; Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Perez-Cacho y col., 2008.
Rancio	Lin y col., 1993; Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Luckow y col., 2006; Perez-Cacho y col., 2008; Plotto y col., 2010.
Medicinal	Luckow y Delahunty, 2004; Luckow y col., 2006; Perez-Cacho y col., 2008.
Cítrico (no naranja)	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Perez-Cacho y col., 2008.
Floral	Lin y col., 1993; Lotong y col., 2002; Perez-Cacho y col., 2008.
Metálico	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Luckow y Delahunty, 2004.
Aromas ácidos	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Plotto y col., 2010.
Aromas dulces	Lotong y col., 2002; Baxter y col., 2005; Luckow y Delahunty, 2004.
Graso	Lin y col., 1993; Perez-Cacho y col., 2008; Plotto y col., 2010.
Pomelo	Luckow y Delahunty, 2004; Perez-Cacho y col., 2008.
Tropical	Luckow y Delahunty, 2004; Luckow y col., 2006.
Artificial	Luckow y Delahunty, 2004; Baxter y col., 2005.
Alcohólico	Lin y col., 1993.
Fermentado	Baxter y col., 2005.
Aceite de naranja	Lotong y col., 2002.
Oxidado	Petersen y col., 1998
Pintura	Plotto y col., 2010
Caramelo	Lotong y col., 2003; Lotong y col., 2002.
Plástico	
Aromas amargos	
Cartón	
Jarabe	
Lácteo	Luckow y Delahunty, 2004
Picante	
Sucio	
Terroso	
Fruta de la pasión	Perez-Cacho y col., 2008
Judías	

Además de los descriptores gustativos y olfativos, también se encuentran otros destinados a evaluar distintos aspectos dentro del zumo de naranja como el regusto, la sensación en boca o la textura (Tabla 5).

**Tabla 5.** Otros descriptores utilizados en la evaluación del zumo de naranja

<b>Descriptor</b>	<b>Referencias</b>
<b>Regusto</b>	
Dulce	Baxter y col., 2005; Luckow y Delahunty, 2004; Luckow y col., 2006; Pérez Aparicio y col., 2007
Amargo	Aparicio y col., 2007
Ácido	Baxter y col., 2005; Luckow y Delahunty, 2004; Pérez Aparicio y col., 2007
Terroso	Luckow y Delahunty, 2004
Cítrico	Ruiz Pérez Aparicio y col., 2007
Especiado	
Quemazón	
<b>Sensación en boca</b>	
Pungente	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Ruiz Perez-Cacho y col., 2008; Plotto y col., 2010
Quemazón	Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Pérez Aparicio y col., 2007; Perez-Cacho y col., 2008
Astringente	Frata y col., 2006; Lotong y col., 2002; Lotong y col., 2003; Plotto y col., 2010; Ruiz Perez-Cacho y Rouseff, 2008
Pulpa	Ruiz Perez-Cacho y col., 2008
Metálico	Plotto y col., 2010
Hormiguelo	
<b>Textura</b>	
Resinoso	Pérez Aparicio y col., 2007
Suave	
Denso	
Acuoso	

En el zumo de naranja, se han aplicado los distintos tipos de análisis descriptivo. Por ejemplo, Pérez Aparicio y col. (2007) demostraron la utilidad del método de libre elección evaluando zumos de naranja frescos con distinto tiempo de almacenamiento, zumos pasteurizados, zumos concentrados, y néctares de diferentes marcas comerciales. En este método, los participantes (que deben ser consumidores habituales del producto) deben generar términos descriptores del producto libremente y luego evaluarlos en distintas escalas. Este método requiere un sofisticado tratamiento estadístico de los datos.

Otros estudios han utilizado el análisis cuantitativo descriptivo, así, Lin y col. (1993) cuantificaron distintos descriptores referidos al perfil aromático del OJ demostrando que un panel adecuadamente entrenado podía evaluar la calidad de los aromas de naranja. Además, compararon los resultados de la evaluación sensorial con aquellos obtenidos del análisis instrumental de

compuestos volátiles. La comparación de datos sensoriales e instrumentales es una práctica muy útil que, además, ofrece una valiosa información adicional a las industrias alimentarias. Petersen y col. (1998) también compararon las evaluaciones descriptivas obtenidas por un panel entrenado con las medidas instrumentales de compuestos volátiles, con objeto de ver el efecto de las distintas formas de almacenamiento de los zumos.

El perfil sensorial de los nuevos productos es desarrollado gracias a los análisis descriptivos. Un ejemplo de ello lo encontramos en un trabajo de Luckow y Delahunty (2004), en el que se analizan descriptivamente diversos OJs funcionales y convencionales. Así, comprobaron que los zumos funcionales eran descritos por el panel como “lácteos” o “medicinales”, diferenciándolos significativamente de los zumos convencionales.

La objetividad del análisis descriptivo fue comprobada por Lotong y col. (2002) en un estudio comparativo en el que dos paneles independientes, con entrenamientos distintos y diferentes métodos de evaluación, describieron distintos OJs de forma similar, dando, cada uno de ellos, una información objetiva y comparable.

#### - Estudios de consumidores

Las técnicas para el estudio de la preferencia o la aceptabilidad de los consumidores se proponen, entre otros motivos, para apoyar el desarrollo de nuevos productos. Este es el caso, por ejemplo, del estudio realizado por Luckow y Delahunty (2004) en el que, además de analizar el perfil sensorial de nuevos zumos de naranja funcionales, se realizó un estudio de preferencia de consumidores. Más recientemente Endrizzi y col. (2009), evaluaron 25 zumos de diferentes frutas (entre ellos de naranja) mezclados con distintas frutas rojas, con el objetivo de conocer las preferencias de los consumidores.

Los tests de consumidores pueden estar referidos a los productos de manera global, o más concretamente a alguno de sus atributos. Así, encontramos por ejemplo, trabajos en los que se estudia el efecto de la apariencia del envase en el flavor del zumo (Mizutani y col., 2010), u otros

donde se consideran varios atributos de los zumos de naranja simultáneamente para evaluar su aceptabilidad (Frata y col., 2006).

En cuanto al tratamiento de los datos obtenidos en este tipo de pruebas, los continuos avances que se producen, tanto en el análisis sensorial como en los métodos estadísticos, permiten obtener resultados más precisos y más aplicables para la industria. Por ejemplo, actualmente se utilizan a menudo los mapas de preferencias como una herramienta para el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en estudios de consumidores. Esta técnica permite elucidar las razones por las cuales los productos se comportan de una determinada manera en el mercado (MacFie y Thomson, 1994). Diversos investigadores han empleado esta técnica para estudiar la preferencia de los consumidores hacia el zumo de naranja (Gatti, 2003; Pouplard y col., 1997; Valim, 2001).

### 3. EL COLOR

#### 3.1. El color y la colorimetría

El color es una *respuesta mental* al estímulo que una *radiación luminosa* visible (380-770 nm) produce en la *retina*. Se considera como un concepto psicofísico, relacionado al mismo tiempo con la psicología del observador, la fisiología de la visión y con la energía radiante espectral de una fuente luminosa (Wyszecki y Stiles, 1982).

La luz que incide en la retina (estímulo cromático) desencadena una serie de procesos químicos y eléctricos que se traducen en impulsos nerviosos transmitidos a través del nervio óptico hacia el cerebro, donde se interpreta la señal recibida y, finalmente, se produce la sensación de color. Así, el color es más una propiedad de la luz que una característica intrínseca de los objetos que reflejan o transmiten la radiación luminosa, ya que basta con cambiar la fuente para modificar el estímulo producido. Además, debido a que el proceso por el cual se genera la sensación de color depende del sistema ocular y de la interpretación realizada por el cerebro en cada observador, la percepción visual del color es una sensación subjetiva.

En la retina de la especie humana existen tres tipos diferentes de células sensibles al color, los conos. Cada uno de estos conos es sensible de forma selectiva a la luz de una región del espectro electromagnético visible: roja ( $\lambda \sim 650$  nm), verde ( $\lambda \sim 530$  nm), y azul ( $\lambda \sim 430$  nm). A partir de la información individual que los tres tipos de conos envían simultáneamente al cerebro cuando son estimulados por un estímulo cromático, éste es capaz de interpretar todos los colores, lo cual confiere a la percepción del color su carácter tridimensional. Esta consideración tridimensional es el fundamento de la Teoría Tricromática del color, cuyo desarrollo se recoge en el Anexo A.

La Colorimetría Triestímulo es la rama de la ciencia que estudia la especificación numérica del color de un estímulo visual. Las leyes que rigen la generalización tricromática se pueden expresar de forma geométrica, considerando un espacio pseudovectorial de tres dimensiones denominado

Espacio Triestímulo, en el que cada estímulo de color (Q) viene representado por un vector, expresión de las cantidades proporcionales de cada uno de los estímulos primarios rojo (R), verde (G) y azul (B). Así, un estímulo dado Q podría expresarse como la mezcla aditiva de determinadas cantidades de los tres estímulos primarios fijados, RGB:

$$Q = R_Q \cdot R + G_Q \cdot G + B_Q \cdot B$$

Los factores escalares  $R_Q$ ,  $G_Q$  y  $B_Q$ , asignados a los estímulos primarios, se denominan valores triestímulo de Q.

La dificultad en el cálculo de los valores triestímulo R, G, B según las ecuaciones colorimétricas básicas desarrolladas inicialmente (Teoría Tricromática del Color), indujo a la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) a la adopción de otro sistema tricromático basado en unas "Especificaciones sobre observadores estándares en colorimetría" y unas "Recomendaciones sobre cuestiones relacionadas" (CIE, 1932).

Así, se definen los nuevos valores triestímulo X, Y, Z. Estos son estímulos imaginarios y no igualables con los del espectro visible, pero que aseguran que las coordenadas de cromaticidad x, y, z, en ningún caso adopten valores negativos, cuyo significado físico podría resultar confuso en su aplicación a la medida del color de materiales coloreados. Asimismo, se definen las "funciones de igualación de color" como las propiedades del Observador Estándar CIE 1931-(x,y) (u Observador de 2°), en el intervalo de longitudes de onda de la zona visible del espectro.

Mediante la integración del espectro, y de acuerdo con las condiciones de referencia elegidas (iluminante y observador), se obtienen los componentes del vector o valores triestímulo (X, Y, Z), a partir de los cuales la Comisión Internacional de la Iluminación define diferentes sistemas colorimétricos (CIE, 1986): espacios de color y diagramas cromáticos asociados. En ellos es posible la caracterización de los puntos de color y su interpretación mediante el cálculo de parámetros psicofísicos relacionados (tono, claridad, y croma o saturación). Entre los sistemas tricromáticos más utilizados se encuentran CIE 1964-(x,y) (no

uniforme, conocido como CIE XYZ) y los espacios considerados uniformes CIE 1976-(L\*u\*v\*) (CIELUV) y CIE 1976-(L\*a\*b\*) (CIELAB).

Por tanto, a partir del desarrollo de la Teoría Tricromática del Color, cualquier estímulo cromático que llega a la retina está compuesto por tres sensaciones o atributos bien diferenciados (el tono, la claridad y la saturación) que definen, a su vez, cualquier color.

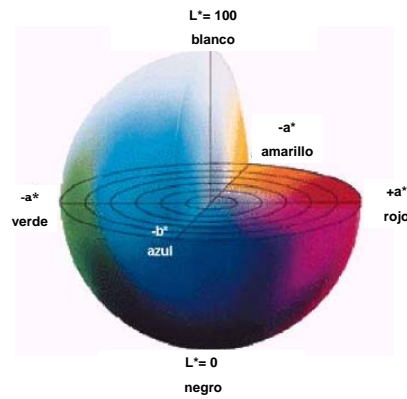
### 3.1.1. Espacio de color CIELAB

Desde el año 1976, la CIE recomienda internacionalmente el sistema de especificación del color CIE 1976-(L\*a\*b\*) (CIELAB), como el más apropiado para la especificación del color en la industria alimentaria, debido a su uniformidad, precisión y exactitud.

Las magnitudes colorimétricas definidas en el espacio CIELAB se derivan matemáticamente de los valores triestímulo, y pueden considerarse una respuesta de los observadores patrón a un estímulo luminoso. Tratando de imitar a los observadores reales, estas respuestas se hacen depender del tipo de estímulo y del blanco de referencia.

El espacio de color CIELAB es un sistema coordenado cartesiano definido por tres *coordenadas rectangulares* colorimétricas L\*, a\*, b\* como magnitudes adimensionales. La coordenada L\* se define como *claridad* y puede tomar valores entre 0 (que corresponde al negro), y 100 (blanco). Las coordenadas colorimétricas a\* y b\* forman un plano perpendicular a la claridad. La coordenada a\* define la desviación del punto acromático, correspondiente a la claridad, hacia el rojo si  $a^* > 0$ , y hacia el verde si  $a^* < 0$ . Análogamente la coordenada b\* define la desviación hacia el amarillo si  $b^* > 0$ , y hacia el azul si  $b^* < 0$  (Figura 17).





**Figura 17.** Espacio de color CIELAB

A partir de las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  se definen dos magnitudes colorimétricas nuevas, *croma* y *tono*, mediante las siguientes expresiones:

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}, \quad h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$$

El *croma*,  $C_{ab}^*$ , es el atributo de la percepción visual conforme al que un área parece saturada respecto a un determinado color o tonalidad. Tiene valor 0 para estímulos acromáticos y, por lo general, no pasa de 150 aunque puede superar ese valor para determinados estímulos monocromáticos.

El *tono*,  $h_{ab}$ , es el color básico de un objeto (azul, amarillo, etc.) definido por su posición angular en un espacio de color cilíndrico. Los valores, por tanto, varían entre  $0^\circ$  y  $360^\circ$ , y para estímulos acromáticos ( $a^*=0$ ,  $b^*=0$ ) es una magnitud no definida.

Respecto a otros sistemas de color (como por ejemplo el Sistema Munsell), el espacio de color CIELAB presenta dos ventajas importantes: 1) el cálculo de las coordenadas es mucho más simple, y 2) las unidades de las escalas entre las magnitudes CIELAB son prácticamente iguales, por lo que se considera un espacio de color uniforme.

A partir de los parámetros que permiten la definición de cualquier color ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$ ,  $h_{ab}$ ), el estudio y desarrollo de la *colorimetría diferencial* ha experimentado un gran interés en la industria, especialmente en las últimas décadas. Esta diferencia entre dos estímulos dentro del espacio de color CIELAB se mide como la distancia euclídea existente entre dos puntos en el

espacio tridimensional, se denomina *diferencia de color* ( $\Delta E^*_{ab}$ ) y se calcula según la siguiente expresión:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Este parámetro, junto con los *índices colorimétricos de claridad* ( $\Delta L^*$ ), *croma* ( $\Delta C^*_{ab}$ ), y *tono* ( $\Delta h_{ab}$ ) han demostrado ser muy útiles en el seguimiento de los cambios de color. Por ello, desde el punto de vista industrial, las fórmulas basadas en CIELAB son las de mayor uso o interés en la actualidad. El amplio uso del sistema y de la fórmula de color CIELAB en las aplicaciones industriales ha supuesto un punto de partida de una nueva generación de ecuaciones de diferencia de color aplicadas en la industria como las recientemente desarrolladas CIE94 (CIE, 1995) y CIEDE2000 (CIE, 2001), elaboradas respectivamente por los Comités Técnicos de la CIE 1-29 y 1-47.

Hoy por hoy, el cálculo de las diferencias de color tiene muchas aplicaciones en la Colorimetría, como por ejemplo en la reproducibilidad del color en la fabricación de productos y sistemas de comunicación, o el estudio de la decoloración de los alimentos, las obras de arte, etc. (Attridge y Pointer, 2000; Gay y Hirschler, 2002; Liu y col., 2011; Luo y col., 2001b; Luo, 2002; Melgosa y col., 2009; Melgosa y col., 1997; Rodríguez-Pulido y col., 2012; Zheng y col., 2012) o incluso, más recientemente, se ha aplicado en la determinación de la tolerancia del color en el OJ, por parte del consumidor (Wei y col., 2012).

Por tanto, dado que el color es un fenómeno psicofísico, su medición e interpretación deben basarse en la percepción humana. En ese sentido, el espacio de color CIELAB, a partir de las coordenadas rectangulares ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) y cilíndricas ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h_{ab}$ ), y con su correspondiente fórmula de diferencia de color asociada ( $\Delta E^*_{ab}$ ), proporciona una útil representación tridimensional del color. En primer lugar, las coordenadas cilíndricas representan los parámetros de color más relacionadas con los tres atributos clásicos de color percibidos visualmente (luminosidad, saturación y tono, respectivamente). En segundo lugar, el parámetro diferencia de color ( $\Delta E^*_{ab}$ ), permite medir la diferencia cromática entre dos estímulos. Además, al ser este espacio “considerado

uniforme” por la CIE, las diferencias calculadas se corresponden con grados de percepción visual similares.

### **3.2. El color del zumo de naranja**

El color de los alimentos influye enormemente en las preferencias del consumidor (Calvo y col., 2001; Hutchings, 2011). Los consumidores a menudo juzgan la calidad de los alimentos basándose en su color: en el lugar de compra es raro que el consumidor pueda probar el alimento antes de adquirirlo, sin embargo, sí puede mirarlo. Entonces, deciden si finalmente comprar o no un producto basándose en su apariencia, incluyendo el color (Pérez-López y col., 2006).

El color del zumo de naranja va desde los amarillos pálidos al principio de la temporada hasta los rojos-anaranjados al final de la misma. Su color se debe, mayoritariamente, a su contenido en pigmentos carotenoides, que son los pigmentos naturales mayoritarios en su composición. Su distribución en el reino vegetal es muy amplia, y también están presentes en algunos animales, algas, bacterias, mohos y levaduras (Britton, 1992; Rodriguez-Amaya y col., 1997). Hasta ahora, se han caracterizado más de 700 carotenoides que dan los colores amarillos, naranjas o rojos a muchos alimentos: tomates, zanahorias, pimientos rojos, yema de huevo, etc.

Algunas variedades de naranja (como Sanguinelli) deben su color al contenido en carotenoides pero también de antocianos, que son pigmentos rojos-azulados, solubles en agua, y principales responsables del color rojizo de los zumos obtenidos a partir de ellas (Arena y col., 2000; Kirca y Cemeroglu, 2003; Lee, 2002). Sin embargo, el color del zumo procedente de la naranja Cara Cara es una excepción, ya que su color rojizo se debe al licopeno, carotenoide mayoritario en los tomates rojos, pero que no suele estar presente en los zumos de naranja (Lee, 2001).

Tradicionalmente se ha considerado que los carotenoides mayoritarios en zumos de naranja son violaxantina, anteraxantina, luteína,  $\alpha$ -criptoxantina,  $\beta$ -

criptoxantina,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno (Meléndez-Martínez y col., 2005e), sin embargo, investigaciones más recientes han puesto de manifiesto que algunos de ellos no están presentes en él, sino que fueron erróneamente identificados (Meléndez-Martínez y col., 2005d; 2008).

Entre los zumos de las distintas variedades de naranja, los obtenidos a partir de la variedad Valencia son los de mayor contenido y más complejo perfil de carotenoides, hasta el punto que se distinguen fácilmente de otros por su intenso color anaranjado (Francis y Clydesdale, 1975; Meléndez-Martínez y col., 2005a). Aunque cada variedad de naranja tiene su perfil de carotenoides característico, éste cambia en función de una serie de factores como la madurez y el clima (Casas y Mallent, 1988). Así, se concluyó que los niveles de carotenoides de distintos zumos de naranja Valencia tomados en distintos lugares (España, Belice, Cuba, Israel y Florida) fueron claramente distintos, diferenciándose por tanto en su color (Mouly y col., 1999a; 1999b).

Por otro lado, el procesado tecnológico al que se someten los zumos en la industria para prolongar su estabilidad provoca cambios en el color (Lee y Coates, 2003), por lo que se ha propuesto su medida como un indicador de la degradación durante el procesado térmico de algunas frutas (Ávila y Silva, 1999).

Los estudios sobre la influencia que los procesos tecnológicos tienen sobre compuestos bioactivos naturales de los zumos se han incrementado en los últimos años, así, investigaciones recientes incluyen el efecto del método de obtención del zumo (doméstico o industrial), el efecto del procesado (concentración o congelación del concentrado), o de la conservación (pasteurización, alta presión, pulsos eléctricos o ultracongelación) (Stinco y col., 2012). Todos estos procesos influyen en mayor o menor medida en el perfil de los carotenoides del zumo de naranja, y por tanto, en su color. Algunos autores han puesto de manifiesto que la pasteurización (90°C, 30 s) conduce a una variación significativa en el contenido total de carotenoides y a cambios cualitativos en el perfil (Torres Gama y de Sylos, 2007). Así los niveles de los carotenoides 5,6-epóxido *cis*-violaxantina y anteraxantina, pigmentos mayoritarios en el zumo fresco, descienden como consecuencia del tratamiento

térmico, siendo los carotenoides más importantes en el zumo procesado, en términos cuantitativos, la luteína y la zeaxantina (Lee y Coates, 2003). La conservación por alta presión, sin embargo, produce un incremento en el contenido de carotenoides pro-vitamina A (de Ancos y col., 2002). Por otro lado, los zumos ultracongelados procedentes de naranjas Valencia han sido ampliamente estudiados destacando su intenso color naranja, y concluyendo que sus carotenoides mayoritarios son la violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, mutatoxantina y  $\beta$ -criptoxantina (Meléndez-Martínez y col., 2005a).

En ciertos países, como Estados Unidos, el color del zumo de naranja es uno de los parámetros que se evalúan para clasificar comercialmente el producto en base a su calidad. El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) reconoce que el color es tan importante en la calidad de los zumos cítricos comerciales como el flavor. La importancia del color en el control de calidad de los productos derivados de los cítricos es tal que se emplea comúnmente para juzgar variedades así como para evaluar el estado de madurez de los frutos. El USDA asignó 40 puntos sobre 100 a la escala de color para la clasificación comercial del zumo de naranja. Así, un zumo de nivel A debe tener una puntuación de color entre 36 y 40 puntos, mientras un zumo de nivel B tendrá una puntuación de entre 32 y 35 (Lee, 2001; Stewart, 1977). Sin embargo, para la clasificación de los zumos de naranja, la USDA utiliza una serie de seis tubos de plástico estandarizados, sin hacer referencia a las coordenadas CIELAB, que es el espacio de color más usado (Pérez-López y col., 2006).

En la Unión Europea (EU) hasta el momento no se ha abordado este problema y la legislación sobre el color del zumo de naranja no es específica. Sólo se establece que todos los zumos de frutas deben tener un color, aroma, y sabor típicos de las frutas de las que proceden (Consejo de la Unión Europea, 2002).

### **3.2.1. Aplicación de la colorimetría triestímulo al análisis del color del zumo de naranja.**

Un estudio riguroso de las características cromáticas del zumo pasa por la determinación objetiva del color por medio de la definición tricromática de esta propiedad física, es decir, considerando los estímulos coloreados como elementos diferentes dentro de un espacio pseudovectorial de tres dimensiones.

La Colorimetría Triestímulo ha sido ampliamente utilizada en el estudio del zumo de naranja. Así, diversos autores la han utilizado en el control de calidad del zumo para estimar el contenido de carotenoides y provitamina A (Meléndez-Martínez y col., 2003; 2007) o en el control de la concentración de zumo con el fin de detectar rápidamente adulteraciones en la industria (MacDougall, 2002; Muir, 2011). Las medidas objetivas de color a través de la Colorimetría Triestímulo presentan importantes ventajas en comparación con otros métodos analíticos ya que se trata de un técnica no destructiva y muy rápida (Meléndez-Martínez y col., 2005b)

Uno de los problemas clave en la evaluación visual del color es el establecimiento del umbral de diferenciación entre dos productos con colores distintos. Algunos trabajos previos han estudiado los umbrales de diferenciación utilizando diferentes patrones de color (Berns y col., 1991; Martínez y col., 2001) y además, Martínez y col. (2001) publicaron un estudio para establecer el umbral para la discriminación visual entre vinos. Sin embargo, no existe información previa sobre estudios del umbral de diferenciación del color de los zumos de naranja. Por ello, en esta Memoria se estudian los umbrales de diferenciación de color, esta vez específicos para el zumo de naranja.

### **3.2.2. Medida del color**

La medida de color de los alimentos puede realizarse mediante evaluación visual e instrumental.

- **Análisis visual**

Para utilizar el análisis visual del color como un criterio objetivo de calidad es necesario estandarizar las condiciones de la medida. Se deben tener en cuenta determinadas condiciones como por ejemplo, la iluminación, el material de cata, el entrenamiento de jueces, etc. El uso de cabinas de evaluación visual con una fuente de luz normalizada (emulador D65) es imprescindible para establecer la correlación con la medida instrumental. Además, en el caso del zumo, cada recipiente debe contener el mismo volumen de muestra para evitar que distintos volúmenes afecten a la percepción del color. También es importante usar recipientes que permitan agitar las muestras para impedir la sedimentación de la pulpa (Meléndez-Martínez y col., 2005c).



**Figura 18.** Cabina de iluminación controlada VeriVide

### ***Pruebas de visión del color***

Antes de seleccionar a los panelistas que van a participar en una evaluación visual es necesario asegurarse de que éstos no presentan ninguna deficiencia en la visión del color.

La mayoría de las deficiencias de la visión del color se caracterizan por la ausencia congénita o defecto de uno o más de los fotorreceptores en los conos fotorreceptores de la retina. Cada deficiencia muestra confusión hacia ciertos colores.

El tipo de deficiencia de color más común son los tricrómatas anómalos. Estos sujetos tienen los tres fotorreceptores, pero el espectro de absorción de

uno de ellos está desplazado a una posición anómala, dando lugar a una discriminación del color deficiente.

Por otro lado, existen sujetos en los que uno de los pigmentos de los fotorreceptores está totalmente ausente, por lo que sólo utilizan dos colores para realizar las igualaciones de color. Esta anomalía puede consistir en la ausencia de pigmentos de onda larga (protanopía), la ausencia de pigmentos de onda media (deuteranopía), o la ausencia de pigmentos de onda corta (tritanopía).

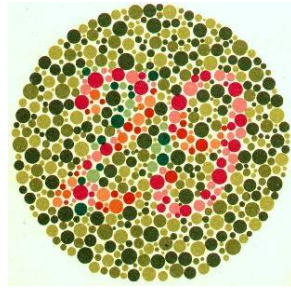
Por último, existen sujetos que pueden presentar sólo uno o ninguno de los pigmentos de los conos. Estos sujetos poseen ceguera total de los colores y se los denomina monocrómatas.

Para el diagnóstico de estas patologías existen distintas pruebas que permiten detectar pequeñas desviaciones respecto a la visión del color normal y discriminar entre distintos grados de alteración de la visión. Entre las pruebas más comunes encontramos las siguientes:

- Test de Ishihara.

Permite detectar deficiencias rojo/verde (protán y deután) mediante el método de confusión. Está constituido por 38 láminas coloreadas, divididas en dos grupos: 25 con números que son las que se usan habitualmente y 23 pensadas para niños o analfabetos formadas por trazos sinuosos que han de seguirse. Hay que utilizarlo con luz natural a una distancia de observación de 75 cm. El sujeto ha de identificar rápidamente el número o la trayectoria. Dependiendo de las respuestas, y mediante tablas, se determina si existe alguna anomalía y el tipo.





**Figura 19.** Ejemplo del test de Ishihara

- Test Farnsworth–Munsell 100 Hue

Permite detectar todo tipo de anomalías en la percepción del color mediante un método de ordenación. Consta de 85 cápsulas, numeradas por detrás, con diferente tono pero igual claridad y croma. Las cápsulas están divididas en 4 grupos. El sujeto ha de ordenar las cápsulas de cada estuche en 2 minutos. Este examen se usa para separar las personas con visión de color normal en clases de discriminación visual de color baja, promedio o superior, y para identificación en dónde reside la confusión de color, si padecen un defecto de apreciación de color.



**Figura 20.** Test de Farnsworth–Munsell 100 Hue

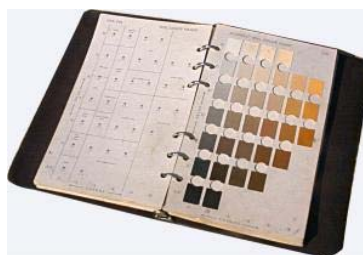
***Escalas comparativas de color***

La evaluación visual del color puede efectuarse usando escalas de color. Éstas pueden consistir en ejemplos típicos de alimentos mostrando toda la gama de colores que pueden presentarse en las muestras o usando fotografías o modelos hechos de plástico o yeso coloreado. Estas colecciones de referencia se usan en infinidad de industrias y tienen la ventaja frente a la cata de que proporcionan una identificación reproducible del color que se trata, y no sólo

una nomenclatura más o menos intuitiva (Calvo, 1989). En este sentido, es importante tener en cuenta que aunque el ojo humano puede discriminar bastante bien entre diferentes colores, la capacidad del cerebro para recordarlos es bastante pobre. En industrias en las que pueden conservarse muestras estables para establecer comparaciones (pinturas, productos textiles), esto no es un problema. Sin embargo, en el caso de la industria alimentaria estas comparaciones reales no son posibles por lo que las muestras deben compararse con atlas o colecciones de colores. Estas escalas deben abarcar todos los tonos e intensidades posibles en las muestras que evaluar y deben asignarse valores numéricos a cada punto de la escala. La muestra se compara visualmente con dicha escala y se le asigna un número, sin embargo no siempre es posible encontrar cartas de color adecuadas para este propósito cuando se trabaja con alimentos (Hutchings, 2011).

Los principales sistemas usados para el análisis visual son:

- *Sistema Munsell*: Es uno de los que más se usan en la industria alimentaria. Los colores se sitúan en función de la claridad (eje vertical), del tono (círculo perpendicular al eje) y de la saturación para cada tono (grado de alejamiento del eje central en cada radio correspondiente).



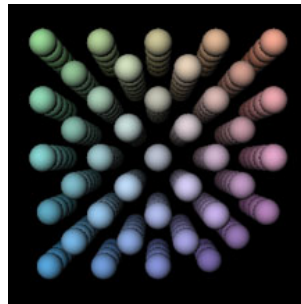
**Figura 21.** Atlas Munsell

- *Sistema DIN*: Se elaboró a partir de estimaciones visuales de diferencias de color. No es un espacio de color uniforme ya que las líneas de igual saturación no son circulares y no tienen el mismo espaciamiento entre ellas.



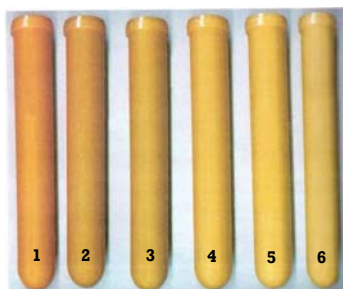
**Figura 22.** Carta de colores del sistema DIN

- *Sistema OSA-UCS*: Proporciona un espacio de color prácticamente uniforme. Se trata de un cubo octaedro que posee tres ejes: claridad (L), amarillo-azul (j) y verde-rojo (g).



**Figura 23.** Representación del sistema OSA-UCS

Para algunos alimentos se han desarrollado estándares específicos para su análisis visual. En el caso del zumo de naranja se encuentra la escala establecida por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para la clasificación de los zumos de naranja comerciales. Ésta consiste en una serie de seis tubos de plástico coloreados a los que se les asignan puntuaciones comprendidas entre 34 y 36. Así, un zumo de nivel A debe tener una puntuación de color entre 36 y 40 puntos, mientras un zumo de nivel B tendrá una puntuación de entre 32 y 35 (Lee, 2001; Stewart, 1977).



**Figura 24.** Estándares de color del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para el zumo de naranja

### ***Evaluación descriptiva del color***

Las limitaciones que presentan las escalas de color para la evaluación visual de los alimentos hacen necesario el desarrollo del análisis descriptivo del color, el cual, como ya ha sido comentado anteriormente, requerirá un entrenamiento previo del panel.

Aunque la evaluación del color se incluye en numerosos estudios sensoriales (Calvo y col., 2001; Frata y col., 2006; Poelman y Delahunty, 2011), hay muy pocos trabajos que incluyan un entrenamiento específico para la evaluación del color de los alimentos de una forma detallada. Gambaro y col. (2001) llevaron a cabo un entrenamiento específico para evaluar el color del yogur de fresa. En él, se prepararon diversas muestras de yogur con distintas concentraciones de colorante alimentario, para conseguir un panel de 8 catadores, específicamente entrenados. Hasta el momento, no existe ningún entrenamiento específico para la evaluación visual del zumo de naranja. Por ello, en esta Memoria, se incluye el desarrollo de un método de entrenamiento con este objetivo.

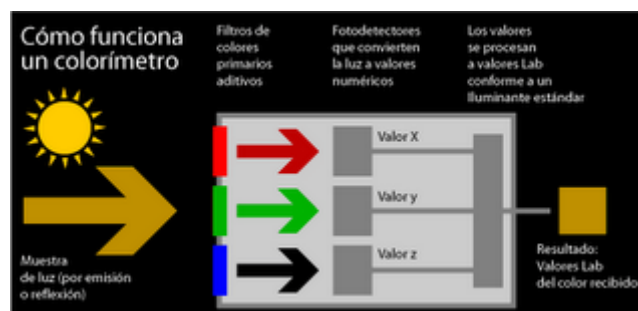
- **Análisis instrumental**

El color es el único atributo sensorial del que se dispone de métodos analíticos de medida con la suficiente precisión como para poder sustituir una medida visual. En el análisis instrumental del color, el color de los objetos se expresa mediante las coordenadas de color que se obtienen a partir de los valores triestímulo.

Las medidas instrumentales son sencillas, precisas y versátiles y además eliminan la subjetividad asociada a las medidas visuales. Al igual que en las medidas visuales, es necesario estandarizar las condiciones de la medida como: la presentación de la muestra (igual volumen de muestra, recipiente que permita la agitación), el fondo y entorno circundantes en el que se presenta la muestra, el blanco de referencia con el que se calibra el equipo, etc.

Para las medidas instrumentales de color mediante la colorimetría triestímulo existen métodos que miden directamente los valores triestímulo, llamados colorímetros, y los que miden la magnitud radiométrica o fotométrica a partir de la cual se calculan los valores triestímulo (espectrofotómetro y espectrorradiómetro).

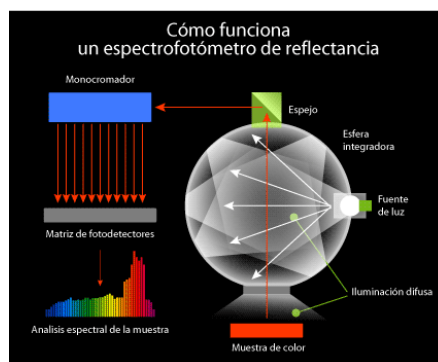
Los *colorímetros* (Figura 25) miden el color de fuentes de radiación primaria y secundaria (según emitan luz propia o reflejen o transmitan luz externa), así se obtienen los valores triestímulo X, Y, Z de una manera óptica, basándose en filtros específicos sin necesidad de un proceso matemático posterior. Este equipo da una respuesta según un observador y un iluminante estándares concretos, de este modo los valores son distintos para cada instrumento.



**Figura 25.** Fundamento de un colorímetro

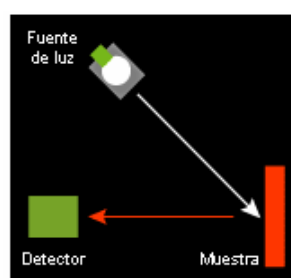
Los *espectrofotómetros* (Figura 26) miden la distribución espectral de la luz transmitida o reflejada de una muestra a partir de la cual se puede calcular el color bajo distintas condiciones. Tanto la transmitancia como la reflectancia son propiedades intrínsecas del objeto así que no se alteran con la iluminación recibida ni con el observador, obteniéndose en teoría el mismo valor independientemente del instrumento. La medida de la transmitancia es el cociente entre la respuesta del instrumento en presencia de muestra y cuando

la muestra no está en el camino óptico. La reflectancia es el cociente entre la respuesta del instrumento a la muestra y la respuesta a un patrón conocido (normalmente blanco), multiplicado por la reflectancia intrínseca del patrón. Los valores triestímulo se obtienen de manera matemática.



**Figura 26.** Esquema de un espectrofotómetro de reflectancia difusa.

Los *espectrorradiómetros* realizan medidas radiométricas de la distribución espectral de una fuente de radiación primaria o secundaria; y al igual que el espectrofotómetro, calcula los valores triestímulo matemáticamente, sin embargo, a diferencia de éste, no existe contacto entre la muestra y el instrumento por lo que la geometría de medida es similar a la de la apreciación visual.



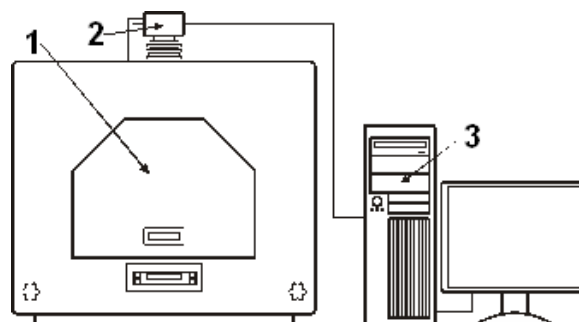
**Figura 27.** Esquema de un espectrorradiómetro

Recientemente se ha comenzado a utilizar el análisis de imagen digital para la medida instrumental del color. Esta metodología está basada en la adquisición de una imagen bajo determinadas condiciones para su posterior análisis, del cual se puede obtener no sólo el color total sino también la apariencia del objeto. La utilización de una cámara digital calibrada bajo condiciones de iluminación determinadas permite al usuario el control de la

medida del color y la captura de imágenes con gran precisión, incluso en 3 dimensiones. Una cámara digital recibe las imágenes en un dispositivo CCD (siglas en inglés de *charge-coupled device*: dispositivo de carga acoplada), circuito que contiene un número de condensadores que son estimulados por la radiación registrando grabaciones de luz en tres colores básicos: rojo, verde y azul (RGB en inglés). Por lo tanto cada píxel de la imagen contiene un valor para cada uno de los canales RGB. En el sistema de medida digital se registra el color en miles, incluso millones, de puntos en la muestra: cada píxel se registra como una medida independiente de color. Esto proporciona una información mucho más detallada sobre el color de la muestra. Así, la imagen digital puede usarse para medir no tanto el color medio como la distribución de color dentro de la muestra. Con la digitalización se consiguen imágenes que se corresponden perfectamente con el objeto original, siendo un sistema de captura de imágenes de muy alta calidad y precisión.

Entre las principales ventajas que presenta esta metodología está la posibilidad de realizar medidas fiables y precisas de manera rápida, casi instantánea, y de obtener imágenes de gran calidad, que reflejan la apariencia total del objeto, además del color.

Uno de los sistemas más utilizados para el análisis de imagen es el sistema DigiEye (Luo y col., 2001a). Éste consta de una cámara digital Nikon D-80 de 10.2 megapíxeles con un objetivo Nikkor 35 mm f/2D, conectada a un ordenador con el software DigiPix. De igual manera que en los otros métodos, las condiciones de medida deben estandarizarse, para lo cual se utiliza una cabina de iluminación controlada (VeriVide DigiEye<sup>®</sup>, Leicester, Reino Unido) que dispone de dos tubos fluorescentes que emulan el iluminante D65. Además, la cámara debe ser calibrada a partir de una carta de color estándar (Gretag Macbeth Colour Checker DC Chart) con el fin de caracterizar la respuesta relacionando sus señales RGB con las especificaciones CIE bajo las condiciones de iluminación fijadas (Figura 27). De cada imagen se obtienen los valores RGB para cada píxel, a partir de los cuales se debe realizar una transformación desde el espacio de color RGB a los espacios recomendados por la CIE.



**Figura 28.** Sistema DigiEye: Cabina de iluminación (1), cámara digital (2) y ordenador (3)

### 3.3. Relación del color del zumo con otros atributos sensoriales

El color, puede ser determinante en la manera en la que son percibidos otros atributos sensoriales de los alimentos. Así, la influencia del color en la percepción del flavor ha sido objeto de investigación desde hace más de 70 años, tanto a nivel práctico como teórico, pero aún no existe una respuesta inequívoca a esta cuestión (Spence y col., 2010).

El flavor se define como “una compleja combinación de las sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales percibidas durante el consumo de los alimentos y bebidas. Éste puede verse influenciado por efectos táctiles, térmicos, desagradables y/o cinestésicos” (ISO: 5492-1992). Según la ISO, aunque las señales visuales y auditivas no pertenecen intrínsecamente al flavor, pueden modificarlo. Así, los aspectos visuales como el color de los alimentos podrían modificar la percepción del flavor influenciando los atributos olfativos y gustativos (Spence y col., 2010).

Algunos estudios han probado el efecto del color sobre la percepción de distintos atributos. Por ejemplo, Tepper (1993) concluyó que los zumos de naranja se percibían más ácidos cuando adoptaban un cierto color verdoso. En cuanto a la percepción del dulzor, algunos autores han comprobado que se ve afectada por la coloración, los tonos verdes parecen disminuirla mientras que los rojos la aumentarían (Pangborn, 1960; Johnson y Clydesdale, 1982). Por otra parte Guinard y col., (1998) demostraron que la percepción del amargo estaba asociada a las coloraciones marrones en el caso de la cerveza. Finalmente, también se ha probado en diversos alimentos que la intensidad de la



percepción del flavor está relacionada con el color “típico” de los alimentos y su intensidad (Guinard y col., 1998; Zellner y Durlach, 2003).

Además del efecto sobre estas características sensoriales, la calidad hedónica también puede estar influenciada por el color. Schutz (1954) estudió la influencia del color del zumo de naranja en la apariencia y el sabor, mostrando que los observadores prefieren la apariencia de un color naranja sobre el color amarillo; y Zellner y Durlach (2003) concluyeron que las disoluciones incoloras de limón, menta y vainilla eran más agradables que otras disoluciones coloreadas.

Sin embargo, otros autores como, Koch y Koch (2003) indican que puede ser que el color no tenga nada que ver con el sabor de una comida o bebida, y Bayarri et al. (2001) concluyen que la posible influencia del color sobre la percepción del flavor está en discusión y no se han alcanzado conclusiones definitivas. Así, Lavin y Lawless's (1998) afirman que los resultados hallados en la bibliografía sobre el efecto del color en el sabor y el flavor son inconsistentes.

Por otra parte, estudios recientes sugieren que el color, además de influir sobre el flavor y la respuesta hedónica, puede tener un importante papel en la respuesta emocional del consumidor (Porcherot y col., 2013). Por ejemplo, se ha comprobado que existen distintas asociaciones color-emoción preestablecidas, que además difieren según distintos grupos de edad (Terwogt y Hoeksma, 1995). Además, otros trabajos concluyeron que distintos colores pueden aumentar o disminuir el apetito, mejorar el estado de ánimo, producir sensación de calma, y reducir la percepción del tiempo de espera, entre otros (Singh, 2006).

Con los conocimientos actuales, es indudable que el color juega un papel importante en nuestra experiencia y en la respuesta hacia los alimentos y, siendo el zumo de naranja el de mayor consumo a nivel mundial, resulta de gran interés profundizar en la influencia de su color sobre otros atributos sensoriales, así como en las preferencias y las expectativas de los consumidores de zumo.

## 4. EL AROMA

### 4.1. El aroma en los alimentos

El aroma junto con el sabor, está reconocido como uno de los atributos más importantes de los alimentos. Es una propiedad sensorial compleja, derivada del efecto integrado de numerosos compuestos de diferente naturaleza química (Jordan, 1999).

El aroma se relaciona con las sustancias volátiles presentes en los alimentos. Los compuestos volátiles suelen aparecer como productos secundarios de reacciones enzimáticas como la oxidación de lípidos y no enzimáticas, como la reacción de Maillard o la caramelización de los azúcares. Sin embargo, existe un amplio abanico de reacciones que originan compuestos aromáticos. Algunos ejemplos de estas sustancias son los aldehídos, cetonas, ésteres o terpenos, entre muchos otros.

El aroma puede originarse a partir de un compuesto volátil aislado, de varios compuestos o de cientos de ellos al mismo tiempo. Los alimentos pueden clasificarse en cuatro grupos según sus componentes volátiles (Jordan, 1999):

1- Aquellos alimentos en los cuales el aroma reside en un único componente denominado compuesto con carácter-impacto. En algunos casos, tales como el berro, el compuesto de carácter-impacto (2-feniletil isotiocianato) cuenta prácticamente con todo el olor.

2- Aquellos alimentos en los que el aroma se debe a más de un tipo de compuesto pero uno de ellos desempeña el papel principal. Este es el caso de la pera, en la que el componente de carácter-impacto es el etil-2-metilbutirato.

3- Aquellos alimentos en los que el aroma se debe a varios compuestos y puede ser reproducido razonablemente en los laboratorios utilizando un gran número de compuestos. La presencia de un componente con carácter-impacto es bastante improbable. Es el caso del albaricoque, la lima, o el melocotón.

4- Aquellos alimentos en los que el aroma está determinado por cientos de compuestos volátiles, cuya detección o reproducción artificial son difíciles. En ellos no ha sido descubierto un compuesto con carácter-impacto, ejemplos de estos alimentos pueden ser la fresa y el chocolate.

El aroma es un atributo que puede alterarse con facilidad en los alimentos. Durante el procesado de éstos, se llevan a cabo numerosas reacciones en las que se sintetizan o destruyen componentes directamente relacionados con los aromas finales. Procesos como la fermentación, el enlatado o los distintos tratamientos térmicos que se aplican a los alimentos pueden provocar una importante alteración de los aromas, por la gran cantidad de reacciones químicas generadas (Ruiz Perez-Cacho y Rouseff, 2008). El uso de determinadas materias primas para la elaboración de productos alimenticios influye también en el desarrollo de los aromas. Otro aspecto importante que hay que tener en cuenta es el correcto almacenamiento de los productos, desde su origen hasta que se consumen. Diversas reacciones como la oxidación de las grasas, o la transferencia de olores de un producto a otro son peligros potenciales para la alteración del aroma de los alimentos (Lozano y col., 2007).

Numerosos trabajos han demostrado que, aunque en los alimentos se detectan un gran número de compuestos aromáticos volátiles, sólo una pequeña fracción de los mismos contribuyen realmente al aroma (Teranishi y col., 1999). Los compuestos volátiles responsables del olor del alimento, denominados compuestos impacto, con frecuencia están presentes en bajas concentraciones en el alimento, y su relevancia sensorial se debe a que los umbrales de percepción son muy bajos (Grosch, 2001). Así, diferentes técnicas analíticas han sido descritas para determinar que moléculas son activas a nivel del aroma (Grosch, 1994).

#### 4.2. El aroma en el zumo de naranja

El aroma del OJ es un atributo sensorial altamente apreciado por el consumidor. Sus características se deben a una mezcla compleja de sustancias volátiles combinadas en proporciones específicas (Maarse, 1991).

Los compuestos volátiles dependen de la madurez y la variedad del fruto, la técnica de procesamiento, etc, por tanto, no todos los zumos de naranja tienen el mismo perfil aromático (Baxter y col., 2005; Jordan y col., 2003; Petersen y col., 1998). El aroma agradable del OJ recién exprimido es notablemente diferente del aroma típico de los zumos procesados térmicamente y aún más diferente de aquellos que se han reconstituido a partir de concentrado (Ruiz Perez-Cacho y Rouseff, 2008). Debido a que los consumidores demandan productos cuyo aroma se asemeje en la mayor medida posible al del OJ fresco, numerosos estudios han identificado y cuantificado los compuestos volátiles de los OJs recién exprimidos, con la intención de lograr duplicar este aroma (Nisperos-Carriedo y Shaw, 1990; Bazemore y col., 1999; Averbeck y Schieberle, 2011).

Los primeros estudios sobre el aroma del OJ se centraron en analizar todos los compuestos volátiles presentes en el zumo e identificar aquellos que estaban presentes en mayores concentraciones (Kealey y col., 1979; Schreier y col., 1977; Schultz y col., 1964; Shaw y col., 1977; Wolford y col., 1963). La mayor parte de estos trabajos utilizaron la extracción con disolventes para la posterior separación y detección en el cromatógrafo de gases.

En la siguiente tabla se incluye una lista con 114 volátiles identificados y cuantificados en estudios realizados en OJ frescos utilizando la técnica de separación cromatografía de gases.

**Tabla 6.** Volátiles identificados en OJ frescos, usando GC-FID y GC-MS entre 1963 y 1983.

<i>Ácidos (11)</i>	<i>Aldehídos (19)</i>	<i>Cetonas (7)</i>
Ácido acético	Acetaldehído	Acetona
Ácido butanoico	Ventanal	Metil etil cetona
Ácido hexanoico	Hexanal	2-Butanona
Ácido heptanoico	2-Hexanal	2,3-Butanediona
Ácido octanoico	2-Hexenal	2-Pentanona
Ácido nonanoico	Octanal	$\gamma$ -Decalactona
Ácido decanoico	Nonanal	Carvona
Ácido undecanoico	Decanal	<i>Ésteres (26)</i>
Ácido dodecanoico	Undecanal	Etil formato
Ácido tetradecanoico	Dodecanal	Etil acetato
Ácido hexadecanoico	Tetradecanal	Metil isovalerato
<i>Alcoholes (27)</i>	Neral	Etilbutanoato
Metanol	Geranial	Etil-n-caprilato
Etanol	$\alpha$ -Sinensal	n-Octil butanoato
1-propanol	$\beta$ -Sinensal	Terpinil acetato
1-butanol	Benzaldehído	Metil-n-metil antranilato
3-Metilbutan-1-ol	Perilladehído	n-Octil isovalerato
2-Metilbutan-1-ol	n-Butiladehído	Etil hexanoato
2-Metil-3-buten-2-ol	Furfural	Metil-3-hidroxi-hexanoato
1-Pentanol	<i>Hidrocarburos (22)</i>	Etil-3-hidroxi-hexanoato
1-Hexanol	Metano	Octil acetato
2-Hexanol	n-Hexano	Etil octanoato
3-Hexen-1-ol	(+)-limoneno	Etil propionato
1-Heptanol	$\alpha$ -Terpineno	Etil isobutanoato
Metil heptenol	$\beta$ -Terpineno	Dietil carbonato
1-Octanol	$\gamma$ -Terpineno	Etil-2-metilbutanoato
1-Nonanol	Terpinoleno	Metil hexanoato
2-Nonanol	Isoterpinoleno	Metil butanoato
Dodecanol	$\alpha$ -Felandreno	Metil propionato
(Z)- <i>p</i> -Menta-2,8-dien-1-ol	$\beta$ -Felandreno	Nonil acetato
Linalol	$\alpha$ -Tujeno	Geranil acetato
<i>p</i> -Menta-4-en-1-ol	Sabineno	Etil antranilato
$\alpha$ -Terpineol	$\delta$ -Careno	Linalo acetato
$\beta$ -Terpineol	$\alpha$ -Pinoeno	Neril acetato
Nerol	$\beta$ -Pinoeno	
Citronellol	Valencene	
Geraniol	$\alpha$ -Copaeno	
(E)-carveol (E)- <i>p</i> -Menta-6,8-dien-2-ol	$\beta$ -Copaeno	
(Z)-carveol (Z)- <i>p</i> -Menta-1,8-dien-6-ol	$\alpha$ -Cariofileno	
<i>Ésteres (2)</i>	$\beta$ -Cariofileno	
Dietil éter	$\beta$ -Mirceno	
Etil sec-butil éter	<i>p</i> -Cimeno	

Tabla incluida en Ruiz Pérez-Cacho y Rouseff (2008).

Los grupos más numerosos fueron los alcoholes y los ésteres (27 y 26 compuestos, respectivamente). Se identificaron además 22 hidrocarburos, que constituyeron el grupo más importante desde el punto de vista cuantitativo, principalmente debido a la gran cantidad de limoneno que se encuentra en el

zumo. El grupo de los aldehídos, aunque no es el más abundante, contiene compuestos con un papel muy importante en el aroma del OJ (Kealey y col., 1979). Finalmente, se encuentran los ácidos (11), las cetonas (7), y los éteres (2).

A día de hoy, se han identificado más de 200 compuestos volátiles en el OJ. De éstos, sólo una pequeña porción está presente a niveles que exceden significativamente el umbral de detección del olor. Así, Grosh (2001) concluyó que aproximadamente sólo un 5% de los volátiles de los alimentos contribuyen al aroma percibido y, como se ha comprobado en numerosos estudios, el caso del OJ no es una excepción (Ruiz Pérez-Cacho y Rouseff, 2008).

#### **4.2.1. Componentes volátiles característicos del zumo de naranja**

Después de varios intentos fallidos de reproducir el flavor de muchos alimentos en base a los compuestos volátiles que se encontraban en ellos en mayor concentración, se puso mayor énfasis en identificar cuáles eran verdaderamente los compuestos activos en el aroma.

El umbral de percepción de un compuesto volátil puede ser determinado mediante panelistas, por lo que, comparando las concentraciones medidas instrumentalmente con el valor umbral en humanos, se podría determinar si un compuesto concreto sería activo aromáticamente o no. Para ello se desarrolló el concepto “valor de actividad odorante” (OAV) que es el cociente entre la concentración del compuesto en el alimento considerado y su umbral de percepción (Grosch, 1994). El término de OAV, fue introducido en 1957 por Patton y Josephson, poco después de la introducción de la cromatografía gaseosa por James y Martin en 1952 (Marsili, 1997).

Cuando el OAV de un determinado compuesto volátil es igual o superior a la unidad, se considera que este compuesto está en concentración suficientemente alta como para ser percibido sensorialmente.

Ya en 1978 (Ahmed y col., 1978a) estudios basados en los umbrales de percepción de los panelistas sugirieron que acetaldehído, hexanal, octanal,

decanal, dodecanal y (R)-limoneno eran los compuestos que contribuían de forma importante al aroma de naranja. Estudios realizados en matrices modelo de OJ, señalaron acetaldehído, citral, etil butanoato, limoneno y  $\alpha$ -pineno como los compuestos más importantes (Ahmed y col., 1978b). Trabajos más recientes confirmaron estos resultados añadiendo etil butanoato, etil propionato, etil 2-metilbutanoato y linalol como compuestos volátiles importantes en el aroma de naranja (Maarse, 1991).

Tamura y col. (1996) utilizaron este concepto para caracterizar el OJ de *Citrus sinensis* L. Osbeck, cv. Shiroyanagi, mostrando que la mezcla de 11 compuestos (limoneno, linalol, octanal, decanal, dodecanal, geranial, neral, mirceno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -sinensal, y citronelal) reproducía el aroma de los mismos de una manera bastante eficaz.

Kebelek y Selle (2011), determinaron en OJ *Citrus sinensi* L. Osbeck cv. Dortyol yerli, 12 compuestos aromáticamente activos, basándose en sus valores de OAV. Los compuestos que presentaron mayor valor fueron etil butanoato, nootkatona, linalol y DL- limoneno.

Esta técnica también se ha utilizado para caracterizar OJs reconstituidos a partir de concentrado de zumo. Así, Averbereck y Schieberle (2009) cuantificaron 17 compuestos claves calculando los valores OAV: linalol, (R)-limoneno, etil 2-metilbutanoato, octanal,  $\alpha$ -pinene, etil butanoato, mirceno, acetaldehído, decanal y  $\beta$ -damascenona fueron identificados como los de mayor contribución al aroma del OJ.

Sin embargo, este enfoque (OAV) presenta varios problemas potenciales. Por ejemplo, es necesario conocer la concentración de cada compuesto, lo que en muchas ocasiones acarrea serias dificultades ya que algunos compuestos volátiles están presentes en cantidades de nanogramos por mililitro o menores. Además, el valor umbral puede ser también difícil de determinar debido a que la matriz empleada para diluir el compuesto de interés puede afectar al mismo. Por último, el entrenamiento del panelista también tiene una influencia directa sobre el valor umbral.

Por estos motivos, como alternativa al OAV se ha desarrollado un nuevo método que determina la actividad aromática directamente, usando un panelista al final de una columna cromatográfica. Esta técnica se conoce como Cromatografía de Gases - Olfactometría (GC-O).

#### **4.2.2. Análisis instrumental del aroma en el zumo de naranja**

Para la detección y separación de los compuestos volátiles la técnica analítica más empleada es la cromatografía de gases. Para preparar la muestra, se distinguen distintos métodos de extracción, aislamiento y concentración de los analitos, todos ellos etapas previas a la cromatografía de gases.

- **Técnicas de extracción y concentración de volátiles**

Los primeros estudios utilizaron la extracción líquido-líquido para separar y concentrar los volátiles de muestra del OJ. Más adelante, empezaron a utilizarse otras técnicas como la destilación (Sauri y col., 1980; Núñez y col., 1984;), el espacio de cabeza estático (Nisperos-Carriedo y Shaw, 1990; Shaw y col., 1993), o el espacio de cabeza dinámico (Moshonas y Shaw, 1992).

- Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es un proceso de transferencia de una o varias sustancias desde una fase líquida a otra también líquida inmiscible con la primera. Con esta técnica, los volátiles presentes en muestra del zumo se transfieren a la fase orgánica que posteriormente es concentrada. Este procedimiento está condicionado por numerosos factores como el largo tiempo de extracción, o la necesidad de usar grandes volúmenes de disolvente. La extracción líquido-líquido comprende varias etapas que pueden provocar la pérdida de analitos durante el proceso.

Diversos autores han empleado esta técnica para el aislamiento y la concentración de la fracción volátil en zumos cítricos, entre los más citados de la bibliografía encontramos a Parliment (1986), Klim y Nagy (1992) y Jella y col.



(1998). Otros trabajos más recientes también utilizan este método para estudiar la composición de volátiles en zumos, como Selly y Kebelek, (2011), que caracterizaron el perfil aromático del zumo procedente de Moro y Sanguinelli (*Citrus sinensis* L. Osbeck) realizando extracciones líquido-líquido.

#### - Microextracción en Fase Sólida (SPME)

La SPME se basa en el coeficiente de reparto entre el compuesto orgánico, una disolución acuosa o fase vapor y una fina capa polimérica que recubre una fibra de sílice fundida (Marsili, 1997). Esta técnica fue descrita por primera vez por Berlardi y Pawliszyn (1989) para el análisis químico medioambiental en muestras de agua. El primer paso consiste en la exposición de la fibra sobre la muestra, en la que quedan atrapados todos los analitos procedentes de la matriz. En una segunda etapa la fibra con los analitos concentrados se coloca en un sistema de desorción, seguida de la correspondiente separación y cuantificación cromatográfica. El método es rápido, fácil de aplicar, de bajo coste y, a la vez, respetuoso con el medio ambiente, ya que no usa ningún tipo de disolvente orgánico.

La SPME ha sido ampliamente aplicada al estudio del aroma en el zumo de naranja (Bazemore y col., 1999; Cerdán-Calero y col., 2013; Jia y col., 1998; Jordan y col., 2001; Lee y col., 2010; Rega y col., 2003).

#### - Análisis del espacio de cabeza

Este análisis consiste en el aislamiento de volátiles mediante la extracción de un volumen de aire del espacio libre sobre un recipiente, seguido de una inyección directa en un cromatógrafo de gases. Puede considerarse el más representativo de los análisis de la composición de la fracción volátil (Alberola y Izquierdo, 1978), ya que contiene los volátiles que son responsables del olor, en las concentraciones y relaciones en las que son percibidas por la nariz humana.

Mediante esta técnica el volumen extraído del espacio de cabeza es arrastrado con un gas inerte hacia una trampa de frío, la cual puede formar parte de un sistema cromatográfico (Schultz y col., 1971). Las ventajas de esta

técnica, en comparación con otros tratamientos convencionales de las muestras, son varias, así, si se analiza la fase gas en lugar de la acuosa, se pueden evitar muchos de los inconvenientes que presentan los métodos usuales de preconcentración de los componentes orgánicos o problemas relacionados con el análisis directo de los mismos en la fase acuosa. Puesto que los componentes ya se encuentran en la fase vapor, la muestra no tiene que vaporizarse para el análisis cromatográfico y, en consecuencia, se producen mejores separaciones cromatográficas que por cromatografía de gases convencional.

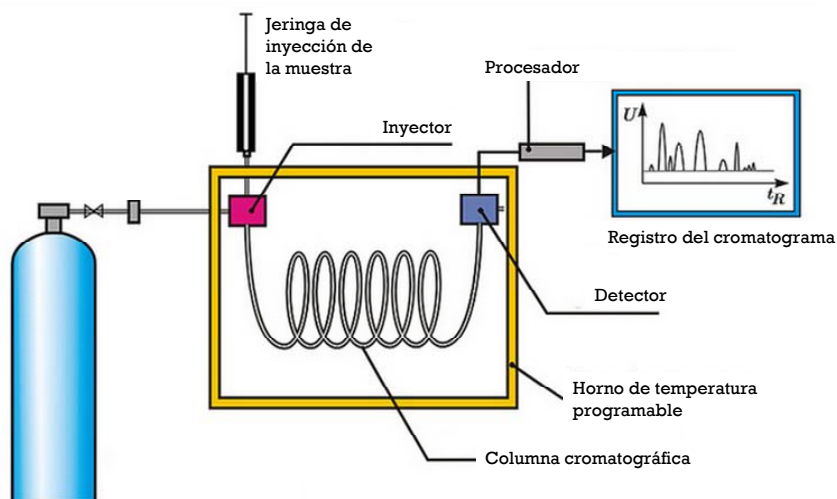
Entre las técnicas de análisis de espacio de cabeza se distingue el método estático (la muestra líquida no está sometida a agitación) y el método dinámico (la muestra está sometida a agitación). En los dos casos el principio fundamental es el mismo, los componentes volátiles de una muestra sólida o líquida se analizan mediante el estudio de la atmósfera adyacente a la muestra que queremos analizar (Marsili, 1997).

Wolford y col. (1963) fueron los primeros en aplicar esta técnica en la determinación de volátiles en zumos cítricos. Después de ellos, ha sido utilizada por un gran número de autores con el objeto de obtener cromatogramas de los componentes volátiles de los zumos. Así, encontramos diversos ejemplos como el trabajo de Nisperos-Carriedo y Shaw (1990), que cuantificaron 20 componentes volátiles en el zumo de naranja mediante espacio de cabeza estático; Lizotte y Shaw (1992) con la misma técnica consiguieron identificar 22 compuestos; Moshonas y Shaw (1992) analizaron zumos de naranja utilizando ambas técnicas de espacio de cabeza (estático y dinámico); Shaw y col. (1993) identificaron mediante el espacio de cabeza estático 19 componentes volátiles; y Sheung y col. (2004) estudiaron la absorción de distintos compuestos volátiles en envases de OJ de diferentes características, a través de un sistema de análisis del espacio de cabeza dinámico. Más recientemente, Averbek y Schieberle (2011) aplicaron esta técnica, unida a detección olfatométrica, para estudiar la influencia de diferentes condiciones de almacenamiento en el aroma de OJs concentrados.

- **Técnicas de separación e identificación**

- Cromatografía de gases (GC)

La GC es una técnica analítica de separación que ha experimentado un gran desarrollo desde sus inicios en los años 60. Además, sus posibilidades han ido ampliándose a medida que ha mejorado la instrumentación (columnas capilares, sistemas de gradiente de temperatura, nuevos detectores, etc.). Esta técnica cromatográfica es la que ofrece mejor poder de resolución para los compuestos volátiles. Su principal limitación se encuentra en la labilidad de los solutos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización.



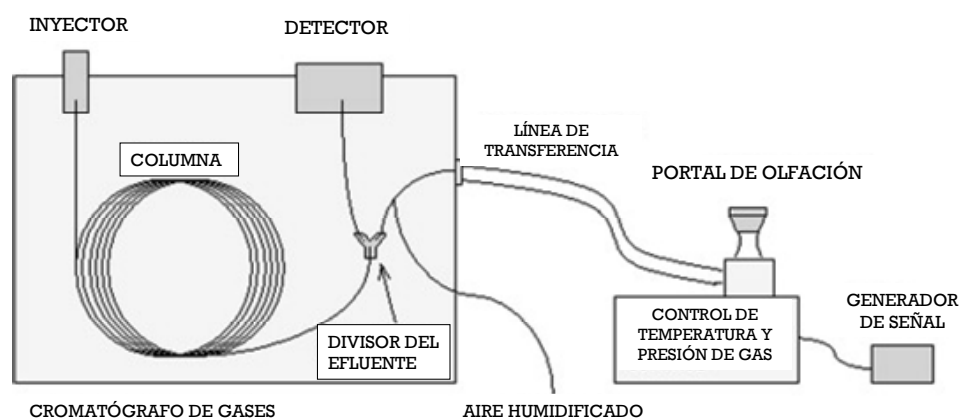
**Figura 28.** Esquema de un cromatógrafo de gases

El sistema de inyección “split/splitless” (flujo con/sin división) es el más utilizado en el análisis cromatográfico de compuestos volátiles. En el modo “split” de inyección se desprecia una fracción del volumen inyectado una vez volatilizada la muestra, mientras que en el modo splitless, no se desprecia ninguna fracción de la misma. Para detectar los compuestos volátiles es necesario utilizar sistemas de detección como el FID (detector de ionización de llama), que presenta gran sensibilidad y un amplio intervalo de respuesta.

En la actualidad se emplea con frecuencia el acoplamiento de la cromatografía de gases con columnas capilares y espectrometría de masas (GC-MS), combinando la capacidad de separación de la GC con la información estructural de la espectrometría de masas, lo que permite la identificación de las sustancias químicas responsables del aroma del zumo.

En los últimos años, técnicas como la cromatografía de gases con detección olfatométrica (GCO) han completado los resultados de las técnicas clásicas, puesto que, además de cuantificar los componentes volátiles, han permitido identificar cuáles aportan alguna nota aromática al alimento en cuestión. Por tanto, la GCO podría considerarse un punto intermedio entre el análisis sensorial y las técnicas cromatográficas.

Para llevar a cabo esta técnica se acopla un puerto de olfacción a la salida del cromatógrafo de gases, de tal forma que la nariz de los catadores sólo da respuesta a los compuestos que huelen y no a todos los volátiles. Así, se permite una directa correlación entre la separación cromatográfica de compuestos volátiles y su percepción sensorial (Luning y col., 1994). La duración de la detección y la descripción de los compuestos volátiles se registran en un ordenador.



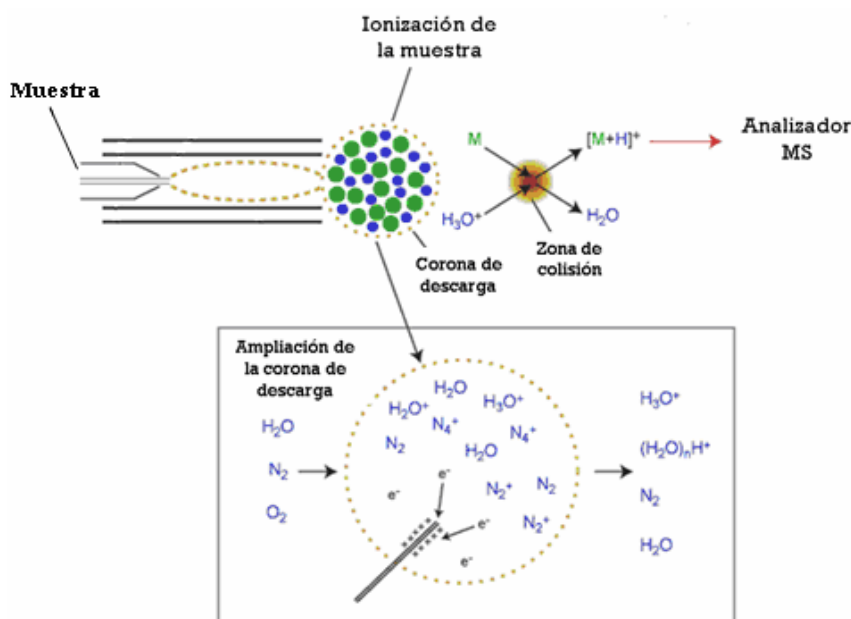
**Figura 29.** Esquema de un cromatógrafo de gases equipado con puerto de olfacción

Esta técnica ha sido desarrollada en el análisis de volátiles del OJ, así, Marin y col. (1992) la emplearon para ver el efecto de los polímeros plásticos en el aroma del OJ; Tonder y col. (1998) para discriminar entre zumos frescos y almacenados; Ruiz Pérez-Cacho y col. (2007) en el estudio de OJs enlatados y; más recientemente, Selli y Kelebek (2011) para caracterizar zumos procedente de naranjas sanguinas.

- Ionización Química a Presión Atmosférica con espectrometría de masa (APCI-MS)

La Ionización a Presión Atmosférica (API) es una técnica de ionización que incluye el “Electrospray, (ESI)”, y la “Ionización Química a Presión Atmosférica, (APCI)”.

En las fuentes APCI, desarrolladas a mediados de los años 70 (Horning y col. 1973), la muestra se introduce a través de una cámara de vaporización cilíndrica que se encuentra a elevada temperatura, lo que provoca la evaporación del efluente. La ionización se induce aplicando un elevado voltaje a un electrodo en forma de aguja (corona de descarga). Esta corriente eléctrica origina un plasma de iones que provoca un proceso de ionización química.



**Figura 30.** Esquema de la fuente APCI

APCI fue originariamente desarrollada como una técnica analítica para el análisis de compuestos traza en fase gaseosa. Así, numerosos estudios la han utilizado para estudiar la liberación de volátiles desde soluciones acuosas o emulsiones (espacio de cabeza), ya sea de forma estática o dinámica (Tsachaki y col., 2005). En un reciente trabajo se emplearon ambas técnicas para estudiar la liberación de aromas desde el vino (Tsachaki y col., 2009). El impacto de proteínas, lípidos y azúcares en la liberación de los volátiles del café molido también ha sido investigado utilizando esta metodología (Fisk y col., 2012).

Linforth y Taylor (1999), diseñaron una interfase capaz de analizar los volátiles liberados *in vivo*, es decir, durante el consumo de la muestra. Esta interfase necesitaba cumplir con ciertas características que eran necesarias para el estudio de los volátiles liberados en la respiración (Taylor y col., 2000):

- La interfase debe permitir la recolección del aire expirado de las personas durante la ingestión, sin interferir en su normal respiración o deglución.
- La ionización debe de estar controlada para producir espectros “limpios”, con poca fragmentación para facilitar la interpretación de los datos.
- La velocidad de recogida de datos debe ser suficiente para ver detalladamente la liberación de volátiles en la respiración.
- La respuesta debe ser lineal y el límite de detección bajo (ppb).
- Las interacciones entre los analitos deben ser minimizadas para permitir análisis cuantitativos de cada componente en una mezcla.
- Es necesario un proceso de calibración.

Así, APCI puede ofrecer datos muy útiles sobre la relación entre la liberación del flavor y la percepción sensorial (Baek y col., 1999; Linforth y col., 1999), sugiriendo que la velocidad de liberación es un importante factor en la percepción del flavor. Esta metodología ha sido aplicada en soluciones acuosas (Aznar y col., 2004; Rabe y col., 2004) y en varios alimentos como el queso (Gierczynski y col., 2007), el yogur (Trelea y col., 2008), o el kiwi (Friel y col.,

2007). Sin embargo, hasta el momento, no se habían aplicado estas técnicas para analizar la liberación de volátiles durante el consumo del zumo de naranja. En esta Memoria, se estudia la liberación de aromas con esta metodología, tanto *in vivo* como *in vitro*.

#### **4.2.3. Evaluación sensorial del aroma en el zumo de naranja**

Conocer cómo percibe el consumidor el aroma del zumo de naranja es esencial, por ser éste uno de los atributos de mayor importancia en la calidad de la bebida. Para ello, es necesario el uso de distintas técnicas de análisis sensorial.

Diversos trabajos han utilizado el análisis comparativo (pruebas por parejas, triangular, etc.) para establecer diferencias entre zumos en cuanto a su aroma. Por ejemplo, Siegmund y col. (2004) compararon OJs envasados en vidrio y cartón (pruebas duo-trío) comprobando que los zumos envasados en cartón se alteraban mucho más rápido que aquellos envasados en botellas de vidrio. Otro estudio en el que se utilizaron pruebas comparativas fue el de Moshonas y Shaw (1989), donde se concluyó, a través de pruebas por parejas y triangulares, que los panelistas mostraban preferencias significativas por los zumos conservados a temperatura de congelación frente a aquellos conservados a 21 y 26 °C.

También es interesante conocer el perfil aromático de los zumos de una manera descriptiva. Para ello es necesario desarrollar previamente un léxico apropiado que permita a panelistas entrenados evaluar cuantitativamente el aroma del zumo. Los descriptores son establecidos por el propio panel durante las sesiones de entrenamiento. Ruiz Pérez-Cacho y col. (2008) desarrollaron un vocabulario que incluye los atributos aromáticos necesarios para describir OJ frescos y comerciales.

Diversos estudios han utilizado el análisis sensorial descriptivo de los aromas para caracterizar y clasificar distintos tipos de OJ. Lin y col. (1993) evaluaron el aroma del OJ natural de una manera descriptiva (QDA); Luckow y

Delahunty (2004) describieron el aroma de varios zumos funcionales; y Lotong y col. (2003) categorizaron una amplia variedad de los zumos industriales disponibles en el mercado, incluyendo en su perfil descriptivo varios atributos aromáticos.

Los resultados obtenidos en el análisis sensorial pueden ser relacionados con los obtenidos químicamente. Petersen y col. (1998) sometieron diversos zumos de naranja a distintas temperaturas de almacenamiento y, después de relacionar los datos descriptivos obtenidos de un panel entrenado con el análisis cromatográfico de los compuestos volátiles, concluyeron que se podía predecir la calidad sensorial del zumo a partir de la medición de 11 compuestos aromáticos. Rega y col. (2004) correlacionaron medidas instrumentales de compuestos volátiles (SPME) con resultados de análisis sensoriales (tests triangulares y descriptivos) para estudiar el papel de la pulpa en la liberación del flavor y la percepción sensorial del OJ. En otro estudio Ruiz Pérez-Cacho y col. (2007) relacionaron el perfil sensorial descriptivo de zumos enlatados con los resultados obtenidos de su análisis olfatométrico, identificando los compuestos responsables de sus características sensoriales.





## *Objetivos*





## OBJETIVOS GENERALES

El zumo de naranja se encuentra entre los de mayor consumo a nivel mundial. Su color naranja brillante y su aroma característico son muy apreciados por el consumidor, aunque pueden verse alterados por los tratamientos industriales a los que se somete. El color es un atributo sensorial que puede ser definido de forma objetiva por la Colorimetría Triestímulo. La estandarización de nuevos métodos de análisis del color, como la digitalización de imagen en comparación con otros más conocidos, como la espectrorradiometría, puede ayudar a definir mejor este atributo en relación con la apreciación sensorial. Para ello es necesario el desarrollo de metodologías específicas para el análisis sensorial del color en el zumo. Por su parte, la implicación del color en la percepción de otros atributos como el flavor, ha sido objeto de numerosas investigaciones, aunque su efecto aún no está totalmente dilucidado. Por todo ello y teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, el objetivo general de este trabajo ha sido profundizar en la evaluación instrumental y sensorial del color y el aroma del zumo de naranja.

En concreto, los objetivos específicos planteados son los siguientes:

- Establecer las condiciones óptimas de medida instrumental del color por técnicas de análisis de imagen, incluyendo los factores que afectan a las mismas.
- Profundizar en aspectos metodológicos y de interpretación de la evaluación sensorial del color mediante:
  - El diseño de un entrenamiento específico para la evaluación visual del zumo de naranja.
  - La investigación de los umbrales de discriminación visual de color en zumo de naranja.
  - El estudio de las preferencias de los consumidores hacia el color de distintas variedades de zumos
  - El estudio de la correlación entre la evaluación instrumental y visual del color.

- Profundizar en el estudio de las implicaciones que tiene el color en otros atributos sensoriales relacionados con la calidad (sabor y flavor).
- Evaluar el efecto del procesado industrial (etapa de desamargado) en parámetros de calidad del zumo de naranja relacionados con la percepción sensorial.
- Evaluar el efecto de la pulpa del zumo en la percepción del flavor, mediante técnicas novedosas APCI-MS *in vitro* e *in vivo*.

## GENERALS OBJECTIVES

Orange juice is one of the most frequently consumed juices in the world. Its shining orange colour and its characteristics aroma are very appreciated by consumers; although these attributes can be modified by the industrial processes to which they are submitted. Colour is a sensory attribute that can be defined objectively by Tristimulus Colorimetry. The standardization of new methods for colour analysis as the digital image analysis, may contribute to a better understanding of this attribute, in relation to its visual appreciation. For this reason, it is necessary to develop specific methodologies for the sensory analysis of orange juice colour. On the other hand, the implications of colour in the perception of other attributes like flavour, has been the aim of several studies although its effect has not been totally elucidated. Thus, taking into account the issues explained above, the general objective of this work has been to go in depth with instrumental and sensory evaluation of orange juice colour and aroma.

In particular, the specific aims of this work are:

- To set up the optimal conditions for instrumental colour measurements by digital image analysis, including the factors affecting it.
- To go in depth into methodological aspects and the interpretation of the sensory evaluation of colour by:
  - The design of a specific training to evaluate visually the orange juice.
  - The research of colour discrimination thresholds in orange juice.
  - The study of the consumers' preference towards the colour of juices from different orange varieties.
  - The study of correlation between sensory and instrumental colour measurements.
- To go in depth into the study of the implications that colour has in other sensory attributes related to quality (taste and flavour).

- To study the effect of the industrial process (debitting phase) on quality parameters of the orange juice, related to the sensory perception.
- To study the effect of the pulp on the sensory perception of flavour by novel techniques: APCI-MS *in vitro* and *in vivo*.

## *Métodos generales*







## 1. Parámetros físico-químicos

Los análisis físico-químicos realizados en las muestras de OJ incluyeron los siguientes parámetros: pH, acidez total, fenoles totales, contenido de pulpa y contenido de lípidos en pulpa. Todos los análisis se realizaron por triplicado, expresando el resultado en función de la media aritmética y la desviación estándar.

### 1.1. Determinación del pH

Para la determinación del pH se utilizó un pHmetro Grinson modelo GLP-21 previamente calibrado.



**Figura 32.** pHmetro Grinson

#### - Material

##### Aparatos e instrumentación

Vaso de precipitado de 50 mL.

pH-metro CRISON GLP 21.

Electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl.

##### Reactivos

Disoluciones de referencia de pH 4.00, 7.00 y 9.00 (Merck, Darmstadt, Germany).

Disolución de mantenimiento del electrodo del pH-metro (KCl, 3 M) (Merck, Darmstadt, Germany).

#### - Procedimiento analítico

Calibrar el pH-metro con las disoluciones tampón de referencia. Una vez calibrado, realizar la medida del pH sumergiendo el electrodo en el zumo durante unos 15 segundos a una temperatura de 20 °C. Se efectúan 3

determinaciones de cada muestra, tomando como resultado la media aritmética de las mismas.

## 1.2. Determinación de la acidez total

La acidez total es una medida de todos los ácidos presentes en el OJ. La determinación se realizó por volumetría ácido-base de acuerdo al método 942.15/90 (AOAC, 1995). Dado que el ácido cítrico es el ácido orgánico mayoritario en naranjas, los resultados se expresan como gramos de ácido cítrico por 100 mL de zumo.

### - Material

#### Aparatos:

Bureta graduada de 25 mL

Pipeta graduada de 5 mL

Erlenmeyer 100 mL

Probeta de 25 mL

#### Reactivos:

Disolución de NaOH 0.1 N (Panreac; Barcelona, España), Ref.181694.

Disolución de fenolftaleína 1% en etanol (Panreac; Barcelona, España), Ref. 131325).

### - Procedimiento analítico

Para la valoración de las muestras se tomaron alícuotas de 5 mL de zumo de naranja que se diluyeron con 20-25 mL de agua destilada, añadiéndose a continuación 3-4 gotas de fenolftaleína como indicador.

Desde la bureta, previamente enrasada, se realiza la valoración con disolución de NaOH 0.1 M, agitando constantemente la muestra, hasta la aparición de un color rosa persistente por 15 segundos.

### - Cálculos

Se calcula la acidez total, expresada en g/100 mL de ácido cítrico según la siguiente expresión:

$$Acidez\ Total = \left( \frac{6.4 \times V_{NaOH} \times N_{NaOH}}{V_z} \right)$$

donde,  $V_{NaOH}$ : volumen medio de NaOH gastado (mL).

$N_{NaOH}$ : normalidad del NaOH (eq./L).

$V_z$ : volumen del zumo (mL).

### 1.3. Fenoles Totales por Método Folin-Ciocalteu

El contenido total de fenoles se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, Jr., 1965) usando ácido gálico como estándar. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico por litro de zumo. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu que es una mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico. En medio básico, estos ácidos se reducen al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia del color azul desarrollado se mide a 765 nm.

#### - Material

##### Aparatos e instrumentación

Espectrofotómetro de diodos UV-Vis HP 8453 (Hewlett-Packard, Palo Alto, Ca, USA).

Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España).

Centrifuga Allegra X-12R Centrifuge (Beckman Coulter; Barcelona, España).

Cubeta de plástico de 10 mm de paso de luz.

Matraces aforados de 25 mL.



**Figura 33.** Espectrofotómetro de diodos UV-Vis HP 8453

##### Reactivos

Reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac; Barcelona, España), Ref. 251567.

Ácido gálico (Analyticals Carlo Erba; Barcelona, España). Ref. 406335.

$Na_2CO_3$  (Panreac; Barcelona, España), Ref: 141648.

### Disoluciones

Disolución patrón de ácido gálico de 5 g/L: se obtiene por disolución 500 mg de ácido gálico (previamente desecado en estufa) en 100 mL de agua destilada.

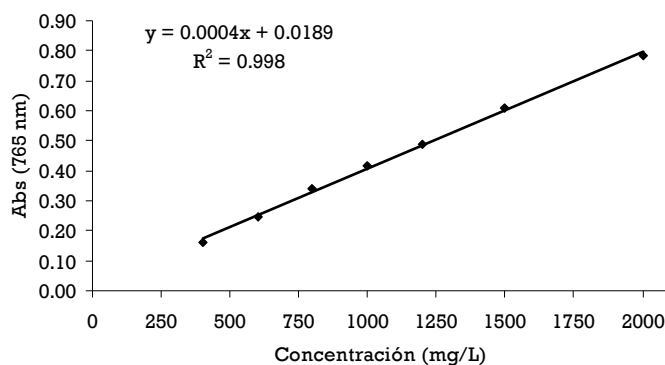
Disoluciones de trabajo de ácido gálico: se preparan 9 disoluciones de trabajo por diluciones sucesivas de la solución patrón de ácido gálico con agua destilada. Las concentraciones finales fueron 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 y 1200 mg/L.

Disolución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% (m/v): se obtiene por disolución de 200 g de carbonato sódico anhidro en 700-800 mL de agua destilada hervida y enfriada. Tras la disolución total se enfría a temperatura ambiente y se añade agua destilada hasta alcanzar un volumen de 1L.

### **- Procedimiento analítico**

#### Recta de calibrado

La recta de calibrado se realiza a partir de las disoluciones de trabajo. La reacción se realizó utilizando matraces de 25 mL. A 100  $\mu\text{L}$  de cada una de las disoluciones se adicionan 2000  $\mu\text{L}$  de agua destilada. Tras agitar, se añaden 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin-Ciocalteu y posteriormente, después de 30 segundos y antes de 8 minutos, se adicionan 1000  $\mu\text{L}$  de disolución de carbonato sódico al 20%. Finalmente se añade agua destilada hasta alcanzar el volumen de 25 mL. Tras un reposo de 2 horas a 24 °C se determinó espectrofotométricamente la absorbancia a 765 nm de cada disolución frente al blanco de reactivos. Con las absorbancias obtenidas y las concentraciones conocidas, se construye la recta de calibrado.



**Figura 34.** Recta de calibrado del ácido gálico

### Análisis de la muestra

Se centrifugan 10 mL de zumo a 3750 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se toman 100 µL del sobrenadante y se lleva a matraz de 25 mL, luego se añaden 2000 µL de agua destilada. Tras agitar, se adicionan 200 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu y posteriormente se añaden 1000 µL de disolución de carbonato sódico al 20%. Finalmente se mezcla bien y se enrasa con agua hasta 25 mL. Tras un reposo de 2 horas a 24°C se determina la absorbancia de cada disolución frente al blanco de reactivo a 765 nm y en cubetas de 10 mm de paso de luz.

#### **- Cálculos**

La concentración de fenoles totales expresada en mg de ácido gálico por litro de zumo se calcula con los valores de absorbancia medidos a 765 nm y la recta de calibrado según la expresión siguiente:

$$FT (mg / L) = OA + (m \times Abs_{765nm})$$

donde,

FT: concentración fenoles totales expresada en mg de ácido gálico por litro de zumo

OA: ordenada en el origen de la curva de calibrado del ácido gálico

m: pendiente de la curva de calibrado del ácido gálico

Abs<sub>765nm</sub>: absorbancia medida en la muestra a 765 nm.

### **1.4. Contenido de pulpa**

El contenido de pulpa sedimentable o centrifugable se determina por centrifugación directa del zumo. El diámetro y la velocidad de la centrifuga, así como el tiempo y la temperatura pueden afectar dicha medida, por lo que se ha seguido una metodología estandarizada (Kimball, 1999).

**- Material**

Aparatos e instrumentación:

Centrífuga Allegra X-12R Centrifuge (Beckman Coulter).

Tubos de vidrio graduados volumétricamente con tapón.



**Figura 35.** Centrífuga Allegra X-12R Centrifuge

**- Procedimiento analítico**

Se coloca un volumen medido (10 mL) del zumo en el tubo graduado, y se centrifuga a 3750 rpm, 15 min a 4°C. Se lee el volumen correspondiente a la pulpa, y se expresa como %V/V.

**1.5. Contenido de lípidos en pulpa**

**- Material**

Aparatos:

Embudo de decantación

Rotavapor

Matraz de destilación

Balanza analítica de precisión METTLER TOLEDO AE-260 (Barcelona, España).

Pipeta graduada de 5 mL

Pipeta graduada de 10 mL

Reactivos:

Triclorometano (Panreac, Barcelona, España) Ref.131252.

Metanol (Panreac; Barcelona, España), Ref. 131091

**- Procedimiento analítico**

2 ml de agua destilada y 6 ml de triclorometano:metanol (2:1) se añaden a la pulpa (5 g). Las muestras se mezclan en un embudo de decantación por agitación vertical, durante 30 segundos y se deja que se separen las fases durante 30 minutos. La fase orgánica inferior se recupera mientras que la fase superior se extrae otras tres veces con 6 mL de triclorometano: metanol (2:1). La fase orgánica recogida se reúne y se deshidrata sobre sulfato de sodio anhidro y el extracto se evapora a sequedad en un rotavapor al vacío. Todas las extracciones se llevan a cabo por triplicado. El contenido de lípidos se calcula por diferencia gravimétrica y los resultados medios se expresaron en porcentaje (% P/P).



## 2. Análisis del color

Para la evaluación del color de muestras de zumo de naranja se utilizaron tres métodos instrumentales distintos: espectrorradiometría, espectrofotometría de reflectancia difusa, y análisis de imagen digital.

### 2.1. Medida del color por espectrorradiometría

Las medidas de color de las muestras se realizaron por reflexión, utilizando un espectrorradiómetro acoplado a una estación de recogida de datos IS-Specwin. Para las mediciones se utilizaron cubetas de plástico (10×10×45 mm) o botes de plástico de 75 mL de capacidad (48 x 74 x 29 mm). El blanco de reflexión se midió con agua destilada usando un fondo blanco.

Como fuente de iluminación externa se utilizó una lámpara de halogenuro metálico de 250 W Phillips MHN-TD Pro (12.900 lúmenes, temperatura de color 4200 K) colocada en la parte superior de la cabina formando un ángulo de 45° con la cubeta. El equipo se programó para tomar 3 medidas consecutivas cada dos segundos, de forma que las coordenadas de color obtenidas fueron la media de dichas mediciones.

Se registró el espectro visible (380 - 770 nm) y se obtuvieron los parámetros de color del espacio uniforme CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h_{ab}$ ) directamente del aparato (Anexo A). El iluminante considerado fue el estándar CIE D65, que se corresponde con la luz de día natural. Se tomó también como referencia el Observador Estándar Colorimétrico Suplementario 1964 u Observador de 10°.

#### - Material

##### Aparatos e instrumentación

Espectrorradiómetro I.S. CAS 140-B (Instrument Systems, Munich, Alemania) (Figura 36).

Sonda telescópica TOP 100 (Instrument Systems, Munich, Alemania).

Zoom Tamron Mod. SP 23 (Commarck, Estados Unidos).

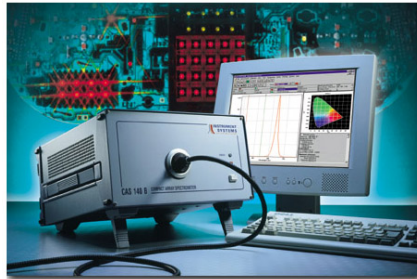
Estación de recogida de datos IS-Specwin 1.8. (Instrument Systems, Munich, Alemania).

Cubetas de 10 mm de paso de luz.

Botes de medios de cultivo de 75 mL de capacidad (48 x 74 x 29 mm).

### - Procedimiento analítico

Se calibra el equipo con el blanco de referencia (agua destilada) y posteriormente se realizan las medidas por triplicado. El software proporciona los parámetros colorimétricos del espacio de color CIELAB (Anexo A).



**Figura 36.** Espectrorradiómetro CAS 140-B

## 2.2. Medida del color por espectrofotometría

Las medidas de color de las muestras se realizaron por espectrocolorimetría de reflexión, en cubetas de vidrio (10×10×45 mm). Los valores triestímulo y las coordenadas del espacio uniforme CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) se obtuvieron a partir del espectro visible (400 - 700 nm). El iluminante considerado fue el estándar CIE D65, que se corresponde con la luz de día natural. Se tomó también como referencia el Observador Estándar Colorimétrico Suplementario 1964 u Observador de  $10^\circ$ .

### - Material

#### Aparatos e instrumentación

Colorímetro Hunterlab Color Quest XE (Figura 37)

HunterLab Universal Software 3.60. (Hunter Associates Laboratory, Inc. Reston, Virginia, EE.UU.).

Cubetas de 10 mm de paso de luz

### - Procedimiento analítico

Después de calibrar el equipo usando una placa cerámica blanca estándar, se realizan las medidas por triplicado. El software proporciona los parámetros colorimétricos del espacio de color CIELAB (Anexo A).



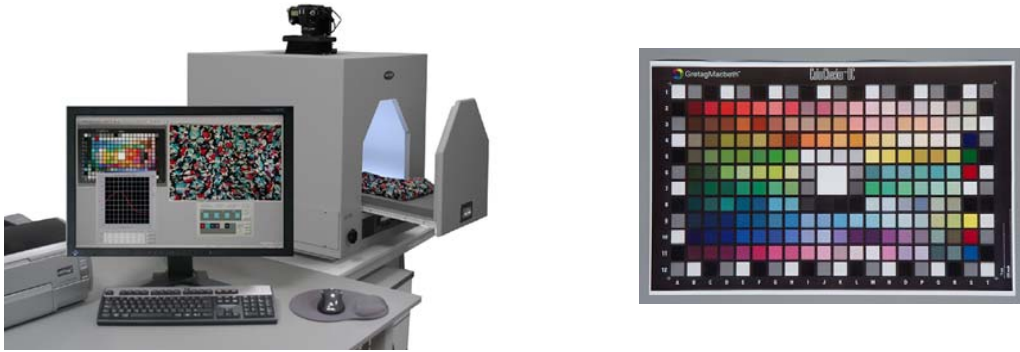
**Figura 37.** Colorímetro Hunterlab Color Quest XE

### **2.3. Análisis de imagen digital**

La adquisición de las imágenes se realizó con un sistema DigiEye® (Luo y col., 2001) que consta de una cámara digital Nikon D-80 de 10.2 megapíxeles y un objetivo Nikkor 35 mm f/2D, conectada mediante un puerto USB a un ordenador con el software DigiPix®. Este software proporcionado por el equipo realiza las siguientes funciones:

- Calibración de la cámara, transformando la señal RGB de la cámara a las especificaciones CIE mediante una carta de patrones certificada (DigiTizer, VeriVide Ltd. Leicester, UK).
- Obtención de las coordenadas colorimétricas mediante la medida de color de un grupo de píxeles seleccionados dentro de la imagen. Estos resultados son expresados en términos colorimétricos.

Para estandarizar las condiciones de medida se utiliza una cabina de iluminación controlada (VeriVide DigiEye®, Leicester, Reino Unido) que dispone de dos tubos fluorescentes que emulan el iluminante CIE D65. La cámara se calibra con una carta de color estándar (Gretag Macbeth Colour Checker DC Chart) con el fin de caracterizar la respuesta de la cámara, relacionando sus señales RGB con las especificaciones CIE bajo las condiciones de iluminación fijadas. Para la obtención de los parámetros de color es necesario realizar la transformación desde el espacio de color RGB a los espacios recomendados por la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE). Esta transformación no es directa y se necesita una calibración que depende entre otros factores, de la iluminación al capturar las imágenes (León y col., 2006). A partir de cada imagen se obtienen los parámetros CIELAB usando el software DigiFood® (Heredia y col., 2006).



**Figura 38.** Sistema DigiEye y carta de color estándar para calibración

### - Material

#### Aparatos e instrumentación:

Sistema Digiere (Figura 38):

Digital camera Nikon D-80.

Cabina de iluminación.

Carta de color standard (Gretag Macbeth Colour Checker DC Chart).

### - Procedimiento analítico

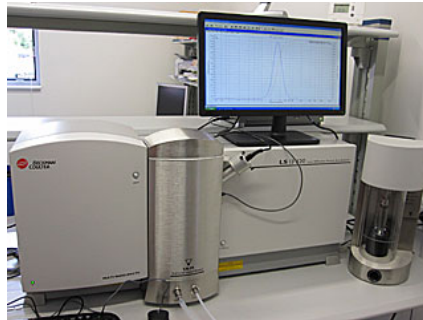
Para las mediciones de color, las muestras de zumo de naranja se colocan en botes de plástico de 75 mL de capacidad (48 x 74 x 29 mm) o en cubetas cilíndricas de 44.7 mm de diámetro (según el objetivo del ensayo). Se colocan dentro de la cabina y se adquiere la imagen correspondiente. A partir de las imágenes obtenidas, se recortan áreas centradas de 128x128 píxeles, las cuales se procesan utilizando el software DigiFood® (Heredia y col., 2006) para obtener los parámetros colorimétricos.

### 3. Medida de la distribución de tamaño de partículas

La medida de la distribución del tamaño de partícula se realiza mediante un analizador de láser (LS 13 320, Beckman Coulter, High Wycombe, UK), capaz de medir el diámetro de partícula en un rango 0.4 – 2000  $\mu\text{m}$ .

El método se basa en el análisis del ángulo de difracción del láser. Cuando un haz de láser pasa a través de una suspensión, la luz es difractada. El detector mide la distribución de la intensidad de la luz dispersada. Las partículas pequeñas dispersan luz a grandes ángulos, mientras que las partículas grandes dispersan luz a pequeños ángulos. Es decir cuanto menor es el tamaño de la partícula, mayor es el ángulo de dispersión.

Se toma 1ml de OJ y se diluye en 100 mL con agua destilada. Esta dilución se hace circular a través del analizador.



**Figura 39.** Analizador de tamaño de partículas

## 4. Análisis de Volátiles

### 4.1. Determinación de volátiles por cromatografía de gases

Para el análisis de los compuestos volátiles del OJ se utilizó una extracción líquido-líquido y posterior análisis por cromatografía de gases y detector FID, basado en el método propuesto por (Jella y col., 1998).

#### - Extracción

##### Aparatos e instrumentación

Centrifuga Allegra X-12R Centrifuge (Beckman Coulter)

Vortex Genius 3, IKA, Germany

Concentrador Plus/ Vacufuge Plus (Eppendorf, Alemania)

Pipetas de 10 mL

Tubos Falcon de 50 mL

Pipetas Pasteur de vidrio

##### Reactivos

Pentano (Panreac; Barcelona, España), Ref. 124462

Dietil éter (Panreac; Barcelona, España), Ref. 33203

Propil benceno (Panreac; Barcelona, España), Ref. 82118

Metanol (Panreac; Barcelona, España), Ref. 131091

##### Procedimiento analítico

Las extracciones se llevan a cabo por triplicado. A 10 ml de zumo se le añaden 4 ml de pentano: dietil éter (1:1) y se mezcla, se añaden 25 µL de propil benceno en metanol (100 mg/L) como patrón interno antes de la extracción. Se agita durante 12 horas. La emulsión resultante se centrifuga durante 5 minutos (3750 rpm). La capa superior de disolvente se separa cuidadosamente, y se concentra hasta sequedad. El residuo seco se redisuelve en 1 ml de metanol y 1 µL se inyecta en el cromatógrafo.

#### - Análisis cromatográfico

Los extractos fueron analizados por cromatografía de gases (GC) en un sistema Agilent Technology 6890N con detector de ionización de llama (FID). Para la separación de los compuestos se utilizó la columna DB-Wax (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) de Varian (Walnut Creek, CA, USA). Los extractos se inyectaron por triplicado.

### Condiciones cromatográficas empleadas

- Gas portador: Helio (1 mL min<sup>-1</sup>)
- FID:
  - Hidrógeno: 40 mL min<sup>-1</sup>
  - Aire: 450 mL min<sup>-1</sup>
  - Make up: Nitrógeno 45 mL min<sup>-1</sup>
- Volumen de inyección: 1 µL
- Condiciones de inyección: relación de split 1:25
- Temperatura del inyector: 250 °C
- Temperatura del detector: 250 °C
- Programas de temperatura del horno:
  - Temperatura inicial: 40°C durante 3 minutos
  - Rampa: 6 °C min<sup>-1</sup>
  - Temperatura final: 200 °C durante 6 minutos

### Identificación

La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando los tiempos de retención de las disoluciones patrón de los compuestos volátiles.

Los compuestos puros utilizados para las disoluciones patrón fueron:

α-pineno (Sigma Aldrich; Poole, United Kingdom), Ref. 147524

Linalol (Sigma Aldrich; Poole, United Kingdom), Ref. 51782

Limoneno (Sigma Aldrich; Poole, United Kingdom), Ref. 62118

Octanal (Sigma Aldrich; Poole, United Kingdom), Ref. O5608

Citral (Sigma Aldrich; Poole, United Kingdom), Ref. C83007

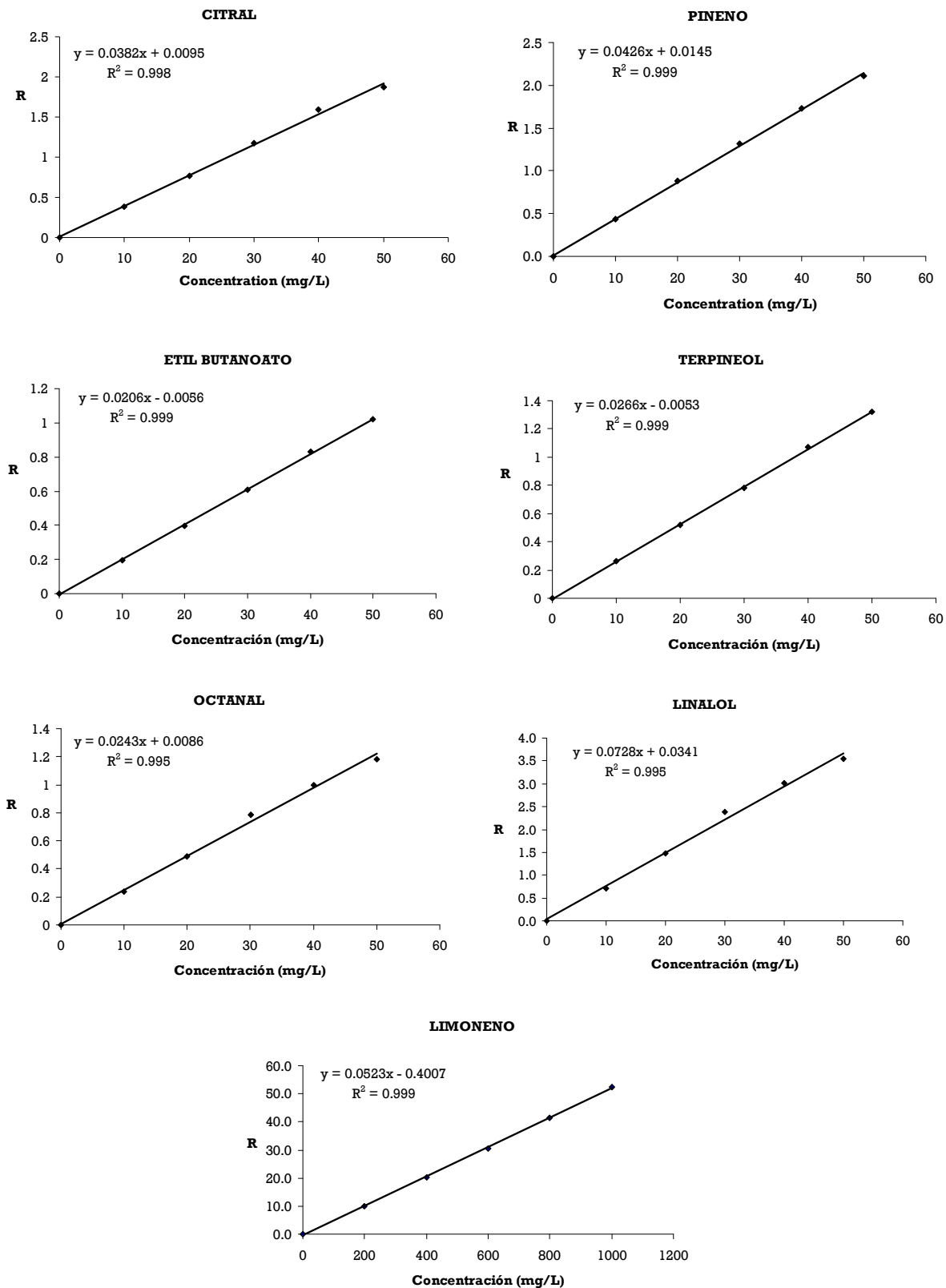
Etil Butanoato (Sigma Aldrich; Poole, United Kingdom), Ref. 75563

Terpineol (Sigma Aldrich; Poole, United Kingdom), Ref. W304522

### Cuantificación

Las diluciones patrón se han obtenido a partir de los compuestos puros, disueltos en metanol y a partir éstos se obtuvieron las más diluidas.

La cuantificación se realiza mediante calibración por patrón interno (IS).



**Figura 40.** Rectas de calibrado de los compuestos volátiles.  
 R = Relación de las áreas



## 4.2. Determinación de volátiles por Ionización Química a Presión Atmosférica con espectrometría de masas (APCI-MS)

Para analizar los compuestos volátiles del espacio de cabeza se utilizó un espectrofotómetro de masas (Platform LCZ) con una interfase MS Nose, (Micromass, Manchester, U.K.). Se realizó la ionización química a presión atmosférica con un analizador de triple cuadrupolo. Se seleccionó el modo de adquisición de datos selectivo de iones (SIM) (ión 137 m/z) y un voltaje de cono de 15 V, para todos los experimentos. Para el tratamiento de datos se usó el software MassLynx (Micromass, Manchester, UK) (Taylor y col., 2000). Todos los análisis se realizaron por triplicado.



**Figura 41.** Espectrómetro de masas Platform LCZ

Este sistema se usó para el análisis del limoneno del espacio de cabeza estático, dinámico e *in vivo*.

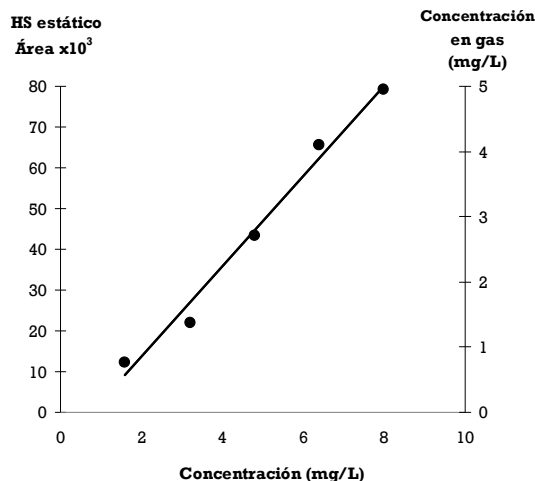
### 4.2.1. Análisis del espacio de cabeza estático

Las muestras de OJ (30 mL) se colocan en frascos de laboratorio graduado unidos a una tapa con una salida que permite el muestreo del espacio de cabeza. Las muestras se equilibran a temperatura ambiente y el espacio de cabeza pasa al APCI-MS a través de una línea de transferencia a 120 °C y con un flujo de 2.5 mL/min.

#### Recta de calibrado:

Las respuestas producidas por el detector (mV) se convierten en equivalentes de estándar en medio acuoso "Aqueous Standard Equivalents" (ASE). Se preparan diluciones patrón del compuesto a analizar a partir del compuesto puro disuelto en agua destilada, a partir de las cuales se obtuvieron las diluciones de calibración.

La cuantificación se realiza mediante calibración externa. Teniendo en cuenta el coeficiente de partición (aire/agua) del compuesto se construye la curva de calibración en el espacio de cabeza (mg/L en fase gaseosa).



**Figura 42.** Recta de calibrado del limoneno para APCI-MS estático

#### 4.2.2. Análisis del espacio de cabeza dinámico

El espacio de cabeza dinámico se mide con APCI-MS durante 5 minutos. 100 mL de OJ se colocan en frascos de laboratorio graduado con una tapa con dos salidas. Después del equilibrio de las muestras, se introduce N<sub>2</sub> por una de las salidas con un flujo de 70 mL/min para diluir el espacio de cabeza y el gas generado se introduce en el APCI-MS a un flujo de 10 mL/min.

Para evaluar la persistencia de los volátiles en dicho espacio de cabeza el perfil de datos obtenidos en los diferentes tiempos de medida fue normalizado a la intensidad de la señal del tiempo de partida (100%).

#### 4.2.3. Análisis *in-vivo*

Para el estudio de volátiles en el aire espirado se conecta el orificio nasal de los panelistas al APCI-MS mediante un pequeño tubo de plástico. Los panelistas ingieren 10 mL de muestra y deben respirar normalmente a través del tubo manteniendo la boca cerrada durante 1 minuto. El flujo de entrada al equipo fue 30 mL/min.

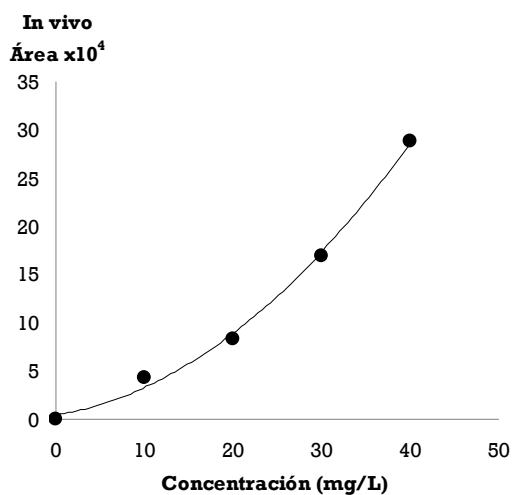


**Figura 43.** Ensayo APCI *in vivo*

Recta de calibrado:

Se preparan diluciones patrón del compuesto puro a analizar disuelto en agua a partir de las cuales se obtuvieron las más diluidas.

La cuantificación se realiza mediante calibración externa. Se construye la curva de calibrado a partir del aire espirado después del consumo de estas disoluciones (1 curva de calibrado por cada panelista).



**Figura 44.** Ejemplo de recta de calibrado del limoneno para APCI-MS *in vivo*

## 5. Pruebas sensoriales

### 5.1. Pruebas discriminativas:

En las pruebas discriminativas no se requiere conocer la sensación subjetiva que produce un alimento a una persona, sino que se desea establecer si hay diferencia o no entre dos o más muestras y, en algunos casos, la magnitud o importancia de esa diferencia (Larmond, 1985).

En este tipo de pruebas existen dos posibilidades:

- a) Técnica del “juicio forzado”, obligar a los jueces a que indiquen cuál de las muestras consideran diferente, incluso si no advierten diferencia alguna.
- b) Permitir las respuestas “no hay diferencia” o “no hay preferencia”.

Las pruebas discriminativas empleadas en esta tesis se explican a continuación.

#### - Prueba de comparación por parejas (ISO 5495-2005)

En esta prueba se presentan solamente dos OJs al juez y se le pide que las compare en cuanto a alguna característica sensorial. Los catadores han de responder a la pregunta contenida en un formulario y posteriormente se interpretan las respuestas recibidas.

Los catadores no deben disponer de información de las muestras que puedan sesgar los resultados. Los distintos pares de zumos se presentan en recipientes iguales y con la misma cantidad de producto. Los recipientes se identifican con números de tres cifras escogidos al azar.

Los zumos que constituyen un par se pueden presentar simultánea o sucesivamente para su valoración, pudiendo presentarse varios pares en la misma sesión (evitando siempre la fatiga sensorial). El orden de presentación debe ser equilibrado de modo que las combinaciones AB y BA aparecen el mismo número de veces y se distribuyen al azar entre los jueces. Estos prueban las muestras en el orden indicado.



**Figura 45.** Prueba de comparación por parejas

**- Prueba triangular (ISO 4120-2005)**

Esta prueba se aplica para determinar pequeñas diferencias entre los zumos. Las diferencias pueden afectar al conjunto de los atributos o a un atributo determinado de las muestra.

En esta prueba se presentan tres zumos al juez, de los cuales dos son iguales, y se le pide que identifique la muestra que es diferente (Larmond, 1985). Después se recogen las respuestas de los jueces y se interpretan.

Se prepara un número igual de grupos (el mayor posible), de acuerdo con las seis posibilidades de presentación siguientes:

ABB	BAA
AAB	BBA
ABA	BAB

Los catadores no deben disponer de información de las muestras que puedan sesgar los resultados como consecuencia de la forma en que éstas se presenten. Los grupos de muestras se preparan en recipientes iguales, con la misma cantidad de producto y la misma disposición. Los recipientes que contienen las muestras para la cata se identifican con números de tres cifras escogidos al azar.



**Figura 46.** Prueba triangular

#### **- Prueba de ordenación (ISO 8587:2006)**

Esta prueba permite apreciar diferencias entre varios zumos basándose en la intensidad relativa de un determinado atributo, característica o impresión global.

Se presentan varias OJs a los jueces de forma simultánea y en orden aleatorio y se les pide que las pongan en orden creciente o decreciente según un criterio especificado.

Las muestras deben prepararse de idéntica manera: recipientes y utensilios iguales, la misma cantidad de producto y la misma disposición. Los recipientes se identifican con una clave, utilizando números de tres dígitos escogidos al azar.



**Figura 47.** Prueba de ordenación

## **5.2. Prueba descriptiva**

Las pruebas descriptivas tratan de definir las propiedades del OJ y cuantificarlas de la manera más objetiva posible. Estas pruebas proporcionan mucha más información acerca del producto; sin embargo, son más difíciles de realizar, requieren entrenamiento por parte de los jueces y la interpretación de los resultados es ligeramente más laboriosa que los otros tipos de pruebas (Anzaldúa Morales, 1994).

En esta tesis se han llevado a cabo pruebas descriptivas relativas al color del zumo, realizando previamente el entrenamiento específico de los jueces. Éste se explica en profundidad en el Capítulo 3 de esta Memoria.

## **5.3. Ensayos hedónicos**

Los ensayos hedónicos aportan información muy valiosa sobre el mercado de consumo (preferencias y actitudes de los consumidores). Dentro de los ensayos hedónicos se han empleado las pruebas de preferencia y aceptación.

### **- Prueba de preferencia**

Preferencia es la expresión que señala la elección de un producto entre varios. Esta elección se mide directamente por comparación entre dos o más productos.

En esta tesis se ha utilizado el análisis de ranking de preferencia. Éste permite determinar si existe diferencia en la preferencia entre 3 o más productos

### **- Prueba de aceptación**

Estas pruebas se efectúan para evaluar simultáneamente más de dos productos, o bien para obtener más información sobre un producto. Se

cuantifica la preferencia de los consumidores, midiendo cuánto les gusta o les disgusta un OJ, es decir, el grado de satisfacción.

Para llevar a cabo las pruebas de aceptación se utilizan escalas hedónicas. Con ellas se miden las sensaciones placenteras o desagradables producidas por un alimento a quienes lo prueban.

Las escalas hedónicas pueden ser verbales o gráficas, y la elección depende de la edad de los jueces y del número de muestras a evaluar. En esta memoria se ha empleado la escala LAM.



## 6. Métodos estadísticos

Para el análisis de los datos obtenidos se han empleado los programas Statistica® vs. 8.0. (StatSoft Inc.: Tulsa, OK, 2007), Fizz Calculations software (Biosystemes, France), y XLStat (Version 2009.6.03, Addinsoft, USA)

### 6.1. Análisis descriptivo y exploratorio

La estadística descriptiva tiene como objetivo la descripción del colectivo estudiado, que puede ser toda la población (censo) o una parte de la misma (muestra) (Martín, 2001). Se calcula la media aritmética ( $\bar{X}$ ) y la desviación estándar, y se realizan representaciones gráficas tales como diagramas de barras, gráficos de líneas (para comparar dos variables) o “scatter plot” (para estudiar la relación entre dos variables).

### 6.2. Modelo Lineal General. Análisis de la Varianza (ANOVA)

En general, el propósito del Análisis de la Varianza (ANOVA) es encontrar diferencias significativas entre las medias comparando las varianzas de los grupos (Norman y Streiner, 1996). ANOVA es el análisis estadístico paramétrico de modelos lineales en los que intervienen dos variables: la variable dependiente (cuantitativa) y la variable independiente o factor (cualitativa). Estos factores actúan como criterios de clasificación de los datos y los distintos valores que pueden tomar se denominan niveles (Martín, 2001).

El valor del nivel de *significación estadística p* representa la probabilidad de error que implica aceptar como válido el resultado observado, es decir, representativo de la población.

En la aplicación del ANOVA se asume que las variables incluidas en la comparación presentan una distribución normal. Cuando los datos de la variable no se ajustan a una distribución normal, se utilizan pruebas no paramétricas, que constituyen una alternativa al ANOVA, como el test de Wilcoxon.

### **6.3. Pruebas no paramétricas: Prueba de Wilcoxon (Diferencias entre muestras)**

La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon es una prueba no paramétrica para comparar la mediana de dos muestras relacionadas y determinar si existen diferencias entre ellas. Se utiliza como alternativa a la prueba t de Student cuando no se puede suponer la normalidad de dichas muestras. Se utiliza cuando la variable subyacente es continua, pero no se presupone ningún tipo de distribución particular.

El procedimiento consiste en calcular las diferencias entre los datos de las muestras, ordenarlas en sentido creciente de su valor absoluto y calcular su rango. A continuación asignamos a cada rango el signo que tenía la diferencia correspondiente y comparamos la suma de los rangos de las diferencias negativas. Si ambas sumas son iguales aceptamos la hipótesis nula:

*H<sub>0</sub>: No hay diferencias entre las muestras.*

### **6.4. Análisis discriminante**

El Análisis Lineal Discriminante (SDA) es un método de clasificación en la estadística multivariante que tiene como objetivo determinar hasta qué punto es posible separar dos o más grupos de muestras previamente establecidos, y qué variables son las que mejor discriminan entre ellos (Johnson, 2000; Tabachnick y Fidell, 2007).

Para la ejecución del SDA es necesario una variable cualitativa (variable dependiente) y un conjunto de variables cuantitativas y/o cualitativas dicotómicas (variables independientes).

Su objetivo es encontrar la combinación lineal de las variables independientes que mejor permite diferenciar a los grupos. Esta clasificación se hará mediante unos criterios o propiedades comunes de los individuos, dados por las variables independientes. Así, la función discriminante

representa la mejor separación estadística entre los puntos, es decir, la máxima cantidad de varianza residual.

Uno de los métodos utilizados en el análisis discriminante es el procedimiento iterativo: las variables son añadidas (“forward”) o eliminadas (“backward”) de las funciones discriminantes una a una, realizando un estudio de discriminación después de cada paso. En el caso del método forward, cada inclusión viene determinada por el valor del estadístico F, que indica, para cada variable, su significación en la discriminación entre los grupos, de tal manera que se incluyen las variables que poseen un valor F superior al establecido en el análisis. De esta forma, el proceso concluye cuando no se da una discriminación significativamente mejor que la anterior.

En resumen, a partir de las variables originales, se establecen funciones que discriminan entre grupos previamente establecidos. Posteriormente, estas funciones pueden ser utilizadas en la clasificación de muestras de origen desconocido asumiendo el error correspondiente, que viene expresado por los propios porcentajes de clasificación correcta, o porcentajes de acierto, de las muestras utilizadas inicialmente en la obtención de las ecuaciones.

La correlación canónica es el valor atribuido a cada una de las funciones discriminantes extraídas. Ésta mide las desviaciones de las puntuaciones discriminantes entre grupos respecto a las desviaciones totales sin distinguir grupos. Si su valor es grande, próximo a 1, la dispersión será debida a la diferencia entre grupos y, por tanto, la función discriminará mucho (Martín, 2001).

### **6.5. Técnicas de regresión**

La regresión es un análisis estadístico que se utiliza para estudiar la relación entre una variable numérica  $Y$ , conocida como variable respuesta, en términos de otra u otras variables numéricas  $X_1, X_2, \dots, X_k$  conocidas como variables explicativas.

El modelo matemático general es de la forma:

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_k; \beta) + \varepsilon$$

Siendo:

$f$ : la relación que une la variable respuesta con las variables explicativas, y que dará predicciones de  $Y$  para valores dados de las variables explicativas.

$\varepsilon$ : el error de la predicción.

$\beta$ : uno o varios parámetros desconocidos que se calcularán a partir de las observaciones muestrales o datos de forma que se optimice el ajuste.

Si sólo hay una variable explicativa  $X$ , la regresión será simple, y cuando hay varias variables explicativas la regresión será múltiple.

- *Regresión simple:*

El modelo utilizado para representar este tipo de relación es:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$$

- *Regresión Múltiple:*

El propósito general de la regresión múltiple es estudiar la dependencia de una variable criterio o respuesta cuantitativa respecto a un conjunto de otras variables predictoras o explicativas, valoradas también cuantitativamente. Permite la predicción de valores para la variable dependiente en cada muestra, a partir de la combinación lineal de variables seleccionadas. El objetivo es encontrar los coeficientes de esta combinación que minimizan la suma de cuadrados residuales entre el valor predicho y el observado. El resultado de la aplicación de estas técnicas es una ecuación que representa la mejor recta de ajuste (la máxima correlación posible) entre las variables estudiadas, de la siguiente forma general:

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + \dots + B_K X_K + \varepsilon$$

### **6.6. Análisis estadísticos para las pruebas de comparación por parejas (ISO 5495:2005)**

En función del tipo de prueba que se haya realizado los datos se tratarán de la siguiente manera:

- Técnica del juicio forzado:

a) Para un modelo unilateral, se suma el número de respuestas que coinciden con la dirección supuesta por el organizador de la prueba y se compara el total con los valores de la Tabla 1a (Anexo B).

b) Para un modelo bilateral, se suman separadamente las respuestas que se refieren a una de las muestras y las que se refieren a la otra. El mayor valor obtenido se compara con los valores de la Tabla 1b (Anexo B).

Existe diferencia significativa entre las muestras, o preferencia significativa por una de ellas, si los valores obtenidos son mayores a los valores tabulados.

- Respuestas “no hay diferencia” o “no hay preferencia”, pueden tratarse éstas según uno de los dos criterios siguientes:

a) Descartarlas, es decir, restarlas del número total de respuestas proporcionadas en el grupo.

b) Agregar la mitad de ellas a cada una de las dos categorías de respuestas.

### **6.7. Análisis estadísticos para las pruebas triangulares (ISO 4120:2005)**

En función del tipo de prueba que se haya realizado los datos se tratarán de la siguiente manera:

- Opción del “juicio forzado”:

Se suma el número de respuestas correctas y se compara con el dato correspondiente (Tabla 2, Anexo B). Existe diferencia significativa entre las muestras, si el valor obtenido es mayor al tabulado.

- Respuestas “no hay diferencia”:

De acuerdo con el propósito de la prueba, se pueden tratar estas respuestas de manera diferente, por ejemplo:

a) descartarlas, es decir, restarlas del número total de respuestas proporcionadas por el grupo;

b) tenerlas en cuenta según uno de los criterios siguientes:

- agregar un tercio de ellas al número de respuestas correctas;
- agregarlas a las respuestas incorrectas;
- examinarlas a parte.

## 6.8. Análisis estadísticos de las pruebas de ordenación (ISO 8587:2006, )

### - Prueba de Friedman

Se aplica cuando el objetivo es establecer si las diferencias detectadas por los jueces son significativas.

En primer lugar se debe calcular el valor  $F$  de Friedman:

$$F = \frac{12}{JP(P+1)} (R_1^2 + R_2^2 + \dots + R_p^2) - 3J(P+1)$$

donde

$J$  = número de jueces

$P$  = número de muestras (o productos)

$R_1, R_2, \dots R_p$  son las sumas de las ordenaciones atribuidas al conjunto de muestras para los  $J$  jueces.

En segundo lugar, se comparará el valor  $F$  con los valores críticos de la Tabla 3 (Anexo B). Si  $F$  es igual o mayor que el valor crítico correspondiente al número de jueces, el número de muestras y el nivel de significación seleccionado  $\alpha = 0.05$  o  $\alpha = 0.01$ , puede concluirse que hay una diferencia significativa entre las muestras.

A medida que el número  $J$  de jueces es mayor,  $F$  sigue, aproximadamente una distribución  $\chi^2$  con  $(P-1)$  grados de libertad.

Cuando el número de productos  $P$  es mayor que 5. Los valores  $\chi^2$  con  $(P-1)$  grados de libertad aparecen indicados en la Tabla 4 (Anexo B).

**- Prueba de Fisher**

Cuando se ha demostrado estadísticamente con la prueba de Friedman la existencia de diferencias entre las muestras, se pueden identificar los pares de muestras que difieren significativamente entre sí, a partir de los valores de sus sumas de ordenaciones, utilizando un análogo de prueba de diferencias significativas de Fisher.

Siendo  $i$  y  $j$  dos muestras y  $R_i$  y  $R_j$  sus sumas de ordenaciones y, utilizando una aproximación normal las dos muestras serán diferentes si:

$$|R_i - R_j| \geq 1960 \sqrt{\frac{JP(P+1)}{6}} \text{ (nivel 0.05) siendo } 1960 = t_{0.025, \infty}$$

$$|R_i - R_j| \geq 2576 \sqrt{\frac{JP(P+1)}{6}} \text{ (nivel 0.01) siendo } 2576 = t_{0.0125, \infty}$$

**- Prueba de Page (para ver si la ordenación es correcta)**

Cuando las muestras tienen un orden natural derivado, por ejemplo una característica medible (proporción de determinados componentes, temperaturas, diferentes tiempos de almacenamiento, etc) debe utilizarse la

prueba de Page. Ésta, también se basa en las sumas de ordenaciones y para este caso particular es más potente que la prueba de Friedman.

Si  $r_1, r_2, \dots, r_p$  son las ordenaciones medias teóricas de las  $P$  muestras colocadas en el orden predeterminado, la hipótesis nula se establece:

$$H_0: r_1 = r_2 = \dots = r_p$$

La hipótesis alternativa sería:

$$H_1: r_1 \leq r_2 \leq \dots \leq r_p$$

Donde al menos una de estas desigualdades es cierta al nivel de probabilidad elegido.

Para probar esta hipótesis se calcula  $L$  y se compara éste con los valores críticos de la Tabla 5 (Anexo B).

$$L = R_1 + 2R_2 + 3R_3 + \dots + PR_p$$

Si  $L$  es igual o mayor que el valor crítico correspondiente al número de jueces, al número de muestras y al nivel elegido de  $\alpha = 0.05$  o de  $\alpha = 0.01$ , se concluye que el orden indicado por los jueces corresponde al orden predeterminado de las muestras.

Para casos no tabulados, calcular:

$$L' = \frac{12L - 3JP(P+1)^2}{P(P+1)\sqrt{J(P-1)}}$$

Este valor sigue aproximadamente la distribución estándar.

La hipótesis alternativa será aceptada si:

$$L' \geq 1645 \text{ (probabilidad 0.05)}$$

$$L' \geq 2326 \text{ (probabilidad 0.01)}$$



## **6.9. Análisis estadísticos aplicados en estudios de consumidores.**

### **- Clusters**

El Análisis de Clusters (o Análisis de Conglomerados) es una técnica estadística multivariante de clasificación. Su objetivo es ordenar objetos (personas, cosas, variables, etc.) en grupos (conglomerados o clusters) de forma que el grado de asociación/similitud entre miembros del mismo cluster sea más fuerte (cohesión interna del grupo) que el grado de asociación/similitud entre miembros de diferentes clusters (aislamiento externo del grupo). Cada cluster se describe como la clase a la que sus miembros pertenecen.

El análisis de cluster es un método que permite descubrir asociaciones y estructuras en los datos que no son evidentes a priori pero que pueden ser útiles una vez que se han encontrado. Los resultados de un Análisis de Clusters pueden contribuir a la definición formal de un esquema de clasificación tal como una taxonomía para un conjunto de objetos, a sugerir modelos estadísticos para describir poblaciones, a asignar nuevos individuos a las clases para diagnóstico e identificación, etc.

Existen diversas técnicas de análisis de Cluster, pero pueden agruparse en dos tipos: jerárquicos y no jerárquicos. En los primeros, los grupos se forman en pasos sucesivos y se pueden analizar en cada paso las distancias entre los grupos formados, que en el segundo se realiza una sola partición de los casos iniciales en un número concreto de grupos.

El análisis jerárquico es el más utilizado para identificar grupos de consumidores con distintos patrones de preferencia. Aplica un algoritmo que agrupa secuencialmente a los consumidores, de acuerdo a la distancia existente entre ellos. Así, inicialmente cada consumidor compone un cluster; luego los cluster se van uniendo de acuerdo a la distancia que existe entre ellos y un criterio de unión definido; la unión continúa hasta que se agrupan todos los consumidores.

**- Mapas de preferencias**

Los mapas de preferencia son un conjunto de herramientas para analizar, interpretar y cuantificar las preferencias de los consumidores hacia una serie de productos. Aportan información que permite:

- Identificar qué características sensoriales desean los consumidores de un producto.
- Obtener información sobre un nuevo tipo de producto.
- Definir qué modificaciones pueden hacerse a un producto para aumentar su aceptabilidad.
- Comparar un producto con la competencia.
- Identificar oportunidades para lanzar nuevos productos al mercado o diferenciarse de la competencia.
- Identificar segmentos del mercado que pueden estar interesados en un determinado producto.
- Tomar decisiones durante el desarrollo, la promoción y el mantenimiento de productos.

Se basan en relacionar datos de aceptabilidad y datos objetivos sobre las características sensoriales de los productos, tratándose por tanto, de un análisis de componentes principales efectuado sobre los datos de aceptabilidad.. Existen dos tipos de mapeos de preferencia, el mapa de preferencias interno (que hace énfasis en la aceptabilidad) y el externo (con énfasis en las características sensoriales).



## *Resultados y Discusión*





## **Capítulo 1: NUEVAS APORTACIONES A LA METODOLOGÍA INSTRUMENTAL PARA LA MEDIDA DEL COLOR EN ZUMO DE NARANJA.**

### **ANTECEDENTES**

La importancia del color en el OJ está ampliamente reconocida, ya que éste es el primer atributo que perciben y valoran los consumidores, además está relacionado con su composición nutricional y, por tanto, con la calidad del mismo.

Tradicionalmente, la evaluación del color del OJ se hacía por comparación con una gama de patrones de plástico de diferente coloración (Francis, 1995). Sin embargo, la necesidad de eliminar toda la subjetividad inherente a estas medidas condujo a la sucesiva aparición de aparatos diseñados para evaluar objetivamente el color del producto (Huggart y Wenzel, 1954; Huggart y Wenzel, 1955).

En las medidas instrumentales, el color de los objetos se expresa mediante coordenadas de color. Así, para la especificación objetiva del color existen hoy en día distintos tipos de instrumentos como colorímetros, espectrofotómetros y espectrorradiómetros.

Los colorímetros miden el color de fuentes de radiación primarias (que emiten luz propia) y secundarias (que reflejan o transmiten luz externa). Estos aparatos poseen filtros que conducen a la obtención directa de los valores triestímulo X, Y, Z de forma óptica, no matemática. Los espectrofotómetros, en cambio, miden la distribución espectral de medidas relativas de transmitancia o reflectancia de un objeto, a partir de la cual se puede calcular el color bajo distintas condiciones teóricas. Los valores triestímulo (X Y Z) obtenidos dependen del iluminante, de la geometría de la medida y del observador (Hutchings, 2011). Tanto la transmitancia como la reflectancia son propiedades relativas, intrínsecas al objeto, que no se modifican con la iluminación recibida

ni con el observador, hecho que sí ocurre con el color. Los espectrorradiómetros se diseñaron para la medida radiométrica de la distribución espectral de una fuente de radiación primaria o secundaria (Wyszecki y Stiles, 1982). El espectrorradiómetro tiene los mismos componentes que el espectrofotómetro con la excepción de la fuente de luz que, en este caso es externa al instrumento y, por tanto, variable. Los valores de estímulo se obtienen también matemáticamente.

Eagerman (1978) evaluó la adecuación de distintos tipos de metodologías para medir el color de los OJs, concluyendo que las medidas por transmisión de muestras de zumo no manipuladas no eran reproducibles. Hoy en día se acepta que las medidas por reflectancia son las más adecuadas (Meléndez-Martínez y col., 2005b).

Debido a la complejidad de la medida del color en alimentos translúcidos como el zumo, no existe un consenso claro sobre la metodología más adecuada que debe usarse (Meléndez-Martínez y col., 2005b). Sin embargo, actualmente, es la medida del color por espectrorradiometría la más utilizada dentro de la industria del zumo, por las posibilidades que ofrece para el control de calidad (Meléndez-Martínez y col., 2007) y por ser un método rápido y no destructivo.

Más recientemente, se ha comenzado a utilizar la digitalización y análisis de imagen para la medida instrumental del color (Antonelli y col., 2004). Esta metodología se basa en la adquisición de una imagen para su posterior análisis, del cual se puede obtener, no sólo el color total, sino también la apariencia del objeto. La utilización de una cámara digital calibrada bajo condiciones de iluminación determinadas permite la captura de imágenes con gran precisión, incluso en 3 dimensiones. Un sistema de medida digital registra el color en miles, incluso millones, de puntos en la muestra: cada píxel se registra como una medida independiente de color. Esto proporciona una información mucho más detallada sobre el color y la apariencia de la muestra. Así, la imagen digital puede ser usada para medir no sólo el color medio, sino también la distribución de color dentro de la muestra.

Independientemente del instrumento utilizado, es necesario definir las condiciones correctas en las que se realizan las medidas de color. Para este propósito la CIE recomienda una serie de iluminantes, observadores normales y espacios de color (CIEXYZ, CIELUV, CIELAB) (CIE 1991b), (CIE 1991a), (CIE 1978). Además otros parámetros como, la disposición de la muestra, la relación con la geometría del sistema, la intensidad de la fuente de luz, el espesor de la muestra, y la medida del blanco, tienen que ser considerados por su posible influencia en la medida instrumental (Meléndez-Martínez AJ, 2006; Gómez-Robledo et al., 2008). Estudios previos también han demostrado que el fondo y el entorno son factores que pueden influir en esta medida (Stinco y col., 2012).

Dada la exactitud que ofrece el análisis de imagen, se hace especialmente necesario el estudio de la influencia de estos factores. Además, este tipo de medida simula de una manera muy exacta la apreciación visual, donde está claro que pueden tener un notable efecto.

Los objetivos generales de este trabajo fueron:

1. aplicar la espectrorradiometría a la evaluación instrumental del color de los zumos de naranja comerciales (sección 1).
2. poner a punto la metodología de análisis de imagen en zumos de naranja (sección 2).
3. explorar las posibles relaciones entre las medidas instrumentales del color por espectrorradiometría y análisis de imagen en zumos de naranja (sección 3).



***SECCIÓN 1: Estudio del color de los zumos de naranja comerciales (espectrorradiometría) y utilidad de las coordenadas colorimétricas para su clasificación.***

**OBJETIVOS**

Los objetivos concretos planteados en esta primera parte fueron:

- Caracterizar colorimétricamente zumos de naranja comerciales mediante espectrorradiometría.
- Explorar la utilidad de la medida del color por espectrorradiometría para la clasificación de zumos de naranja según el proceso de elaboración.

**MUESTRAS**

Para la realización de este estudio se utilizaron 41 muestras de zumos de naranja comerciales, 15 de ellos procedentes de zumo a base de concentrado (ZC) y 26 procedentes de naranjas exprimidas (ZE). En este último grupo, 11 muestras eran de conservación a temperatura ambiente (ZEA) y 15 de conservación en refrigeración (ZER) (4°C). Como grupo test se emplearon 25 muestras de distinta procedencia, 15 de ZC y 10 ZE (5 ZEA y 5 ZER), adquiridos en un supermercado y conservados a temperatura ambiente o en refrigeración, según indicación del envase.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En primer lugar, se realizó la caracterización colorimétrica de los zumos usando un espectrorradiómetro CAS 140 B (Instrument System, Munich, Alemania). Para las mediciones se utilizaron cubetas de plástico de 10 mm de camino óptico. Se realizaron tres medidas consecutivas y se calcularon los parámetros CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h_{ab}$ ) y todas las diferencias de color ( $\Delta E^*_{ab}$ ) entre muestras.

Todos los zumos tuvieron valores positivos de  $a^*$  y  $b^*$ , situándose en la zona de amarillos anaranjados. Tanto los valores de  $a^*$ , como los de  $b^*$  son significativamente más bajos para el grupo ZC ( $7,28 \pm 2,21$  y  $63,32 \pm 2,44$ , respectivamente) que para ZE ( $11,61 \pm 2,20$ ,  $72,15 \pm 2,57$ ).

El análisis de la varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos ZE y ZC en todos los parámetros colorimétricos con excepción de la claridad ( $L^*$ ). Los ZC presentaron valores más bajos para el croma ( $C^*_{ab}$ ) y más altos para el tono ( $h_{ab}$ ), lo que indica que los zumos eran menos vivos y más amarillentos. Se calcularon las diferencias de color  $\Delta E^*_{ab}$  a partir de los valores medios de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para cada tipo de zumo siendo las diferencias de color entre ZC y ZE visualmente apreciables por cualquier consumidor, ya que presentaron un valor medio de  $\Delta E^*_{ab} = 9,87$  u., valores claramente por encima del umbral de discriminación visual.

Al objeto de comprobar si es posible diferenciar los zumos ZE según sus condiciones de conservación, se estudiaron los valores colorimétricos de las muestras ZEA y ZER. En este caso, las muestras de ZEA presentan valores ligeramente más bajos para las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  que las ZER, aunque la diferencia entre valores medios sólo fue significativa para la coordenada  $b^*$ . En los parámetros  $L^*$  y  $C^*_{ab}$ , también se encontraron diferencias entre los dos grupos, siendo las muestras ZEA más oscuras y más apagadas que las muestras ZER, lo que puede relacionarse con un tratamiento térmico más intenso en las primeras.

A partir de los parámetros colorimétricos obtenidos, se aplicó el Análisis Lineal Discriminante (SDA) con el objetivo de clasificar los zumos según su proceso de fabricación, empleándose el método de inclusión de variables "forward". Se realizó una primera clasificación entre todos los grupos de zumos (ZC, ZEA y ZER) considerando igual probabilidad "a priori" de que una muestra pueda pertenecer a un grupo u otro. Se estableció una tolerancia de 0,001 para eliminar variables que proporcionan información redundante. Las variables seleccionadas e incluidas en el modelo fueron  $L^*$  y  $C^*_{ab}$  y las ecuaciones de clasificación obtenidas fueron las siguientes:

$$z_{(ZC)} = -770.054 + 16.450 L^* + 3.342 C^*_{ab} \quad (1a)$$

$$z_{(ZER)} = -823.584 + 14.855 L^* + 5.984 C^*_{ab} \quad (1b)$$

$$z_{(ZEA)} = -766.216 + 14.271 L^* + 5.833 C^*_{ab} \quad (1c)$$

Los porcentajes de clasificación correcta en el caso de ZC y ZEA son del 100%, pero para las muestras de zumos exprimidos ZE, el porcentaje de clasificación disminuye al 73,33%. Finalmente, el porcentaje de clasificación correcta global es del 90,24%. La peor clasificación obtenida para los zumos ZER era previsible, ya que este grupo tiene un proceso de fabricación similar al ZEA, que hace que sean cromáticamente muy parecidos entre sí.

Al objeto de comprobar si es posible una mejor discriminación, realizamos un nuevo análisis, considerando sólo dos grupos ZC y ZE. En este caso las variables incluidas en el modelo fueron las mismas que en el caso anterior  $L^*$  y  $C^*_{ab}$ . Las ecuaciones de clasificación obtenidas fueron las siguientes:

$$z_{(ZC)} = -770.054 + 16.450 L^* + 3.342 C^*_{ab} \quad (2a)$$

$$z_{(ZE)} = -823.584 + 14.855 L^* + 5.984 C^*_{ab} \quad (2b)$$

En este supuesto, la totalidad de las muestras se clasificó correctamente (100% de aciertos para ambos grupos).

25 muestras de zumos comerciales, distintos de los usados para la obtención de los modelos se utilizaron para comprobar la validez de los mismos, midiendo su color por espectrorradiometría. En el caso de ZC se obtuvo una clasificación correcta en el 100% de los casos aplicando ambos modelos. Mientras que para los zumos exprimidos, se comprobó que la clasificación es totalmente correcta (100%) cuando no se pretende diferenciar entre ZEA y ZER, sin embargo cuando se intenta diferenciar entre estos dos tipos de zumos los porcentajes de acierto descienden a un 50%.

***SECCIÓN 2: Puesta a punto de la metodología para el análisis de imagen digital de los zumos de naranja y su evaluación visual. Influencia de las condiciones de medida.***

**OBJETIVO**

Los objetivos concretos planteados en esta sección fueron:

- Evaluar el efecto que el fondo, el entorno, el espesor y las diluciones del zumo tienen en las especificaciones del color analizado mediante análisis de imagen.
- Evaluar el efecto del fondo en el análisis visual del color de los OJs.
- Estudiar las correlaciones existentes entre el análisis visual y el análisis de imagen.

**MUESTRAS**

Un zumo comercial procedente de naranjas exprimidas, de alto contenido en pulpa, fue adquirido en un supermercado local y luego diluido con agua destilada para obtener diez niveles de concentración (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, y 10% de OJ), que podrían representar distintas coloraciones de zumos comerciales.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se eligió el sistema DigiEye (Luo y col., 2001) para la captura y el análisis de imágenes digitales. Se utilizaron tres entornos y 3 fondos diferentes: blanco, negro y gris ( $L^* = 50$ ). Además, para estudiar la influencia del espesor, las medidas de color se hicieron en una cubeta con un diámetro interno de 44.7 mm, que fue llenada con las muestras de OJ en tres volúmenes distintos (20, 45 and 70 mL) obteniendo tres niveles de espesor: 15, 30, y 40 mm.

Las diferencias de color se pueden calcular con distintas fórmulas matemáticas como CIELAB (CIE 1976), CIE94 (CIE 1995) o CIEDE2000 (CIE

2001) (Melgosa, 2000) pero, en este trabajo hemos decidido usar la fórmula CIELAB más habitual, que calcula las diferencias de color como la distancia euclídea entre dos puntos en el espacio 3-D definido por  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ :

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

*Influencia del entorno y el fondo en el análisis de imagen del OJ.*

Para estudiar el efecto real del entorno y el fondo en el análisis de color, se eligió el OJ 50%, por ser representativo de un zumo comercial típico y el espesor se fijó en 30 mm.

La influencia del entorno se evaluó comparando las diferencias de color que tenían lugar entre las medidas con entorno blanco/negro (SW/SB), blanco/gris (SW/SG), y negro/gris (SB/SG). La mayor diferencia de color ( $\Delta E_{ab}^*$ ) se observó en la comparación entre SW y SB, que variaron de 6,84 a 6,87 u. en los tres fondos utilizados. Las siguientes diferencias más acusadas correspondieron a las comparaciones entre SW y SG (4.70-5.08 u.). En ambos casos,  $\Delta E_{ab}^*$  fue mayor que el umbral de discriminación visual ( $\Delta E_{ab}^* > 3$  u. aproximadamente) según Martínez y col. (2001). Las diferencias de color más bajas se obtuvieron al comparar SB y SG, con diferencias de 1.85, 2.28 y 2.35 u. en fondo blanco, negro y gris, respectivamente. Estos resultados concuerdan con Stinco y col. (2012), donde también se estudió la influencia del entorno, pero en medidas realizadas por espectrorradiometría, concluyendo que las mayores diferencias se obtenían al comparar las medidas realizadas con entorno blanco y negro, sin embargo, los valores de  $\Delta E_{ab}^*$  fueron algo mayores.

Distintos autores han estudiado el efecto del fondo en las medidas colorimétricas de distintos alimentos y bebidas, concluyendo que el fondo tenía una influencia clara en las mismas (Meléndez-Martínez y col., 2005a; Sandusky y Heath, 1996; Stinco y col., 2012). Para estudiar este efecto, se consideraron de nuevo tres posibilidades: fondo blanco (BaW), fondo gris (BaG) y fondo negro (BaB). Las diferencias de color debidas al fondo resultaron menores que las

debidas al entorno. Las más altas se encontraron en la comparación entre BaW y BaB con valores de 2.72 a 2.99 u. usando los distintos entornos. Las siguientes diferencias se obtuvieron entre las medidas realizadas con BaG y BaW (2.30-1.75) y finalmente los menores valores de  $\Delta E^*_{ab}$  se encontraron al comparar las medidas en BaB y BaG, con un valor mínimo de 0.72 u. (SW) y un máximo de 1.00 unidad CIELAB (SG). Todas estas diferencias fueron menores que las debidas al entorno, por lo que parece que el efecto del fondo en el análisis de imagen del OJ, es menor.

Si se consideran las distintas diluciones, se observa que la influencia del entorno y el fondo se ve afectada por las distintas concentraciones del OJ. Así, las diferencias de color resultantes al comparar los entornos descendieron del zumo más diluido (10%) al más concentrado (100%), observándose además la misma tendencia sobre todos los fondos. Por ejemplo, OJ 10%, sobre BaW mostró valores  $\Delta E^*_{ab}$  de 10.45, 7.09, y 4.19 u. entre SB/SW, SG/SW, y SB/SG, respectivamente, mientras que en OJ 100%, las diferencias de color disminuyeron hasta 4.78, 3.62, y 1.24 u., respectivamente. Esto implica una reducción de alrededor del 50% en las diferencias de color.

En cuanto a las diferencias de color entre fondos, también presentaron un descenso según aumentaba la concentración de zumo, pero esta vez de una forma más acusada. Por ejemplo OJ 10% en SW, mostró diferencias de 11.38, 7.81, y 3.82 u. comparando BaW/BaB, BaG/BaW, y BaB/BaG, respectivamente, mientras que en OJ 100% las diferencias de color disminuyeron hasta 0.99, 0.41, y 0.37 u., respectivamente, lo que supuso una reducción de las diferencias de color en aproximadamente un 90%.

De acuerdo con los resultados obtenidos y considerando las recomendaciones de la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE) (2004) y también la bibliografía existente (Stinco y col., 2012), se selecciona el entorno gris ( $L^* = 50$ ) y el fondo blanco para las medidas siguientes.

### *Influencia de las diluciones y el espesor en el análisis de imagen del OJ*

Al estudiar el efecto que produce la dilución del OJ en los parámetros colorimétricos, se puede observar que cuanto más diluido está el zumo, mayores son los valores de claridad y tono. Esto significa que los zumos con más cantidad de pulpa y pigmentos dan lugar a OJ más rojizos y oscuros. Esta misma tendencia fue hallada por Stinco y cols. (2012) y Meléndez Martínez y cols. (2005a). Finalmente, en el caso del croma, se observó que el aumento de la concentración de OJ desde un 10 a un 40%, llevó a un aumento del croma pero, a partir de esta concentración este parámetro colorimétrico tendió a estabilizarse. Otros estudios, sin embargo, concluyeron que el croma incrementaba continuamente al aumentar la concentración de OJ (Meléndez-Martínez y col., 2005a; Stinco y col., 2012).

Se ha estudiado también el efecto del espesor en la medida colorimétrica. La claridad ( $L^*$ ) mostró valores menores cuando el espesor era mayor, y en los tres espesores estudiados, se vio que las diferencias en cuanto a claridad eran menores conforme la concentración de OJ aumentaba. Esto significó que el efecto del espesor se hizo prácticamente inexistente cuando la concentración del zumo fue del 100%. Teniendo en cuenta el croma, se observó la misma tendencia y a partir de concentraciones del 40% de OJ el efecto del espesor en esta coordenada disminuyó hasta valores de  $\Delta C^*_{ab}$  menores a 1 unidad CIELAB. Finalmente, en cuanto al tono, no hubo un efecto muy relevante debido al espesor. Otros autores también han estudiado el efecto del espesor de las muestras en las medidas colorimétricas pero en otros alimentos y bebidas (Bianchi y Fletcher, 2002; Gómez-Robledo y col., 2008). Se puede concluir que, aunque el efecto del espesor disminuye conforme las cantidades de pulpa y pigmentos aumentan, debido a una disminución de la translucidez del OJ, éste debe ser tenido en cuenta y fijado, al objeto de obtener medidas de color reproducibles mediante análisis de imagen.

### *Análisis visual*

El análisis visual se realizó en entorno gris ( $L^*=50$ ) y se eligieron de nuevo tres fondos (BaW, BaG, BaB) para ver la influencia de éstos. Las

evaluaciones visuales se realizaron utilizando 10 recipientes llenos con las muestras de OJ de forma que se conseguía un espesor de 30 mm (al igual que el segundo nivel elegido en las medidas instrumentales) y se evitaba que diferencias en el espesor afectaran a la percepción del color. Los recipientes fueron colocados en la cabina en orden aleatorio y los panelistas ( $n = 10$ ) tenían que ordenar las muestras en orden creciente de concentración de OJ.

Sólo se lograron dos ordenaciones completamente correctas cuando se utilizó fondo blanco y negro, y tres cuando se usó fondo gris. Cabe destacar que los principales errores de ordenación ocurrieron cuando las concentraciones de OJ eran mayores del 50%. Así, si sólo tuviéramos en cuenta las muestras 10, 20, 30, 40, y 50%, el porcentaje de ordenación correcta aumentaría hasta el 80% de los panelistas cuando se usa el fondo negro y al 90% cuando se usa fondo gris o blanco, lo que quiere decir que para los panelistas hubo mucha más dificultad en la discriminación entre muestras con mayor concentración de OJ.

Estos resultados podrían explicarse por los diferencias de color entre las muestras consecutivas, medidas en cada fondo, que presentaron un descenso importante a partir de los pares 40-50% y 50-60%, hasta el par 90-100%.

En cualquier caso, analizando estadísticamente el conjunto de datos obtenidos con el test de Page (ISO 8587:2006), con todos los fondos se obtuvieron ordenaciones significativamente correctas ( $p < 0.05$ ). El hecho de que no existan diferencias importantes entre los fondos estudiados podría explicarse con los resultados instrumentales discutidos previamente, que mostraban que las diferencias de color entre los fondos eran menores que el umbral de diferenciación visual considerado en la mayoría de las muestras y además, se observaba la misma tendencia en todos los fondos.

#### *Correlación visual-instrumental*

Los datos visuales se correlacionaron con los instrumentales mediante una regresión polinomial, por ser la que presentaba el mejor ajuste. Como variable dependiente se consideró la “suma de rangos” (RS) (correspondiente al orden que otorgaron los panelistas) y como independientes, los parámetros



colorimétricos ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$ , and  $h_{ab}$ ) obtenidos en los diferentes fondos. El croma no presentó una buena correlación en ninguno de los fondos estudiados (los valores de  $R^2$  fueron 0.61, 0.55 y 0.56 con BaB, BaG y BaW, respectivamente). En cuanto a las otras coordenadas colorimétricas, el tono correlacionó muy bien con el orden dado por los jueces en todos los fondos ( $R^2 = 0.99$ ), y la claridad presentó la correlación más alta cuando se utilizó el fondo blanco ( $R^2 = 0.98$ ).

También se realizó el análisis de regresión múltiple entre los datos instrumentales y visuales (RS) obteniendo correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) en todos los casos:

Fondo negro:

$$RS = -22.553 + 1.235L^* + 7.786a^* - 0.296b^*; \quad R^2=0.993$$

$$RS = 909.09 - 0.519L^* - 1.406C^*_{ab} - 8.310h_{ab}; \quad R^2=0.990$$

Fondo gris:

$$RS = -570.84 + 10.339L^* + 10.999a^* - 1.608b^*; \quad R^2=0.990$$

$$RS = 655.21 + 10.317L^* - 3.659C^*_{ab} - 12.260h_{ab}; \quad R^2=0.997$$

Fondo blanco:

$$RS = 194.94 - 2.181L^* + 7.134a^* - 0.120b^*; \quad R^2=0.984$$

$$RS = 681.70 + 7.883L^* - 0.753C^*_{ab} - 12.864h_{ab}; \quad R^2=0.988$$

### SECCIÓN 3: Correlación Espectrorradiometría - Análisis de Imagen digital

#### OBJETIVO

Los objetivos concretos planteados en esta sección fueron:

- Caracterizar colorimétricamente los zumos de diferentes variedades de naranjas y mandarinas mediante dos métodos instrumentales diferentes, espectrorradiometría y análisis de imagen, en las mismas condiciones de medida.
- Estudiar las correlaciones existentes entre los parámetros colorimétricos obtenidos por ambas metodologías.

#### MUESTRAS

Para la realización de este estudio se utilizaron 22 variedades de naranjas y 7 variedades de mandarinas cultivadas en España correspondientes a la campaña 2010-2011. A partir de las frutas se obtuvieron los zumos utilizando un exprimidor doméstico Clatronic Modelo ZP3066, International GMBH, (Alemania). Las variedades analizadas se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 7.** Variedades de naranjas y mandarinas analizadas

<b>Mandarinas</b>		<b>Naranjas</b>	
<b>M1</b>	Orogranue	<b>V1</b>	Nave late
<b>M2</b>	Beatriz	<b>V2</b>	Fukumoto
<b>M3</b>	Prenules	<b>V3</b>	Fisher
<b>M4</b>	Loretina	<b>V4</b>	Navel Foyos
<b>M5</b>	Clemen Rubí	<b>V5</b>	Cadenera
<b>M6</b>	Miro Coppola	<b>V6</b>	Salustiana
<b>M7</b>	Arrufatina	<b>V7</b>	Amberweelt
		<b>V8</b>	Navel Cara Cara
		<b>V9</b>	Pera
		<b>V10</b>	Navel Powell
		<b>V11</b>	Shamoutti
		<b>V12</b>	Navel Barnfield
		<b>V13</b>	Rhode Summer
		<b>V14</b>	Nave late
		<b>V15</b>	Navel Lane Late
		<b>V16</b>	Navel Chislett
		<b>V17</b>	Sanguinelli
		<b>V18</b>	Valencia Midnight
		<b>V19</b>	Rhode Late
		<b>V20</b>	Valencia Delta
		<b>V21</b>	Barberina
		<b>V22</b>	Hamlin

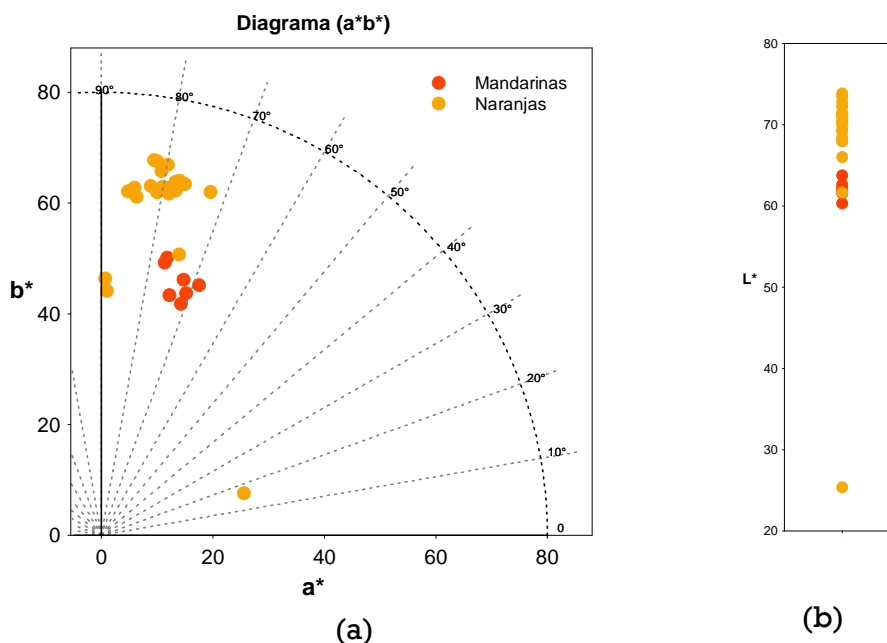
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El color de los zumos se midió en un espectrorradiómetro CAS 140 B (Instrument Systems, Munich, Alemania). Para las medidas se utilizaron botes de cultivo de 75 mL de capacidad (48 x 74 x 29 mm).

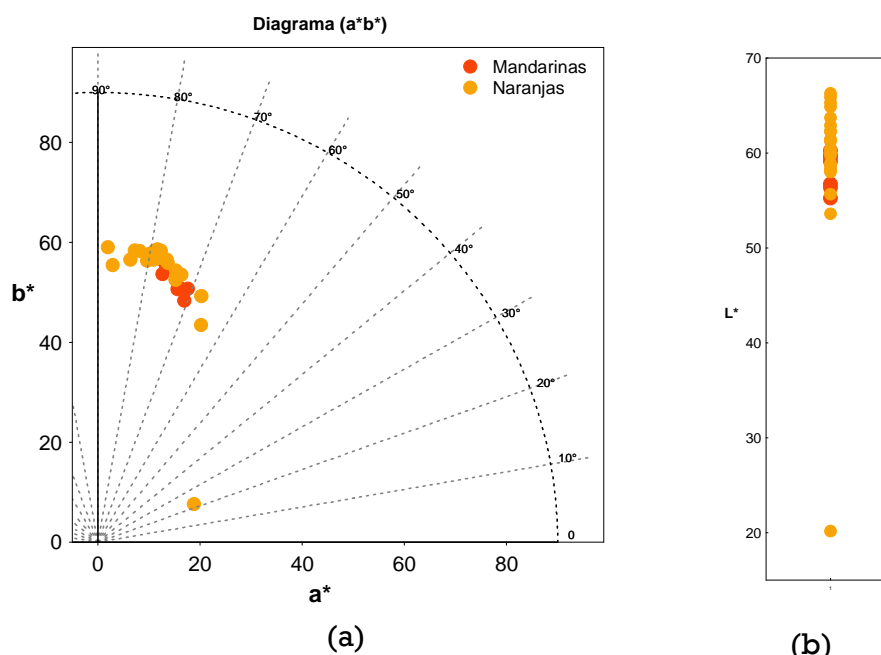
El análisis de imagen digital se realizó con un sistema DigiEye (Luo y col., 2001). Para este tipo de mediciones, las muestras fueron colocadas en botes de cultivo iguales a los utilizados en espectrorradiometría.

Se realizaron tres medidas consecutivas y se calcularon los parámetros CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h_{ab}$ ).

En las figuras 48 y 49 se muestra la distribución de los OJs y zumos de mandarinas de diferentes variedades analizados por espectrorradiometría y por análisis de imagen en el diagrama de color ( $a^*b^*$ ). Se observa que todos los zumos se localizan en el primer cuadrante, correspondiente a valores positivos de  $a^*$  y  $b^*$ , en la zona de los amarillos anaranjados. En cuanto a las medidas por espectrorradiometría, los dos grupos de zumos aparecen bien diferenciados a excepción de algunas variedades de naranjas que se encuentran más dispersas, mientras que por análisis de imagen, esta separación no es tan apreciable.



**Figura 48.** Localización de las muestras en el diagrama: (a) en el plano  $a^*b^*$  y (b) en valores de  $L^*$ , analizados por espectrorradiometría



**Figura 49.** Localización de las muestras en el diagrama: (a) en el plano  $a^*b^*$  y (b) en valores de  $L^*$ , por análisis de imagen digital.

Al comparar los parámetros colorimétricos obtenidos por los dos métodos, los resultados de la claridad obtenidos por espectrorradiometría mostraron una separación definida entre todas las variedades de mandarina (más oscuras) y las variedades de naranja (más claras), a excepción de las variedades Navel Cara Cara y Sanguinelli que resultaron tener zumos más oscuros (Figura 48). Sin embargo, cuando se determinaron por análisis de imagen, esta separación con respecto a  $L^*$  no fue tan evidente (Figura 49). En lo que respecta al croma, el zumo menos cromático fue el OJ de variedad Sanguinelli por ambas metodologías. Seguida de ésta se encuentran los zumos de mandarina y de algunas variedades de naranja, no produciéndose una separación clara entre ambos grupos con ninguna de las metodologías utilizadas. En cuanto al tono, medido por espectrorradiometría, se observa una agrupación entre los dos tipos de muestras, a excepción de nuevo de la variedad Sanguinelli que, con un tono de  $17^\circ$ , presenta una coloración atípica, al poseer un alto contenido de antocianos, pigmentos responsables de su color rojo.

De forma general los zumos de mandarina fueron más oscuros, menos vivos y más anaranjados y, entre los zumos de naranja, las variedades Fukumoto y Nave Late presentaron los tonos más altos, es decir fueron las más amarillentas en las mediciones realizadas por ambos métodos.

Con el fin de evaluar la relación existente entre las medidas realizadas por diferentes metodologías, se determinaron las correlaciones simples entre los parámetros colorimétricos  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*_{ab}$  y  $h_{ab}$ . La siguiente tabla muestra los coeficientes de correlación obtenidos.

**Tabla 8.** Coeficientes de correlaciones simples.

	<i>r</i>
$L^*$	0.9430
$a^*$	0.9335
$b^*$	0.8515
$C^*_{ab}$	0.7858
$h_{ab}$	0.9790

Al evaluar la relación entre las dos metodologías se observó que todas las correlaciones eran significativas ( $p < 0.05$ ), siendo el croma el parámetro colorimétrico con la correlación más baja ( $r = 0.79$ ), mientras que las mejores correlaciones se observaron en el tono ( $r = 0.98$ ). Finalmente, la claridad también presentó un coeficiente de correlación muy elevado ( $r = 0.94$ ).

Las diferencias entre los métodos se deben fundamentalmente a que el cálculo de las coordenadas de color es diferente en ambas metodologías. El análisis de imagen implica la transformación de la imagen en coordenadas RGB y luego en las coordenadas CIELAB utilizando modelos matemáticos, mientras que la espectrorradiometría utiliza la distribución espectral de energía radiante visible completa y, a partir de ésta se obtienen matemáticamente las coordenadas CIELAB.

## CONCLUSIONES

Las conclusiones finales de este capítulo se pueden concretar en las siguientes:

- La espectrorradiometría permite caracterizar colorimétricamente el zumo de naranja de una manera rápida y eficaz, ofreciendo la posibilidad de discriminar los zumos comerciales según distinto procesado a partir de las coordenadas colorimétricas.
- Tanto espectrorradiometría como análisis de imagen permiten definir colorimétricamente zumos procedentes de distintas variedades de naranja y mandarina.
- Existe una correlación significativa entre los parámetros colorimétricos determinados por espectrorradiometría y análisis de imagen.
- El fondo, el entorno y el espesor afectan a la medida del color realizada mediante análisis de imagen. Se sugiere utilizar el entorno gris ( $L^* = 50$ ) y el fondo blanco para la realización de las medidas colorimétricas por análisis de imagen, como recomienda la CIE y de acuerdo con la bibliografía existente,
- La evaluación visual del color del zumo correlaciona significativamente ( $p < 0.05$ ) con las medidas instrumentales en todos los fondos usados.



## Estudio preliminar sobre la utilidad del color para clasificar los zumos de naranja según su elaboración

### Preliminary study on the utility of colour to classify orange juices attending to their processing

Rocío Fernández-Vázquez<sup>(S)</sup>, Carla C. Stinco, María L. Escudero-Gilete, Antonio J. Meléndez-Martínez, Francisco J. Heredia<sup>(S)</sup>, Isabel M. Vicario<sup>(\*)</sup>

Laboratorio de Color y Calidad de Alimentos. Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla, Spain.

(\*)Email: vicario@us.es

S: miembro de SEDOPTICA / SEDOPTICA member

Recibido / Received: 02/09/2010. Versión revisada / revised versión: 08/10/2010. Aceptado / Accepted: 09/10/2010

#### RESUMEN:

En este trabajo se caracteriza el color de los zumos de naranja comerciales y se explora la utilidad de las coordenadas cromáticas CIELAB para clasificarlos según el proceso de elaboración. 41 muestras de zumos comerciales 15 de ellos procedentes de zumo a base de concentrado (ZC) y 26 procedentes de naranjas exprimidas (ZE) fueron analizadas por espectrorradiometría. Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros colorimétricos ( $p < 0,05$ ) excepto para la coordenada  $L^*$ . Los zumos procedentes de concentrado (ZC) presentaron un valor medio de croma de  $63,78 \pm 2,36$  y de tono  $83,42 \pm 2,10$ , mientras que los zumos procedentes de naranjas exprimidas (ZE) presentaron mayores valores de croma ( $C_{ab}^* = 73,11 \pm 2,62$ ) y menores de tono ( $h_{ab} = 80,87^\circ \pm 1,68^\circ$ ). Con el objetivo de determinar qué variables permiten clasificar los zumos según su proceso de fabricación, se realizó un análisis discriminante. Las mejores predicciones se obtuvieron para los modelos que incluían las variables  $L^*$  y  $C_{ab}^*$ . La aplicación de las funciones discriminantes obtenidas a un set de 25 muestras de test, produjo un porcentaje de acierto del 100%.

**Palabras clave:** Espectrorradiometría, CIELAB, Croma, Tono, Análisis Discriminante.

#### ABSTRACT:

In this study the colour of commercial orange juices has been characterized and the utility of CIELAB colour coordinates to classify them according to their processing has been investigated. 41 samples of commercial orange juices, 15 from concentrate (ZC) and 26 from squeezed oranges (ZE) were analyzed by spectroradiometry. Significant differences were obtained in all colorimetric parameters ( $p < 0.05$ ) except for the coordinate  $L^*$ . Juices made from concentrate (ZC) showed an average value for chrome of  $63.7 \pm 2.36$  and for hue  $83.42 \pm 2.10$ , while squeezed orange juices (ZE) showed higher chrome values ( $C_{ab}^* = 73.11 \pm 2.62$ ) and lower hue values ( $h_{ab} = 80.87^\circ \pm 1.68^\circ$ ). Discriminant analysis was performed with the aim of selecting the variables which allows the classification of the juices according to their manufacturing process. The best predictions were obtained for the models which included  $L^*$  and  $C_{ab}^*$  variables. The application of the discriminant functions to a set of 25 juices, resulted in a 100% of correct classifications.

**Key words:** Spectroradiometry, CIELAB, Chrome, Hue, Discriminant Analysis.

#### REFERENCIAS Y ENLACES

- [1] R.L. Rouseff, P. Ruiz Pérez Cacho, F. Jabalpurwala, "Historical review of citrus flavor research during the past 100 years", *J. Agric. Food Chem.* **57**, 8115–8124 (2009).



- [2] A. J. Meléndez-Martínez, I. M. Vicario, F. J. Heredia, “El color del zumo de naranja. II. Aspectos físicos”, *Alim. Eq. y Tecn.* **23** (186), 103-106 (2004).
- [3] H. S. Lee, “Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara Cara)”, *J. Agr. Food Chem.* **49**, 2563-2568 (2001).
- [4] I. Stewart, “Provitamin A and carotenoid content of citrus juices”, *J. Agr. Food Chem.* **25**, 1132-1137 (1977).
- [5] S. Nagy, C. S. Chen, P. E. Shaw, *Fruit Juice Processing Technology*, Agscience, Auburndale, FL (1993).
- [6] A. Casas, D. Mallent, “El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, de la variedad y de la temperatura”, *Rev Agroquim Tecnol Aliment* **28**, 184-202 (1988).
- [7] H. S. Lee, G. A. Coates, “Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments”, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol.* **36**, 153-156 (2003).
- [8] I. M. L. B. Ávila, C. L. Siva, “Modeling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree”, *J. Food Eng.* **39**, 161-166 (1999).
- [9] E. R. Farnworth, M. Lagace, R. Couture, V. Yaylayan, B. Stewart, “Thermal processing, storage conditions, and the composition and physical properties of orange juice”, *Food Res. Int.* **34**, 25-30 (2001).
- [10] A. J. Meléndez-Martínez, I. M. Vicario, F. J. Heredia, “Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: effect of the background”, *Food Qual. Prefer.* **16**, 471-478 (2005).
- [11] A. J. Meléndez-Martínez, I. M. Vicario, F. J. Heredia, “Rapid assessment of vitamin A activity through objective color measurements for the quality control of orange juices with diverse carotenoid profiles”, *J. Agr. Food Chem.* **55**, 2808-2815 (2007).
- [12] F. J. Heredia, M. J. Diez, A. Terrab. “Caracterización cromática de mieles de Marruecos por reflectancia difusa y colorimetría triestimulo: espacios de color uniforme y no uniforme”, *Food Sci. Technol. Int.* **8**, 189-195 (2002).
- [13] F. J. Heredia, M. L. Escudero-Gilete, D. Hernanz, B. Gordillo, A. J. Meléndez-Martínez, I. M. Vicario, M. L. González-Miret, “Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration”, *Food Chem.* **118**, 377-383 (2010).
- [14] B. Gordillo, M. I. López-Infante, P. Ramírez-Pérez, M. L. González-Miret, F. J. Heredia, “Influence of prefermentative cold maceration on the color and anthocyanic copigmentation of organic Tempranillo wines elaborated in a warm climate”, *J. Agric. Food Chem.* **58**, 6797-6803 (2010).
- [15] F. J. Heredia, C. Álvarez, M. L. González-Miret, A. Ramírez, *CromaLab, Reg Gral Prop Int SE-1052-04*, Sevilla, Spain (2004).
- [16] Commission Internationale de l’Eclairage (CIE), *Colorimetry*, Publication CIE 15:2004 (CIE: Vienna, 2004)
- [17] StatSoft Inc. *STATISTICA (data analysis software system)*. Version 8. www.statsoft.com (2007).
- [18] J. N. Miller, J. C. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4ª Ed., Prentice-Hall, Madrid (2002).

## 1. Introducción

El zumo de naranja se encuentra entre los zumos de frutas más populares y de mayor consumo a nivel mundial [1], debido en gran parte a sus agradables propiedades organolépticas. Entre los atributos de calidad apreciados por el consumidor se encuentra el color, que, según diversos estudios, influye en su aceptación por parte del consumidor, por lo que el interés por la evaluación instrumental y sensorial de este atributo ha crecido considerablemente [2]. Por ejemplo, en los Estados Unidos, el color de los zumos de naranja es uno de los parámetros evaluados para la clasificación comercial del producto en relación a su calidad. El Departamento

de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) asignó 40 puntos a una escala de color, para la clasificación comercial del zumo de naranja. Así, un zumo de nivel A debe tener una puntuación de color entre 36 y 40 puntos, mientras un zumo de nivel B tendrá una puntuación de entre 32 y 35 [3,4].

El color de los zumos de naranja se debe, mayoritariamente a su contenido en pigmentos carotenoides, siendo la  $\beta$ -criptoxantina el carotenoide que aporta el color naranja brillante, muy deseable por el consumidor [5]. Entre los factores que afectan a este atributo se encuentran: el estado de madurez de las naranjas, la especie, la

variedad o el clima [6]. Por otro lado, el tratamiento térmico, al que se someten los zumos en la industria para prolongar su estabilidad, provoca cambios en el color [7] por lo que se ha propuesto su medida como un indicador de la degradación durante el proceso térmico de algunas frutas [8]. Actualmente, existe en el mercado una amplia oferta de zumos de naranja, que en todos los casos han sufrido un tratamiento térmico más o menos severo. Así, según su elaboración se encuentran dos grandes grupos, los zumos procedentes de concentrado (ZC) y los zumos procedentes de naranjas exprimidas (ZE). Dentro de este último grupo podemos distinguir, a su vez, los de conservación a temperatura ambiente (ZEA) o en refrigeración (ZER). En todos los casos, el tratamiento térmico que sufren los zumos para alargar su vida útil, disminuye notablemente la actividad vitamínica y deteriora su flavor, aroma y color [7,9].

Es por ello que, la medida del color dentro de la industria del zumo es de gran utilidad, por ser un método rápido y no destructivo. La Colorimetría Triestímulo es una herramienta habitual en el control de calidad de los alimentos, su utilidad se ha demostrado por ejemplo en la estimación del contenido en provitamina A en zumos de naranja [10,11], en la caracterización de mieles [12] y en la evaluación de la calidad y la estabilidad del color del vino [13,14].

Los objetivos de este trabajo han sido: caracterizar colorimétricamente los zumos comercializados en España y explorar la utilidad del color para diferenciarlos según el tratamiento tecnológico al que han sido sometidos.

## 2. Materiales y métodos

### 2.a. Muestras

Para la realización de este estudio se utilizaron 41 muestras de zumos de naranja comerciales, 15 de ellos procedentes de zumo a base de concentrado (ZC) y 26 procedentes de naranjas exprimidas (ZE). En este último grupo, 11 muestras eran de conservación a temperatura ambiente (ZEA) y 15 muestras de conservación en refrigeración (ZER) (4°C).

Como grupo test se emplearon 25 muestras de distinta procedencia, 15 de ZC y 10 ZE (5 ZEA y 5 ZER), adquiridos en un supermercado y

conservados a temperatura ambiente o en refrigeración, según indicación del envase.

### 2.b. Medida de color

Las medidas de color de las muestras se hicieron por reflexión usando un espectrorradiómetro CAS 140 B (Instrument System, Munich, Alemania) equipado con una sonda Top 100 (Instrument System, Munich, Alemania) y un zoom Tamron mod. SP23 (Commack, Estados Unidos) acoplado a una estación de recogida de datos IS-Specwin (Instrument System, Munich, Alemania). Se utilizó un iluminante D65, y observador 10° como referencia. Los datos se procesaron con el programa informático CromaLab® [15].

Se realizaron tres medidas consecutivas y se calcularon los parámetros CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}^*$ ) y las diferencias de color ( $\Delta E_{ab}^*$ ) entre muestras [16].

### 2.c. Análisis de datos

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y Análisis Lineal Discriminante (SDA) con el programa Statistica 8 [17]. Para el SDA, a partir de los parámetros colorimétricos obtenidos y, con el objetivo de clasificar los zumos según su proceso de fabricación se empleó el método *forward* de inclusión de variables. Las funciones de discriminación obtenidas para grupos previamente establecidos, fueron aplicadas posteriormente a muestras de origen desconocido, asumiendo el error correspondiente, que viene expresado por los propios porcentajes de clasificación correcta de las muestras utilizadas inicialmente en la obtención de las ecuaciones [18].

## 3. Resultados y discusión

En la Fig. 1(a) se muestra la distribución de los zumo en el diagrama de color ( $a^*b^*$ ). Se observa que todos los zumos se localizan en el primer cuadrante, correspondiente a valores positivos de  $a^*$  y  $b^*$ , en la zona de los amarillos anaranjados. Los dos grupos, aparecen bien diferenciados. Tanto los valores de  $a^*$ , como los de  $b^*$  son significativamente más bajos para ZC ( $7,28 \pm 2,21$  y  $63,32 \pm 2,44$ , respectivamente) que para ZE ( $11,61 \pm 2,20$ ,  $72,15 \pm 2,57$ ), lo que indica que los ZC presentan menos colorido que los ZE.

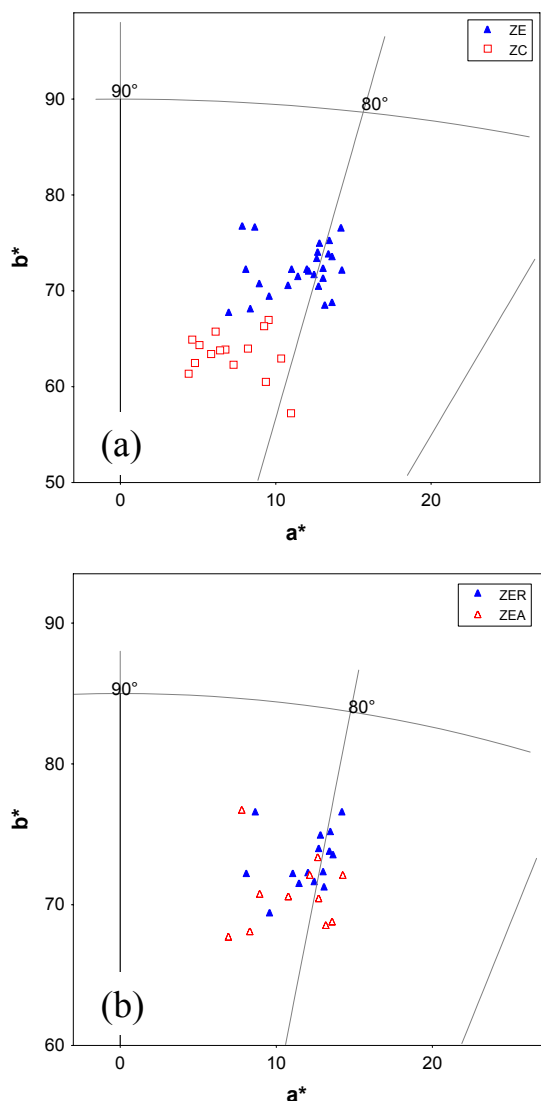


Fig. 1. Diagrama de color ( $a^*, b^*$ ) incluyendo las líneas de tono ( $h_{ab}$ ) para los zumos (a) ZC y ZE y (b) ZEA y ZER.

En la Tabla I se muestra el valor medio de las coordenadas cromáticas de los zumos, y sus desviaciones estándar. Se observan diferencias significativas en todos los parámetros ( $p < 0,05$ ) excepto para la coordenada  $L^*$ . Los ZC presentan valores significativamente ( $p < 0,05$ ) más bajos para el croma ( $C^*_{ab}$ ), es decir, son más pardos que las muestra de ZE.

Se calcularon las diferencias de color  $\Delta E^*_{ab}$  a partir de los valores medios de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  para cada tipo de zumo siendo las diferencias de color entre ZC y ZE visualmente apreciables por cualquier consumidor, ya que tienen un valor medio de  $\Delta E^*_{ab} = 9,87$  unidades CIELAB, muy superior a las 5,6 consideradas el límite para una tolerancia normal en este tipo de muestras [10].

TABLA I  
Parámetros cromáticos de los ZE y ZC.  
(Media  $\pm$  Desv. Est).

	ZE	ZC
$L^*$	$79,62 \pm 2,38^a$	$80,54 \pm 2,36^a$
$a^*$	$11,61 \pm 2,20^a$	$7,27 \pm 2,21^b$
$b^*$	$72,15 \pm 2,56^a$	$63,32 \pm 2,44^b$
$C^*_{ab}$	$73,11 \pm 2,62^a$	$63,78 \pm 2,36^b$
$h_{ab}$	$80,87^\circ \pm 1,68^\circ a$	$83,42^\circ \pm 2,10^\circ b$

Valores con distinto superíndice en la misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

TABLA II  
Parámetros cromáticos de los ZER y ZEA.  
(Media  $\pm$  Desv. Est)

	ZE	
	ZER	ZEA
$L^*$	$80,7 \pm 2,12^a$	$77,92 \pm 1,55^b$
$a^*$	$12,00 \pm 1,87^a$	$11,06 \pm 2,59^a$
$b^*$	$73,15 \pm 2,04^a$	$70,80 \pm 2,67^b$
$C^*_{ab}$	$74,15 \pm 2,12^a$	$71,70 \pm 2,67^b$
$h_{ab}$	$80,69^\circ \pm 1,37^\circ a$	$81,12^\circ \pm 2,07^\circ a$

Valores con distinto superíndice en la misma fila difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

Al objeto de comprobar si es posible diferenciar los zumos ZE según sus condiciones de conservación, se representan las muestras ZEA y ZER en el diagrama de color ( $a^*, b^*$ ) (Fig. 1(b)). En este caso, las muestras no aparecen tan claramente agrupadas como en el caso anterior. Las muestras de ZEA presentan valores ligeramente más bajos para las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  que las ZER, aunque la diferencia entre valores medios sólo es significativa para la coordenada  $b^*$  ( $11,06 \pm 2,59$  vs  $12,00 \pm 1,87$ ,  $70,80 \pm 2,67$  vs.  $73,15 \pm 2,04$ , respectivamente).

En la Tabla II se muestran las coordenadas de color para estos dos grupos. Los zumos presentan diferencias significativas para las coordenadas  $L^*$  y  $C^*_{ab}$ . Las muestras de ZEA son más oscuras y más apagadas que las muestras ZER, lo que puede relacionarse con un tratamiento térmico más intenso en las primeras [5]. En este caso la diferencia de color entre valores medios estaría dentro del rango establecido para un observador con una tolerancia normal (2.8-5.6), ya que presenta un  $\Delta E^*_{ab} = 3,88$  unidades CIELAB [10].

Mediante SDA, se realizó una primera clasificación entre todos los zumos (ZC, ZEA y ZER) considerando “a priori” igual probabilidad de que una muestra pueda pertenecer a un grupo u

otro. Se estableció una tolerancia de 0,001 para eliminar variables que proporcionan información redundante. Las variables seleccionadas e incluidas en el modelo fueron  $L^*$  ( $F=17,92$ ;  $\lambda$  de Wilks =  $4 \times 10^{-6}$ ) y  $C^*_{ab}$  ( $F=115,45$ ,  $\lambda$  de Wilks = 0,00). Las ecuaciones de clasificación obtenidas fueron las siguientes:

$$z_{(ZC)} = -770,054 + 16,450L^* + 3,342C^*_{ab}, \quad (1a)$$

$$z_{(ZER)} = -823,584 + 14,855L^* + 5,984C^*_{ab}, \quad (1b)$$

$$z_{(ZEA)} = -766,216 + 14,271L^* + 5,833C^*_{ab}. \quad (1c)$$

Como se observa en la Tabla III, los porcentajes de clasificación correcta en el caso de ZC y ZEA son del 100%, pero para las muestras de zumos exprimidos ZE, el porcentaje de clasificación disminuye al 73,33%. Finalmente, el porcentaje de clasificación correcta global es del 90,24%. La peor clasificación obtenida para los zumos ZER era previsible, ya que este grupo tiene un proceso de fabricación similar al ZEA, que hace que sean cromáticamente muy parecidos entre sí, de esta forma el 17% de los zumos ZER son clasificados como ZEA.

Al objeto de comprobar si es posible una mejor discriminación, realizamos un nuevo análisis, considerando sólo dos grupos ZC y ZE. En este caso las variables incluidas en el modelo fueron las mismas que en el caso anterior  $L^*$  ( $F=27,36$ ,  $\lambda$  de Wilks =  $1 \times 10^{-6}$ ) y  $C^*_{ab}$  ( $F=234,17$ ,  $\lambda$  de Wilks = 0,00). Las ecuaciones de clasificación obtenidas fueron las siguientes:

$$z_{(ZC)} = -770,054 + 16,450L^* + 3,342C^*_{ab}, \quad (2a)$$

$$z_{(ZE)} = -823,584 + 14,855L^* + 5,984C^*_{ab}. \quad (2b)$$

En este supuesto, la totalidad de las muestras se clasificó correctamente (100% de aciertos para ambos grupos).

Para comprobar la validez de los dos modelos, se ensayaron 25 muestras de zumos comerciales, distintos de los usados para la obtención de los modelos, a los que se les midió el color con el espectrorradiómetro mencionado anteriormente. En el caso de ZC se obtuvo una clasificación correcta en el 100% de los casos aplicando ambos modelos. Para los zumos exprimidos, se comprobó que la clasificación es total (100%) cuando no se pretende diferenciar entre ZEA y ZER. Cuando se intenta diferenciar entre estos dos tipos de zumos los porcentajes de acierto descienden a un 50%.

TABLA III.

Matriz de clasificación de los casos. En las filas las clasificaciones observadas y en las columnas las predichas.

	ZEA	ZER	ZC	Porcentaje de acierto
ZER	4,00	11,00	0,00	73
ZEA	11,00	0,00	0,00	100
ZC	0,00	0,00	15,00	100
Total	15,00	11,00	15,00	90

#### 4. Conclusión

Existen diferencias significativas y visualmente apreciables en el color de los zumos comerciales según sean exprimidos (ZE) o elaborados a partir de concentrado (ZC). Es posible la discriminación entre ambos grupos considerando las variables colorimétricas  $L^*$  y  $C^*_{ab}$ .

#### Agradecimientos

A la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía por la concesión del proyecto P08-AGR-03784.



# **Digital image analysis and visual evaluation of orange juice: influence of different measurements conditions**

<sup>1</sup>Rocío Fernández-Vázquez, <sup>1</sup>Carla M. Stinco, <sup>2</sup>Dolores Hernanz, <sup>1</sup>Francisco J. Heredia,  
<sup>1</sup>Isabel M. Vicario

<sup>1</sup>Food Colour & Quality Laboratory, Department Nutrition & Food Science. Universidad de Sevilla Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain. [www.color.us.es](http://www.color.us.es)

<sup>2</sup>Department Analytical Chemistry. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain.

**Running title:** Digital image analysis in Orange juice

\* Corresponding author:

Isabel M. Vicario

Food Colour & Quality Laboratory, Department of Nutrition & Food Science.

Universidad de Sevilla

Postal address: Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain

Tel.: +34 954556339 Fax: +34 954557017

Email: [vicario@us.es](mailto:vicario@us.es)

Enviado a Food Analytical Methods (en revisión).

## **Abstract**

This study assesses the effect of background, surrounding, thickness and dilutions on the colour specifications of orange juice analyzed by digital image and visual evaluation. A commercial orange juice was diluted with distilled water to give ten levels of concentration (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, and 10% of juice). These samples were evaluated instrumentally by digital image analysis using nine combinations of surroundings and backgrounds (black, grey and white) and three different thicknesses. Visual evaluation was also carried out on black, grey and white backgrounds. A grey surrounding, a white background and a fixed thickness are suggested to be used in future measurements of orange juice colour by digital image analysis. Results of visual evaluation indicated that panellists were able to order correctly the orange juice samples according to the dilution level, independently of the background chosen. The correlations between the instrumental and the visual analysis were significant ( $p < 0.05$ ) in all the backgrounds explored.

**Key words:** Colour, image analysis, background, surrounding, thickness.

## 1. Introduction

Colour perception is a psychophysical phenomenon that involves the psychology of the observer, the physiology of vision, and the spectral radiant energy of a source of light. The visible radiation produces an stimulus on the retina, which is transmitted to the brain by the optical nerve<sup>1</sup>. Colour measurement is necessary in routine quality assessment and in research and development in the food industry. It is one of the most important visual attributes in food and is usually the first one evaluated by consumers. Furthermore, it is associated to the concept of quality and some studies have revealed that the colour of citrus beverages is related to the consumer's perception of flavour, sweetness and other quality characteristics<sup>2,3,4,5</sup>.

Colour can be evaluated by instrumental and visual analysis<sup>6</sup>. Methods for visual assessment of colour includes preference tests, difference tests, acceptance tests<sup>7</sup>, and descriptive analysis methods<sup>8,9</sup>. For this kind of evaluation, the observing conditions such as illumination, sample presentation, background or surrounding on which the sample is presented have to be taken into account<sup>10</sup>.

On the other hand, instruments are able to define colour objectively following the recommendations established by the CIE<sup>11,12</sup>.

The International Commission on Illumination (Commission Internationale de l'Eclairage, CIE) developed the Tristimulus Colorimetry, which is a valuable resource for solving the problems of objective analysis of colour in foods and beverages, thus, diverse applications have been carried out with OJ<sup>13,14</sup>. In particular, the CIELAB system has been accepted worldwide in most industries<sup>15</sup>, starting from the tristimulus values previously defined by CIE colorimetry<sup>16</sup>.

The main advantages of the instrumental measurement are its simplicity, precision, and versatility. They also eliminate subjectivity, are non destructive and allow automatization<sup>17</sup>. There are different types of colour measurement instruments like colorimeters, spectrophotometers and spectroradiometers. Their validity for the objective colour evaluation of food and beverages, among them, orange juice (OJ), have been demonstrated by several authors<sup>18,19</sup>.

New advances in image acquisition technology offer the possibility of using technically sophisticated apparatus available at relatively low cost to evaluate colour in terms of millions of pixels. In comparison with the traditional light sensors, the main advantage, is that they allow to make a detailed evaluation of a wider area of any food product, with inhomogeneous colour possible, and every different colour can be accounted for by



one or more pixels<sup>20</sup>. Furthermore, it is based upon digital cameras, which can quickly capture images in digital format (DigiEye®)<sup>21</sup> and offers a more reliable measurement of the food colour, which can be correlated with sensory analysis<sup>22</sup>.

As in any other instrumental measurements, it is necessary to set up the right measurement conditions considering the characteristics of the product to be measured. When the incident light goes through any translucent beverages, part of the light is reflected, part is transmitted, part is absorbed, and also part comes from the background and goes through the sample towards the observer's eye or the instrument, so accurate colour specifications in OJ is not an easy task<sup>23</sup>. When measuring colour, the following aspects must be considered: the arrangement of the sample, the geometry of the system, the light source intensity, the thickness of the sample, and the blank; as they may affect the instrumental measurement<sup>25,24</sup>. Other authors have also suggested that background and surrounding area are factors that can also influence colour measurement<sup>17</sup>. Also, it is necessary to control the lighting geometry<sup>24</sup> which is the relative position of the sample, and the entire trajectory of the light until it reaches the observer's eye or the instrument.

As digital image is a very accurate measure of the chromatic characteristics of each pixel, the influence of these factors becomes especially important. Furthermore, this kind of measure simulates in a very exact way the visual appreciation, in which it is clear that they have a relevant effect<sup>10</sup>.

Therefore, the main objective of this study was to set up the right conditions for colour evaluation of orange juice by Digital image analysis. Several measurements conditions were assessed including backgrounds, surroundings, sample thickness, and dilutions. Colour specifications of OJs were analyzed by digital image and visual evaluation. Furthermore correlations between visual and instrumental analysis with different backgrounds were also explored.

## **2. Material and methods**

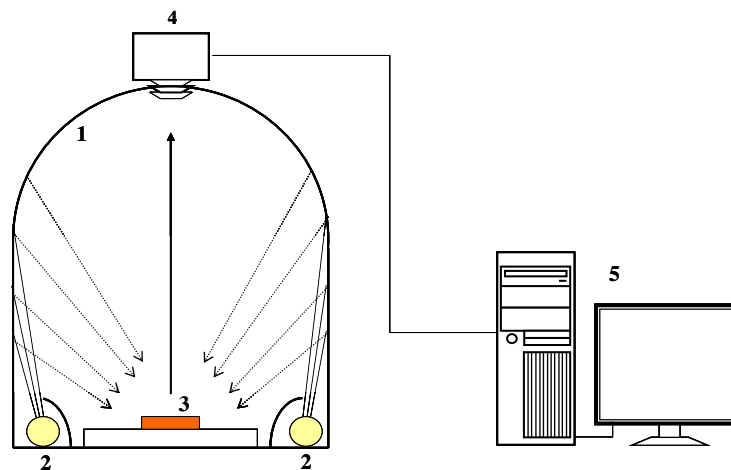
### *2.1. Samples*

A series of dilutions of commercial fresh OJ with distilled water were done to get ten levels of OJ concentrations (100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, and 10% of juice).

As a result of the successive dilutions, a collection of orange juice solutions with different amount of pulp and pigments were obtained, which represent the range of OJs colours from the darkest to the palest.

## 2.2. Colour measurement: Image analysis

The DigiEye imaging system was used to capture the digital images<sup>21</sup>. The latter system includes a calibrated digital camera with 10.2-megapixel Nikon D80 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) and an objective Nikkor 35-mm f/2D (Nikon Corporation), a colour sensor for display calibration, and an illumination box designed by VeriVide Ltd. (Leicester, UK) (Figure 1).



- 1: Domed cabinet
- 2: Fluorescent tubes (D65 simulator)
- 3: Sample
- 4: Digital camera
- 5: PC with Digifood<sup>®</sup> Software

Figure 1. Scheme of DigiEye System

To explore the influence of the surroundings and backgrounds on the colour measurement of OJ by image analysis, three backgrounds and surroundings (white, grey ( $L^* = 50$ ), and black) were selected. Figure 2 shows the nine combinations of backgrounds and surroundings used. The influence of the sample's thickness was also evaluated. Three levels of thickness: 15, 30, and 40 mm were obtained by filling a cuvette with 44.7 mm of internal diameter with three different volumes (20, 45 and 70 mL).

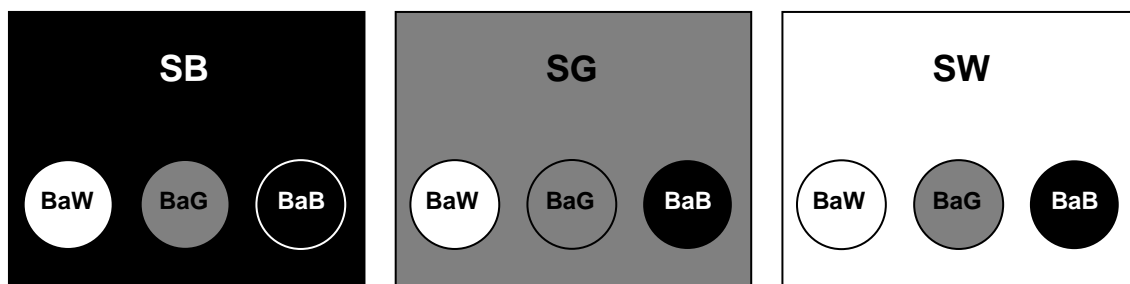


Figure 2. Combinations of backgrounds and surroundings.

In these measurements, the samples were illuminated by a diffuse D65 simulator. To calculate the CIELAB coordinates from RGB colour space, the DigiFood software was used<sup>26</sup>.

For colour specifications the CIELAB colour space, recommended by the CIE<sup>27</sup> was applied. Colour differences can be calculated by different formulas like CIE94<sup>28</sup> or CIEDE2000<sup>29,30</sup>. In this work we have decided to use the most usual CIELAB formula in OJ which calculate colour differences as the Euclidean distance between two points in the 3-D space defined by L\*, a\* and b\*:

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

### 2.3. Visual analysis

To control the illumination and observation conditions visual analyses were carried out using a VeriVide CAC Portable cabinet (Konika Minolta, Nieuwegein, Netherlands) equipped with a daylight source simulating the D65 illuminant (dimension of viewing area: 635 mm width, 280 mm height, and 280 mm depth). The visual analyses were done under the following conditions: grey colour (L\* = 50) surrounding and three different backgrounds (black, grey and white). To standardize thickness to 30 mm (a medium value from those assayed in the instrumental measures) the cylindrical transparent glass flasks were filled with 80 ml of the corresponding solutions. Samples were placed randomly in the cabin.

Ten panellists recruited from students and staff at the University of Seville, without previous training in visual evaluation, took part in the study. All of them were asked to order the samples in an ever-increasing order of concentration of OJ. For data analysis,

the samples were given from 1 to 10 points, corresponding to the most diluted OJ sample to the original OJ, respectively.

### 3. Results

#### 3.1. Influence of surrounding and background on the orange juice colour parameters assessed by digital image.

In order to explore the effect of the background and the surrounding on the colour analysis, an average diluted sample (50%) was selected. Thickness was fixed at 30 mm. The influence of the surrounding was evaluated by comparing the colour differences for white/black (SW/SB), white/grey (SW/SG), and black/grey (SB/SG) surroundings with all the backgrounds explored.

The highest colour differences ( $\Delta E^*_{ab}$ ) were observed when comparing SW/SB, in which colour differences ranged from 6.84 to 6.87 for the three different backgrounds. The second highest colour differences corresponded to SW/SG (4.70-5.08). In both cases,  $\Delta E^*_{ab}$  was higher than the visual discrimination threshold ( $\Delta E^*_{ab} > 3$  CIELAB units approximately) reported by Melgosa et al.<sup>31</sup> for wine. The lowest colour differences, ranging from 1.85 (white background) to 2.35 (grey background), were obtained when comparing the surroundings SB/SG.

These results are in agreement with Stinco et al.<sup>17</sup>, who conducted a similar study on spectroradiometric instrumental measurements. They concluded that the highest colour differences were obtained when comparing SW and SB, although they reported higher  $\Delta E^*_{ab}$  values.

Although many studies have reported the influence of different backgrounds on the instrumental measurement of colour<sup>18,32,6,25,17</sup> none of them have been referred to digital image analysis. To explore the influence of the background, the average diluted sample (50% of OJ) was also selected and three possible backgrounds: white background (BaW), grey background (BaG), and black background (BaB). Colour differences due to the background were calculated. The highest colour differences ( $\Delta E^*_{ab}$ ) were observed for the pair BaW/BaB, ranging from 2.72 to 2.99 for the three different surroundings. The second highest colour differences corresponded to BaG/BaW (2.30-1.75), and finally the lowest colour differences were obtained when comparing the backgrounds BaB/BaG, ranging from 0.72 (SW) to 1.00 (SG). All these differences were lower than the threshold of visual detection reported by Martínez et al.<sup>33</sup>. It must also be highlighted that the backgrounds produced lower colour differences than the

surroundings. Similar results were reported by Stinco et al.<sup>17</sup> in spectroradiometry measurements, although the colour differences reported in that study were higher (2 - 18 CIELAB units). Similarly, other authors have also concluded that background has a clear effect on the instrumental colour measurements of OJ<sup>10</sup> and meat<sup>34</sup>.

Figure 3 shows the location of the samples in the  $a^*b^*$  plane as a function of the background used. It can be observed a clearly separated group corresponding to BaW and two other closer groups corresponding to BaG and BaB, which showed lower values of  $a^*$  and  $b^*$  (Figure 3a). However, Figure 3b shows that when representing  $L^*$  values, no well-defined groups are observed. Obviously, the lowest values of  $L^*$  corresponded to the black background (BaB) while the highest values of  $L^*$  to the white background (BaW). However, the fact that the samples showed no grouping tendency, suggests that the effect of the background in OJ does not have a relevant impact in lightness values.

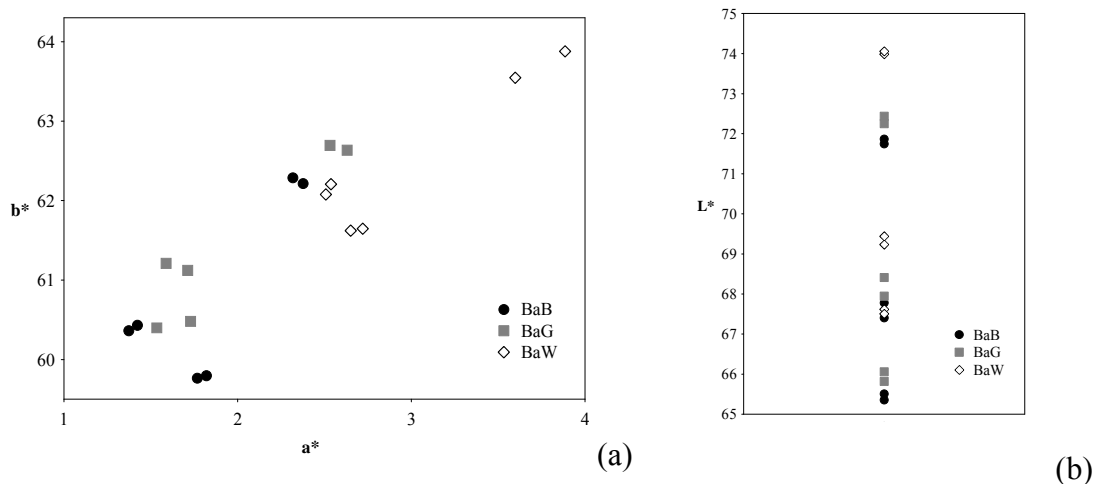


Figure 3. Location of the samples (OJ 50%) in the diagram: (a) in the  $a^*b^*$  plane and (b) in  $L^*$  values.

The influence of the surrounding and background on the colour parameters is affected by the dilution of the sample, as it can be inferred from the collection of different dilutions of OJ samples. Figure 4 shows that, when comparing surroundings, the colour differences decreased from the most diluted OJ (10%) to the most concentrated (100%). The same trend was observed for the different backgrounds. For example, OJ 10%, on BaW showed colour differences values of 10.45, 7.09, and 4.19 on SB/SW, SG/SW, and SB/SG, respectively, while for OJ 100%, colour differences values decreased to

4.78, 3.62, and 1.24, respectively. This implies a reduction around 50% in colour differences values.

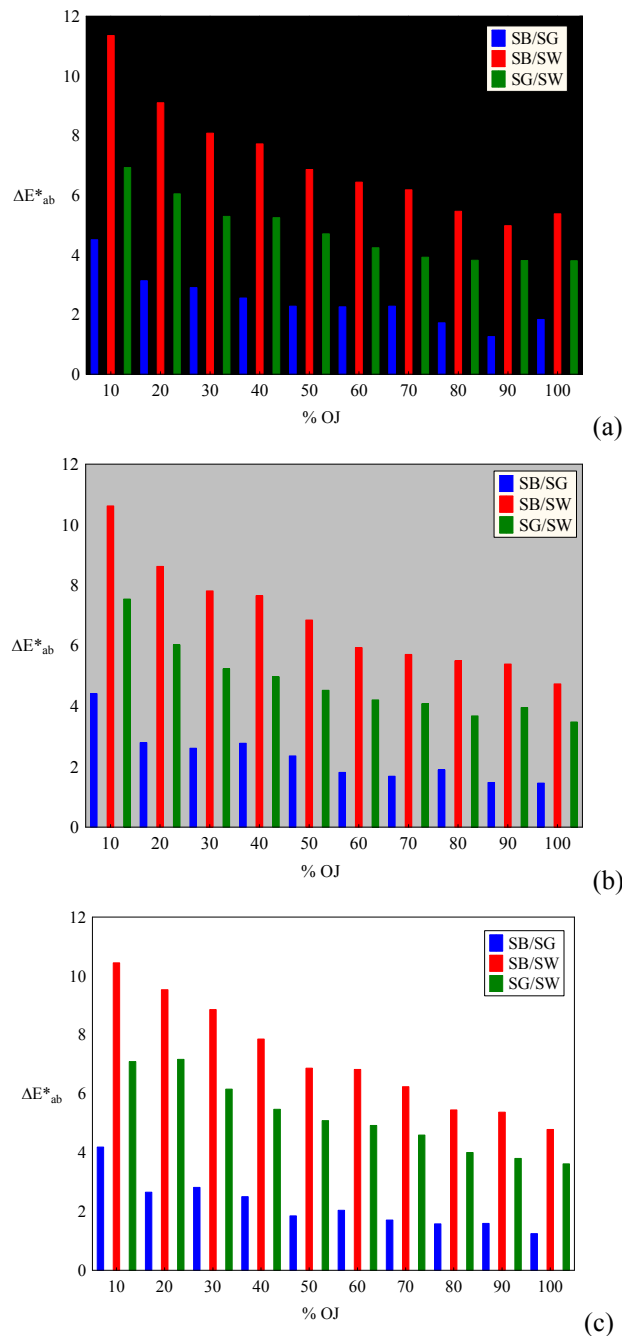


Figure 4. Colour differences between surroundings (SB/SG, SB/SW, and SG/SW) with black (a), grey (b) and white (c) backgrounds.

Figure 5 shows the effect of the backgrounds for the ten dilutions studied. As previously discussed for the surroundings, the same trend was observed when comparing the different backgrounds on the three surroundings. Furthermore, the differences in colour comparing backgrounds also decreased due to OJ concentration,

but in a more accused way. Taking as an example the sample OJ 10% in SW, the colour differences were 11.38, 7.81, and 3.82 comparing BaW/BaB, BaG/BaW, and BaB/BaG, respectively, while for OJ 100% colour differences values decreased to 0.99, 0.41, and 0.37, respectively. In this case, a reduction around 90% in colour differences values was observed due to the effect of the background.

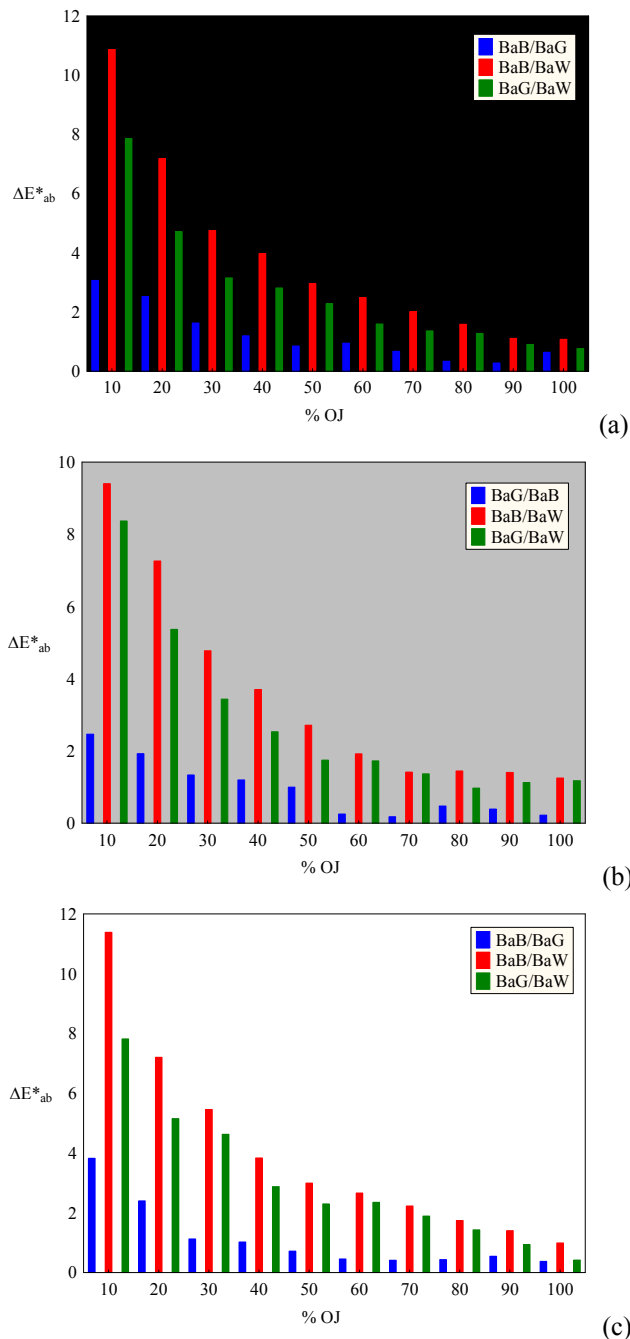


Figure 5. Colour differences between backgrounds (BaB/BaG, BaB/BaW, and BaG/BaW) with black (a), grey (b) and white (c) surroundings.

It can be concluded that surrounding as well as background do have an influence in the digital analysis measurements of OJ. The magnitude of this effect is affected by the concentration of pulp and pigments. Due to the huge offer of OJ existing in the market, with different amount of pulp and pigments, it is necessary to fix these factors before OJ colour analysis. Therefore, according to these results and taking into account the CIE recommendations<sup>27</sup> and also previous studies with different instrumental measurements<sup>17</sup>, the grey surrounding (uniform neutral grey with  $L^* = 50$ ) and white background were selected for the following measurements.

### *3.2. Influence of dilutions and thickness on the orange juice colour parameters assessed by digital image.*

The effect of the dilutions on the colorimetric parameters was also studied in this work. It can be observed that the lower the concentration of the OJ, the higher the values of  $L^*$  (Figure 6a). Hue was affected in a similar way: the lower the concentration of the OJ, the higher values of  $h_{ab}$ . This means that OJs with more pigments in pulp and serum are more reddish and darker (as it could be expected) (Figure 6c). The same trend was observed by Stinco et al.<sup>17</sup> and Meléndez Martínez et al.<sup>10</sup>. Finally, in the case of chroma, it can be observed a slight increase for OJ dilutions ranging from 10 to 40 %, and a stabilization of  $C^*_{ab}$  values from this dilution onwards (Figure 6b). However, other authors Melendez-Martínez et al.<sup>10</sup> and Stinco et al.<sup>17</sup> have reported that  $C^*_{ab}$  values increases as the concentration of OJ does.



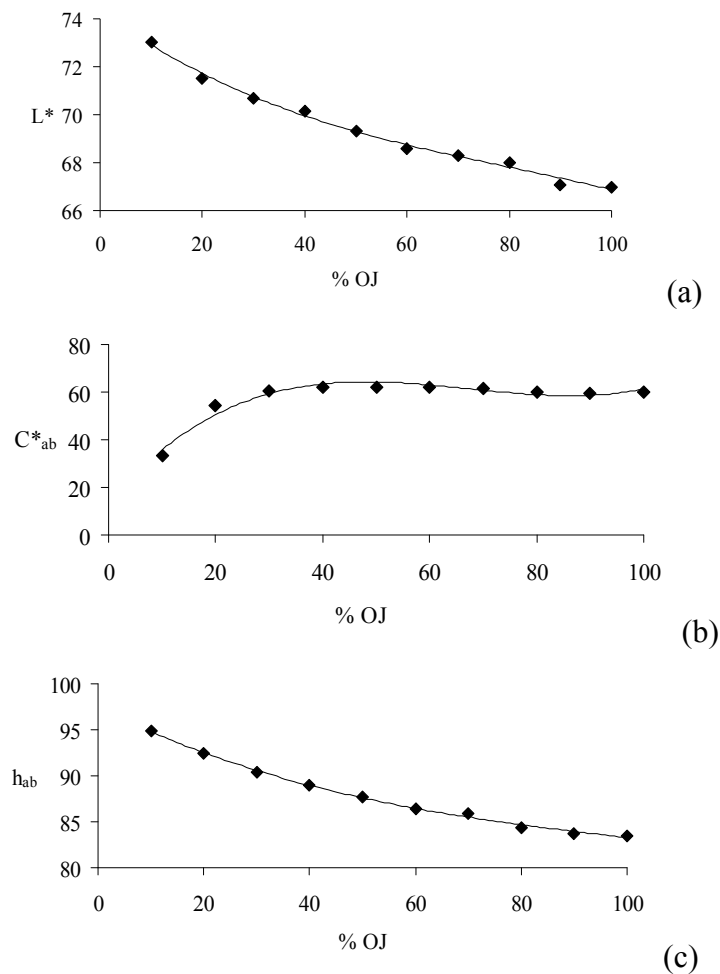


Figure 6. Effect of the orange juice (OJ) dilutions in colorimetric parameters.

The effect of the sample thickness on the chromatic parameters ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$ ,  $h_{ab}$ ) is shown in Figure 7. The colorimetric parameter lightness decreased as the thickness increased, however this effect was less important as the concentration of OJ increased. This means, that the effect of thickness on  $L^*$  is negligibly when the concentration of the OJ is 100% (Figure 7a). The same trend is observed for chroma. For samples containing over 40% of OJ, the effect of thickness is null (Figure 7b). Hue is also represented in Figure 7c. This parameter was not affected by the sample thickness.

Previous studies have been conducted on the effect of thickness in colour measurements but in other foods and beverages<sup>35,24</sup>. For example, studies in olive oil found out that lightness and hue decreased when increasing sample thickness while chroma increased up to about 19.6 mm thickness. They also concluded that colour tended to stabilize at a certain thickness<sup>24</sup>.

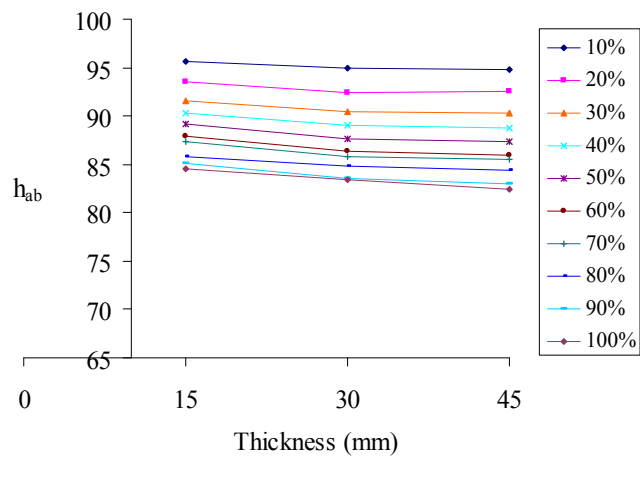
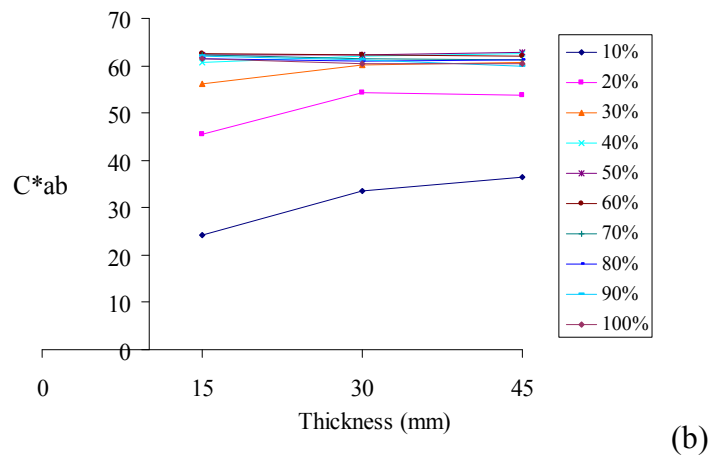
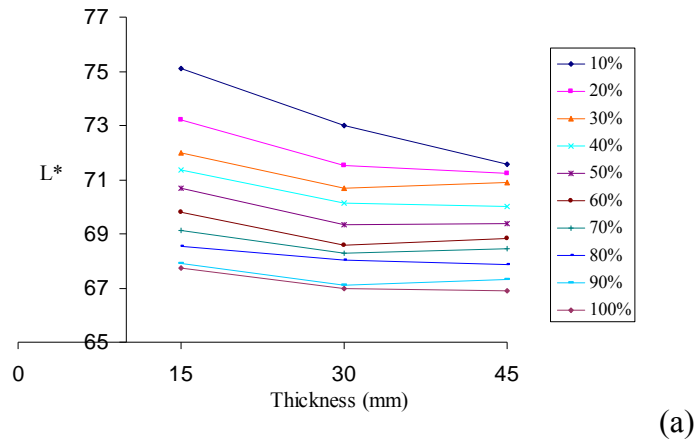


Figure 7. Effect of thickness on  $L^*$ ,  $C^*_{ab}$  and  $h_{ab}$  in the orange juice (OJ) samples.

It could be concluded that the effect of the thickness will become lower as the pulp and pigments content increases because of the decline of the OJ translucency. However, the thickness must be taken into account and fixed, in order to do reproducible and reliable objective colour measurements by digital image.

### 3.3. Visual analysis

In order to compare the instrumental and the visual analyses, 10 panellists took part in the visual assessment of the different samples considered. Each of them was asked to sort the series of cuvettes containing the different dilutions of orange juice in increasing order of OJ concentration. Table 1 shows the rank sums (RS) given by the panellists in the different backgrounds.

Table 1. Rank sums (RS) of the panellists in black (BaB), grey (BaG) and white (BaW) backgrounds.

% PULP	RS-BaB	RS-BaG	RS-BaW
10	10	10	10
20	20	20	20
30	31	30	30
40	39	41	41
50	51	49	49
60	70	63	68
70	71	70	66
80	80	85	86
90	88	86	91
100	90	96	89

On black and white backgrounds two completely correct visual assessments were achieved, while on grey background one more was achieved. It has to be highlighted that in the incorrect assessments, the main mistakes were done among samples with more than 50 % of OJ. Thus, if only the most diluted samples were taken into account (10, 20, 30, 40, and 50 %) the percentage of completely correct visual analyses would increase up to 80 - 90% of the panellists. This means that it is more difficult to discriminate among samples with higher pulp and pigment contents. These results could be explained by the colour differences between consecutive samples, measured on the different backgrounds. Table 2 shows that from the pair 40-50 % and 50-60 % to the pair 90-100 %, colour differences decreased considerably.

Table 2. Colour differences between dilutions in black (BaB), grey (BaG) and white (BaW) backgrounds.

$\Delta E^*_{ab}$	BaW	BaG	BaB
10-20 %	21.00	21.29	19.30
20-30 %	6.25	7.75	8.09
30-40 %	2.39	2.94	3.22
40-50 %	1.69	1.83	1.77
50-60 %	1.55	1.67	1.69
60-70 %	0.97	0.70	0.80
70-80 %	1.30	1.34	1.43
80-90 %	1.57	1.54	1.56
90-100 %	0.88	1.32	1.40

In any case, the statistical analysis by the Page test of the set of data, showed that all of the backgrounds resulted in significant correct classifications ( $p < 0.05$ ) and all the backgrounds showed a similar pattern.

The similarity in the ordering results obtained for the different backgrounds, could be explained by the previous instrumental results discussed above. They showed that colour differences between backgrounds were lower than the colour-difference threshold reported by the literature in many of the samples and furthermore, the same trend was observed in all the backgrounds (Figure 4 and 5). In contrast to these results, previous studies on the effect of the background on the visual evaluation of OJ showed that the best results were obtained when a cabin with black walls was used<sup>10</sup>. Huang et al.<sup>36</sup> also concluded that panellists were able to rank squash purees samples with the highest correlations with the theoretical order, when a black background and was used.

#### 3.4. Correlation between visual and instrumental measurements

The correlations between the instrumental and the visual data were explored by means of a polynomial regression. The RS given by the panellists (Table 1) and each of the colorimetric coordinates ( $L^*$ ,  $C^*_{ab}$ , and  $h_{ab}$ ) in the different backgrounds were considered. Results are presented in Table 3. Chroma did not present a good adjustment with any of the backgrounds explored ( $R^2$  values were 0.61, 0.55 and 0.56 with BaB, BaG and BaW, respectively). Hue was very well correlated with RS in all the backgrounds ( $R^2 = 0.99$ ), and in the case of  $L^*$ , the best correlation was obtained for white background.

Table 3. Regression coefficients between colour parameters and rank sums (RS) of the panellists.

	BaB	BaG	BaW
$L^*$	0.53	0.88	0.98
$C^*_{ab}$	0.61	0.55	0.56
$h_{ab}$	0.99	0.99	0.99

Multiple regressions analysis between instrumental and visual data, considering the RS given by the panellists (Table 1), was also explored, and all the correlations obtained were significant ( $p < 0.05$ ):

Black background:

$$RS = -22.553 + 1.235L^* + 7.786a^* - 0.296b^*; R^2=0.993$$

$$RS = 909.09 - 0.519L^* - 1.406C_{ab}^* - 8.310h_{ab}; R^2=0.990$$

Grey background:

$$RS = -570.84 + 10.339L^* + 10.999a^* - 1.608b^*; R^2=0.990$$

$$RS = 655.21 + 10.317L^* - 3.659C_{ab}^* - 12.260h_{ab}; R^2=0.997$$

White background:

$$RS = 194.94 - 2.181L^* + 7.134a^* - 0.120b^*; R^2=0.984$$

$$RS = 681.70 + 7.883L^* - 0.753C_{ab}^* - 12.864h_{ab}; R^2=0.988$$

#### 4. Conclusions

In conclusion, the results of this work have probed the influence of the surrounding and the background in the definition of OJ colour by image analysis. According to them and considering the CIE recommendations and other previous studies, the grey surrounding (uniform neutral grey with  $L^* = 50$ ) and white background are proposed to be used in the colour determination by digital image analysis of OJ. Moreover the sample's thickness must be also taken into account and fixed to get reproducible and reliable colour measurements of OJ by digital image.

In the visual evaluation of OJ the background is not relevant, thus the correlations between the instrumental and the visual analysis were significant ( $p < 0.05$ ) in all the backgrounds explored.

#### Acknowledgments

This work was supported by funding from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía by the project P08-AGR-03784. RFV holds a grant from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía. Special thanks to Jose Luis Yanes Conde and Patricia Serrano Chica for their collaboration on image analysis.

## References

1. G.Wyszecki and W.S.Stiles, Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae, in 2, John Wiley & Sons, Inc, New York, (1982).
2. R.M.Pangborn, Am J Physiol. 73, 229 (1960).
3. R.L.Huggart, D.R.Petrus, and B.S.Buzz Lig, Proceedings of the Florida State Horticultural Society. 90, 173 (1977).
4. B.J.Tepper, J. Sensory Stud. 8, 145 (1993).
5. R.Fernández-Vázquez, I.Fisk, J.Hort, L.Hewson, D.Hernanz Vila, F.J.Heredia, and I.M.Vicario, Proceedings of 5th European Conference on Sensory and Consumer Research, Bern, Switzerland. (2012).
6. A.J.Meléndez-Martínez, I.M.Vicario, and F.J.Heredia, J.Sci.Food Agric. 85, 894 (2005).
7. T.Luckow and C.Delahunty, Food Res. Int. 37, 805 (2004).
8. M.H.F.Spotto, R.E.Domarco, J.M.M.Walder, I.S.Scarmínio, and R.E.Bruns, Journal of Food Processing and Preservation. 21, 179 (1997).
9. H.Stone, J.Sidel, S.Oliver, A.Woolsey, and R.C.Singleton, Sensory Evaluation by Quantitative Descriptive Analysis, in Descriptive Sensory Analysis in Practice, Food & Nutrition Press, Inc., (2004).
10. A.J.Meléndez-Martínez, I.M.Vicario, and F.J.Heredia, Food Qual. Pref. 16, 471 (2005).
11. CIE, CIE standards colorimetric illuminants, in ISO / CIE 10526: 1991 (E), (1991).
12. CIE, CIE standard colorimetric observers, in ISO/ CIE 10527: 1991 (E), (1991).
13. Fernández-Vázquez R., Stinco C, Escudero-Gilete M.L., A.J.Melendez-Martinez, F.J.Heredia, and Vicario I.M, Optica Pura y Aplicada. 4, 245 (2010).
14. A.J.Meléndez-Martínez, I.M.Vicario, and F.J.Heredia, J. Agr. Food Chem. 51, 7266 (2003).
15. R.G.Kuehni, Color Res.Appl. 15, 261 (1990).
16. CIE, Colorimetry, 2nd edn. Publication CIE No. 15.2, in CIE Central Bureau, Vienna, (1986).
17. C.Stinco, R.Fernández-Vázquez, A.J.Meléndez-Martínez, F.J.Heredia, E.Bejines-Mejías, and I.M.Vicario, Influence of Different Backgrounds on the Instrumental Color Specification of Orange Juices, in Color in

Food. Technological and Psychophysical Aspects, CRC Press. Taylor & Francis Group, New York, (2012).

18. B.A.Eagerman, *J.Food Sci.* 43, 428 (1978).
19. B.S.Buslig, *Proc.Fla.State Hort.Soc.* 104, 131 (1991).
20. A.Antonelli, M.Cocchi, P.Fava, G.Foca, G.C.Franchini, D.Manzini, and A.Ulrici, *Anal. Chim. Acta.* 515, 3 (2004).
21. M.R.Luo, C.G.Cui, and C.Li, British Patent Entitled apparatus and method for measuring colour (DigiEye System), in 0124683.4, (2001).
22. R.Fernández-Vázquez, C.Stinco, A.J.Melendez-Martinez, F.J.Heredia, and Vicario I.M, *J. Sensory Stud.* 26, 436 (2011).
23. M.J.Moyano, M.Melgosa, J.Alba, E.Hita, and F.J.Heredia, *J Amer Oil Chem Soc.* 76, 687 (1999).
24. L.Gómez-Robledo, M.Melgosa, R.Huertas, R.Roa, M.J.Moyano, and F.J.Heredia, *J Am Oil Chem Soc.* 85, 1063 (2008).
25. V.I.H.F.J.Meléndez-Martínez AJ, *J AOAC Int.* 89, 452 (2006).
26. F.J.Heredia, M.L.González-Miret, C.Álvarez, and A.Ramírez, *DigiFood® (Análisis de imagen).*, in (2006).
27. Commision Internationale de l'Eclairage (CIE), *Colorimetry*, in 15, Vienna, (2004).
28. CIE, Commission Internationale de L'Eclariage, *Technical Report. Publication 116-1995, I-V* (1995).
29. CIE, Commission Internationale de L'Eclariage, *Technical Report. Publication 142-2001*, (2001).
30. M.Melgosa, *Color Res.Appl.* 25, 49 (2000).
31. M.Melgosa, M.M.Pérez, A.Yebra, R.Huertas, and E.Hita, *Óptica Pura y Aplicada.* 34, 1 (2001).
32. E.A.Gullett, F.J.Francis, and F.M.Clydesdale, *J.Food Sci.* 37, 389 (1972).
33. J.A.Martínez, M.Melgosa, M.M.Pérez, E.Hita, and A.I.Negueruela, *Food Sci Technol Int.* 7, 439 (2001).
34. C.L.Sandusky and J.L.Heath, *Poultry Sci.* 75, 1437 (1996).
35. M.Bianchi and D.L.Fletcher, *Poultry Sci.* 81, 1766 (2002).
36. I.L.Huang, F.J.Francis, and F.M.Clydesdale, *J.Food Sci.* 35, 315 (1970).

## **Capítulo 2: EVALUACIÓN INSTRUMENTAL Y VISUAL DE ZUMOS DE NARANJA DE DISTINTAS VARIEDADES, Y ESTUDIO DE CONSUMIDORES**

### **ANTECEDENTES**

El color de los zumos de naranja es considerado uno de sus principales atractivos (Barron y col., 1967), sin embargo, en los estudios de preferencia de los consumidores éste no suele ser tenido en cuenta (Birdsall L, 1955; Hoegg y Alba, 2007; Luckow y Delahunty, 2004).

El zumo de naranja (OJ) debe su color a los carotenoides, que se encuentran entre los más importantes pigmentos naturales. Su complejo perfil de carotenoides incluye carotenos y xantofilas. Alguno de estos compuestos ( $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina) tienen actividad provitamínica A y pueden presentar otras actividades biológicas como su capacidad antioxidante y anticarcinogénica (Krinsky y col., 2004). El color de los OJs puede ir desde el amarillo pálido al principio de la temporada hasta un rojo anaranjado al final de la misma. Además del estado de madurez, otros factores como la especie, la variedad y el clima, pueden afectar al color final de los zumos (Casas y Mallent, 1988). En zumos procesados industrialmente, los cambios de color pueden servir como un indicador de calidad relacionado con el deterioro de los carotenoides durante el procesado térmico (Fernández-Vázquez y col., 2010; Meléndez-Martínez y col., 2009).

Por otra parte, el interés hacia ciertas variedades de naranjas está aumentando considerablemente debido al color de las mismas. Este es el caso de la naranja sanguina, cuya pulpa presenta un peculiar color rojizo (Lee, 2001; Lee, 2002) o de las naranjas Valencia, cuyo profundo color naranja es mundialmente apreciado (Francis y Clydesdale, 1975; Robards y Antolovich, 1995).



El color está también relacionado con el valor nutricional del OJ. Estudios previos han probado la relación existente entre el color medido mediante la Colorimetría Triestímulo y la hipotética actividad vitamínica A expresada como equivalentes de actividad de retinol (RAE) (Meléndez-Martínez y col., 2007).

La evaluación del color puede hacerse de manera instrumental o visual. Así, la validez de los diferentes equipos para la evaluación objetiva del color ha sido ampliamente demostrada (Buslig, 1991; Eagerman, 1978). Los métodos más usados para las medidas colorimétricas son aquellos que proporcionan medidas sencillas y precisas en cuanto a su significado visual. Los nuevos avances en la tecnología de adquisición de imágenes ofrecen la posibilidad de usar sofisticados equipos, disponibles a un relativo bajo coste, para evaluar el color en términos de millones de píxeles. Así, la aplicación de las imágenes digitales (DigiEye) permitiría una medida más exacta del color de los alimentos, pudiendo ser ésta mejor relacionada con el análisis sensorial, lo cual supondría una importante ventaja.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo fue evaluar instrumental y visualmente el color de OJs de diferentes variedades y estudiar las preferencias de los consumidores hacia el color de las mismas.

Los objetivos concretos planteados fueron:

- Evaluar colorimétricamente OJs procedentes de distintas variedades de naranja mediante diferentes técnicas instrumentales (análisis de imagen y espectrorradiometría).
- Realizar una evaluación visual de los OJs procedentes de distintas variedades.
- Estudiar las correlaciones entre el análisis instrumental (análisis de imagen y espectrorradiometría) y la evaluación sensorial de los atributos colorimétricos (claridad, croma y tono) en OJ.
- Evaluar las preferencias del consumidor en el color de los mismos.

## MUESTRAS

Para llevar a cabo este trabajo, se utilizaron zumos exprimidos a mano, procedentes de naranjas frescas de cinco variedades distintas: Navel Foyos (NF), Fisher (F), Navel Powel (NP), Valencia Midnight (VM), Rohde Late (RL).

Las naranjas fueron cultivadas en un campo experimental situado en el sur de España y recolectadas en Noviembre del 2009. El día de la recolección, se tomaron aleatoriamente unos tres Kg de muestra de cada variedad de naranja. Los OJs fueron obtenidos en el laboratorio usando un exprimidor casero. Las muestras se congelaron y se conservaron a - 21 °C hasta su análisis en el laboratorio. La descongelación se llevó a cabo a temperatura ambiente (23 °C) durante 24 horas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Caracterización fisicoquímica y colorimétrica instrumental*

Las muestras fueron previamente caracterizadas fisicoquímicamente (acidez, sólidos solubles totales y ratio). Los OJs presentaron una acidez de 0.52 a 0.92 g de cítrico en 100 mL de OJ. La media de sólidos solubles totales fue 10.24 °Brix, con un valor mínimo de 8.16 y máximo de 11.41 °Brix.

Seguidamente el color de las muestras fue evaluado mediante análisis de imagen (Sistema DigiEye, VeriVide Ltd., Leicester, Reino Unido) y espectrorradiometría, utilizando botes de plástico transparentes de 75 mL de capacidad para contener las muestras.

El análisis de imagen dio como resultado valores de la coordenada L\* de 56.09 en el zumo más claro (RL) y 61.34 en el más oscuro (NF). El zumo más apagado (RL) presentó un croma de 54.03 mientras que el más vivo (NF) tuvo

60.29. Finalmente el rango de tono fue de 66.43 en el zumo más rojizo (RL) a 81.99 en el más amarillento (NF).

El análisis espectrorradiométrico mostró valores comprendidos entre 56.58 y 60.66 para la claridad, 63.11 y 66.02 para el croma y 66.43 y 81.99 para el tono.

Finalmente se calculó el RAE de las muestras considerando la equivalencia 1 RAE = 12 µg de todo-trans-β-caroteno = 24 µg de otros carotenoides provitamínicos (Trumbo y col., 2001). La estimación se realizó como se describe en el estudio de Meléndez-Martínez y col. (2007) siguiendo la siguiente ecuación:

$$\text{RAE} = - 8.8961 \times h_{ab} + 781.8687$$

Se obtuvieron valores comprendidos entre 77.83 (NF) y 185.02 (RL) RAE/L.

#### *Evaluación sensorial*

Después de la evaluación instrumental, el siguiente objetivo fue evaluar visualmente los parámetros psicofísicos del color (claridad, tono y croma). Para ello se utilizó un panel previamente entrenado en la colorimetría triestímulo aplicada a los OJs. A los dieciocho panelistas participantes se les pidió además que clasificaran los zumos en orden creciente de tono (amarillo-rojizo), croma (apagado-vivo) y claridad (claro-oscuro).

Todas las muestras se ordenaron correctamente en función del tono (de amarillento a rojizo), excepto las muestras F y NP. En cuanto a la claridad, el 17% del panel fue capaz de ordenar todas las muestras correctamente, mientras que el 83% de los panelistas ordenaron correctamente las muestras con  $\Delta L^* > 0.663$ . En función del croma, solo el 17% de las muestras fueron ordenadas correctamente.

Para explicar estos resultados se calcularon las diferencias de color ( $\Delta E^*_{ab}$ ). Los valores de  $\Delta E^*_{ab}$  se encontraron entre 2.9 y 11.7, y, 2.5 y 14, al ser calculados mediante espectrorradiometría y análisis de imagen, respectivamente.

Para entender mejor los resultados erróneos que se produjeron en la ordenación según el croma, las diferencias de color  $\Delta E^*_{ab}$  se dividieron en sus tres componentes, llamados diferencia de claridad ( $\Delta L^*$ ), diferencia de croma ( $\Delta C^*_{ab}$ ), y diferencia de tono ( $\Delta H^*_{ab}$ ) y se comprobó que la mayor contribución a las diferencias de color se produjo por la diferencia de tono.

Cuando los panelistas puntuaron la intensidad de los atributos de color, todas las muestras resultaron significativamente distintas en función del tono y la claridad, pero, como era de esperar, sólo algunas variedades resultaron significativamente distintas en función del croma. Esto pudo deberse a la baja diferencia de croma que se detectó entre las muestras y consecuentemente a la baja contribución de este parámetro a la diferencia de color total entre las muestras. Además, como ya han concluido previamente otros autores, las diferencias de tono son mucho más fáciles de detectar que las variaciones en croma y claridad (Shewfelt y col., 1987).

Por último, cuando estas evaluaciones se compararon con las medidas instrumentales, los resultados mostraron una alta correlación entre la evaluación instrumental y visual en el tono y la claridad, pero no el croma.

#### *Estudio de preferencia de consumidores*

Finalmente, se hizo un estudio de consumidores con 111 voluntarios a los que previamente se les realizó una encuesta para recoger sus datos demográficos. Seguidamente, se les pidió que ordenaran las cinco muestras de acuerdo a su preferencia en el color. Los resultados de la ordenación mostraron una preferencia significativa ( $p < 0.05$ ) por el zumo con tono y claridad intermedia (VM). Por otra parte el zumo peor valorado fue el que presentaba valores de claridad y tonos más altos (el más amarillento), la variedad NF.

Con los datos de preferencia se evaluó la posible segmentación de los consumidores mediante un análisis de cluster. Tres grupos de consumidores fueron claramente identificados. El primer segmento (21,62%) mostró una clara preferencia por la muestra NF seguida de F, mientras que en el segundo segmento (45,05%) se observó una preferencia significativa por RL, siendo la peor evaluada la NF. Curiosamente éstas eran las muestras con valores de RAE más altos y bajos, respectivamente. El tercer segmento (33,33% de los consumidores) dio una mayor puntuación a la muestra VM (con un valor intermedio de RAE).

Estas últimas observaciones aportan información adicional a los resultados generales discutidos anteriormente. Por ejemplo, aunque el zumo más amarillento (NF) fue el peor evaluado por los consumidores en general, existe un grupo de población que muestra preferencia por esta variedad (21.62%) y, sin embargo, también se observó otro grupo de población con una preferencia clara por la muestra más rojiza (RL). Finalmente, entre los tres grupos de consumidores no se observaron diferencias en cuanto a género o edad, lo que indicó que esos aspectos no influían significativamente en los patrones de preferencia del color.

## CONCLUSIONES

- Comparando ambas metodologías para la medida del color, se observan ligeras variaciones entre los valores de las coordenadas colorimétricas siendo estas diferencias significativas sólo en los parámetros  $b^*$  y  $C^*_{ab}$ .
- Las correlaciones entre la evaluación visual de los panelistas y las medidas instrumentales muestran que las medidas de tono se correlacionan mejor con las medidas realizadas por espectrorradiometría, mientras que la claridad lo hace con las medidas hechas por análisis de imagen.
- Los resultados indican que el croma no parece ser muy intuitivo para los jueces, no habiendo correlación con la medición instrumental.

- En la evaluación de las preferencias de los consumidores, no se observa una clara preferencia hacia ninguna de las variedades, aunque, en general parece que los consumidores prefieren las muestras con una tonalidad más anaranjada.
- EL análisis cluster proporciona información adicional a los resultados generales, comprobando que existe un grupo de población (21.62%) con preferencia por la variedad más amarillenta (NF) y otro (45.05%) que se decanta por la más rojiza (RL).



# VISUAL AND INSTRUMENTAL EVALUATION OF ORANGE JUICE COLOR: A CONSUMERS' PREFERENCE STUDY

ROCÍO FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, CARLA M. STINCO, ANTONIO J. MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, FRANCISCO J. HEREDIA and ISABEL M. VICARIO<sup>1</sup>

Food Colour & Quality Laboratory, Department of Nutrition & Food Science, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain

<sup>1</sup>Corresponding author. TEL: 34-954556339; FAX: 34-954557017; EMAIL: vicario@us.es

Accepted for Publication October 24, 2011

doi:10.1111/j.1745-459X.2011.00360.x

## ABSTRACT

This study was aimed at (1) finding out correlations between the instrumental and the sensory evaluation of color attributes (lightness, chroma and hue) in orange juices (OJs) and (2) evaluating consumer preferences on OJs color. Fresh hand squeezed OJs from five varieties of oranges were evaluated by image analysis (DigiEye System, VeriVide Ltd., Leicester, UK) and spectroradiometer. Eighteen trained panelists classified the OJs in increasing order of hue (yellowish–reddish), chroma (dull–vivid) and lightness (clear–dark) and scored the colorimetric parameters on a continuous scale of 10 cm, anchored at the ends. Hue and lightness were well correlated with the instrumental measurement but not chroma. One hundred eleven consumers were asked to order the five OJs according to their color liking. A significant preference ( $P < 0.05$ ) was observed for the OJs with intermediate hue and lightness values (Valencia Midnight). Consumers' segmentation was also explored by cluster analyses.

## PRACTICAL APPLICATIONS

For the first time, the correlations between instrumental color parameters obtained with DigiEye and the sensory evaluation of color in orange juice (OJ) has been explored. These correlations have demonstrated that trained panelists can effectively evaluate orange juice hue and lightness. Small chroma differences (<2.96 CIELAB units) are not well appreciated by a trained panel and therefore would not be relevant for the industry.

Consumers' preference for OJ color suggests that the preferred hues are the most orangish against other more reddish or yellowish ones. However, there are different segments of the population that show preference for more reddish hues.

## INTRODUCTION

Color is one of the most important visual attributes in food and is usually the first one evaluated by consumers. It is associated to the concept of quality and some studies have revealed that the color of citrus beverages are related to the consumer's perception of flavor, sweetness and other quality characteristics (Pangborn 1960; Huggart *et al.* 1977; Tepper 1993). In citrus juices, the natural bright colors are considered one of their main advantages over other juices (Barron *et al.* 1967). However, when assessing consumer's preferences for orange juice (OJ), color has not been usually included as a sensory attribute to evaluate (Birdsall 1955; Luckow and Delahunty 2004; Hoegg and Alba 2007).

OJ color is due to carotenoids, which belong to one of the main classes of natural pigments. Its complex carotenoid profile comprises carotenes and xanthophylls. Some of these compounds ( $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin) has provitamin A activity and they may exhibit other biological activities, like antioxidant and anticarcinogenic activity (Krinsky *et al.* 2004). It ranges from pale yellow at the beginning of the harvest to red-orange at the end. Besides the stage of fruit maturity, other factors such as species, variety and climate may affect the color of OJ (Casas and Mallent 1988). In industrially processed OJs, changes in color can be used as a quality indicator related to carotenoids deterioration during the thermal process (Meléndez-Martínez *et al.* 2009; Fernández-Vázquez *et al.* 2010). Color (other than a sensory



attribute highly appreciated by consumers), is also related to the nutritional value of OJs because it is possible to estimate the hypothetical vitamin A activity expressed as retinol activity equivalents (RAE) from color parameters (Meléndez-Martínez *et al.* 2007). Certain varieties of oranges are becoming increasingly important because of their color. This is the case for blood oranges, whose pulp has a peculiar reddish color (Lee 2001, 2002) or Valencia oranges, appreciated worldwide because of their deep orange color (Francis and Clydesdale 1975; Robards and Antolovich 1995). The color of other varieties has been scarcely studied.

Color can be evaluated by instrumental or visual analysis (Meléndez-Martínez *et al.* 2005b). Human color vision is a quite complex process and color is undoubtedly a perception, a virtual property of the material. Humans and instruments measure color in a different ways: humans see colors in terms of lightness, hue and chroma by integrating complex perceptions. Lightness is the attribute related to the perceived lightness (from black to white stimuli), hue is the attribute according to which colors have been traditionally defined as reddish, greenish, etc. and chroma is the quantitative color attribute. Instruments, on the other hand, are capable of seeing pure values of the chromatic coordinates CIELAB  $L^*$  (lightness), and  $a^*$ ,  $b^*$  coordinates in the absence of the other. The definition of a color appearance requires the transformation of the Cartesian coordinates  $a^*$  (intensity of red/green) and  $b^*$  (intensity of yellow/blue) into the cylindrical coordinates  $C^*_{ab}$  and  $h_{ab}$ , where  $C^*_{ab}$  represents chroma and  $h_{ab}$  represents hue angle. These cylindrical coordinates together with lightness allow the definition of a color (Johnson and Fairchild 2003). These colorimetric variables, together with the color differences, allow us to evaluate the relationships between visual and numerical analyses (Melgosa *et al.* 1997).

The validity of using different instruments for the objective color evaluation of OJ color has been demonstrated (Eagerman 1978; Buslig 1991). The most useful colorimetric measurements are those that are accurate and easily assessed in terms that are visually meaningful. Previous studies suggest (Martínez *et al.* 2001) that spectroradiometric rather than spectrophotometric measurements should be used when correlating with visually perceived attributes. New advances in

image acquisition technology offer the possibility of using technically sophisticated apparatus available at relatively low cost to evaluate color in terms of millions of pixels. The advantage, in comparison with the traditional light sensors, is that they allow us to make a detailed evaluation of a wider area of a food product, with inhomogeneous color possible, and every different color present in the image of the analyzed food matrix can be accounted for by one or more pixels (Antonelli *et al.* 2004). This is based upon digital cameras, which can quickly capture images in digital format without film processing. Application of digital image (DigiEye analysis) offers a more reliable measurement of the food color, which can be correlated with sensory analysis. To date, its utility to evaluate OJ color in comparison with other traditional methods and its correlation with visual color assessment has not been evaluated.

The objectives of this study were to characterize the color of the juice from five orange varieties and to explore the relationship between instrumental and sensory evaluation of the color attributes (lightness, chroma and hue) quantified by trained assessors. Also, consumers' preferences for color were evaluated. The relationship between color preferences in relation to the nutritional value (provitamin A activity) of the OJs was also explored.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

Five orange varieties (Table 1) were harvested in an agricultural experimental field situated in the south of Spain in November 2009. At the harvesting date, a sample of about 3 kg of each variety of oranges was taken randomly from several trees of each variety. OJs were obtained at the laboratory using a domestic kitchen juicer. The main characteristics of the OJs are summarized in Table 1. The samples were kept at  $-21\text{C}$  until their analysis in the laboratory. Thawing was carried out at room temperature ( $23\text{C}$ ) for 24 h. Acidity and total soluble solids were measured according to AOAC methods (AOAC 1995). The ratio was calculated by dividing the total soluble solids by the acidity.

**TABLE 1.** CHARACTERISTICS OF THE ORANGE VARIETIES STUDIED

Code	Variety	Acidity*	Total soluble solids†	Ratio	RAE
NF	Navel foyos	0.56	10.76	19.12	77.83
F	Fisher	0.52	10.76	20.51	115.02
NP	Navel Powell	0.49	10.12	20.27	99.72
VM	Valencia Midknight	0.77	8.16	10.62	129.79
RL	Rohde late	0.92	11.41	12.37	185.30
Mean		0.66	10.24	16.58	121.53

\* Grams of citric acid per 100 mL of orange juice.

† Expressed as °Brix.

RAE, retinol activity equivalent (RAE  $\text{L}^{-1}$ ).

## Instrumental Color Measurements

For color specifications, the OJs were placed in 75 mL capacity transparent plastic bottles. The samples were measured against a gray surround and white background using two different techniques: spectroradiometric and image analyses. Global reflection measurements were done in a CAS 140 B spectroradiometer (Instrument Systems, Munich, Germany) with an external incandescent lamp, equipped with a Top 100 telescope optical probe (Instrument Systems, Munich, Germany) and a Tamron zoom mod. SP 23A (Tamron USA, Inc., Commack, NY, USA). All the instrumental measurements were carried out with dim ambient illumination to avoid possible interferences from external sources. In addition to this, bottles were placed inside a cabin with middle gray walls ( $L^* = 50$ ) to which the external illumination source of the spectroradiometer was attached. The zoom, to which the probe was attached, was held at a fixed distance of 50 cm in a straight line from the sample. Regarding geometry of presentation, 45° incident illumination was used throughout the experiment. The spectroradiometer was set to take three consecutive measurements of each sample, and color coordinates obtained were averages of three measurements. The whole visible spectrum (380–770 nm) was recorded and Illuminant D65 and 10° Observer were considered as references. Blank measurements were made using distilled water against the same background and surround.

Digital images were made in order to obtain the total appearance of juice at depths observed by consumers. The DigiEye imaging system (Luo *et al.* 2001) was used to capture the digital images. The latter system includes a calibrated digital camera 10.2-megapixel Nikon D80 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) and an objective Nikkor 35-mm f/2D (Nikon Corporation), a color sensor for display calibration, and an illumination box designed by VeriVide Ltd. (Leicester, UK). In these measurements, the samples were illuminated by a diffuse D65 simulator.

For obtaining CIELAB coordinates from RGB color space, the DigiFood software (Heredia *et al.* 2006) was used.

From the CIELAB uniform color space, the psychophysical parameters chroma ( $C^*_{ab}$ ) and hue ( $h_{ab}$ ) are defined as:

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}, h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$$

Chroma ( $C^*_{ab}$ ) is used to determine the degree of difference of a hue in comparison with a gray color with the same lightness, and is considered the quantitative attribute of colorfulness. Hue ( $h_{ab}$ ) is the attribute according to which colors are usually defined as reddish, greenish, etc. and is used to define the difference of a color with reference to a gray color with the same lightness. This attribute is related to the differences in reflectance at different wavelengths and is considered the qualitative attribute of color.

Color differences, which are very important to evaluate relationships between visual and numerical analyses (Melgosa *et al.* 1997), are calculated as the Euclidean distance between two points in the 3-D space defined by  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ :

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

## Assessment of Vitamin A Activity from Objective Color Measurements

The vitamin A activity of the samples was expressed in terms of RAE, considering the equivalences 1 RAE = 12 µg of dietary all-*trans*-β-carotene = 24 µg of other dietary provitamin A carotenoids (*dietary*) (Trumbo *et al.* 2001).

Estimation was done as described elsewhere (Meléndez-Martínez *et al.* 2007) according to the following equation:

$$RAE = -8.8961 \times h_{ab} + 781.8687$$

## Sensory Analysis

A trained panel, consisting of 18 panelists aged between 30 and 45 with normal color vision (which was verified using the Farnsworth–Munsell 100 Hue Test) and experienced in both visual assessments of color and Tristimulus Colorimetry concepts, was used to establish the correlation between instrumental and sensory evaluation of OJ color.

Panelists were trained in five 1-h sessions over 2 weeks. In each session, they were asked to evaluate a selection (5–7) of commercial OJs (selected to cover a full range of OJs color) in hue, lightness and chrome attributes on a continuous scale of 10 cm, anchored at the ends (0–10). In order to standardize evaluation criteria at the end of each session, results were discussed considering the objective data for each attribute calculated by tristimulus colorimetry. The repeatability and the reproducibility values of the panel for each attribute were under 20% of coefficient of variations (relative standard deviation).

Visual analyses of the samples were carried out within a room provided with a VeriVide Portable Color Assessment Cabinet (VeriVide Ltd., Leicester, UK) with D65 source to control illumination and observation conditions. Five bottles of transparent plastic containing 75 mL of the OJs were placed in each cabin randomly. Before each visual analysis all the bottles were shaken to homogenize pulp content. The panelists were asked to order the samples in an ever-increasing degree of hue (yellowish–reddish), chroma (dull–vivid) and lightness (clear–dark). Afterwards, they were also asked to score the colorimetric parameters on a continuous scale of 10 cm, anchored at the ends.

## Consumer Preference Study

Consumer test was performed by 111 panelists recruited among students and personnel of the Faculty of Pharmacy in

**TABLE 2.** COMPOSITION OF THE CONSUMER POPULATION SAMPLED

	Under 20	20–29	Over 30	Total
Female	15	50	13	78 (70%)
Male	4	24	5	33 (30%)
	19 (17%)	74 (67%)	18 (16%)	111 (100%)

Sevilla. They were grouped into six categories based on gender (male and female) and age (<20, 20–29 and over 30 years old) (Table 2). The consumer test was carried out in sensory booths under white light (ISO 1988). The consumers were given two sets of questionnaires. Prior to sample presentation, they answered a questionnaire designed to collect demographic data and consumer habits related to OJ consumption.

In the second questionnaire consumers were asked to order the OJs samples for the overall preference related to color (from the least to the most preferred). The ranking decision was based only on the color characteristics, without further information. For data analysis, 1 point was given to the least preferred sample and 5 points to the most preferred

**Data Analysis**

Instrumental color measurements data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and the Tukey least significant difference multicomparison test to determine significant differences among OJ samples.

To analyze differences in the color parameters evaluated by the panelists and the consumer preference-ranking test, the Friedman rank sum was performed (O’Mahony 1986), using a significance level ( $P < 0.05$ ) to determine whether the panelists were able to discriminate between samples. Fisher Test was used to determine whether significant differences

( $P < 0.05$ ) existed between OJ samples. Cluster analysis was applied to find out consumers’ segmentation in relation to OJ color preference.

Simple regression analysis was conducted between scores given by the panelists and the instrumental data.

These analyses were performed using Statistica 8 for Windows (StatSoft 2007).

**RESULTS AND DISCUSSION**

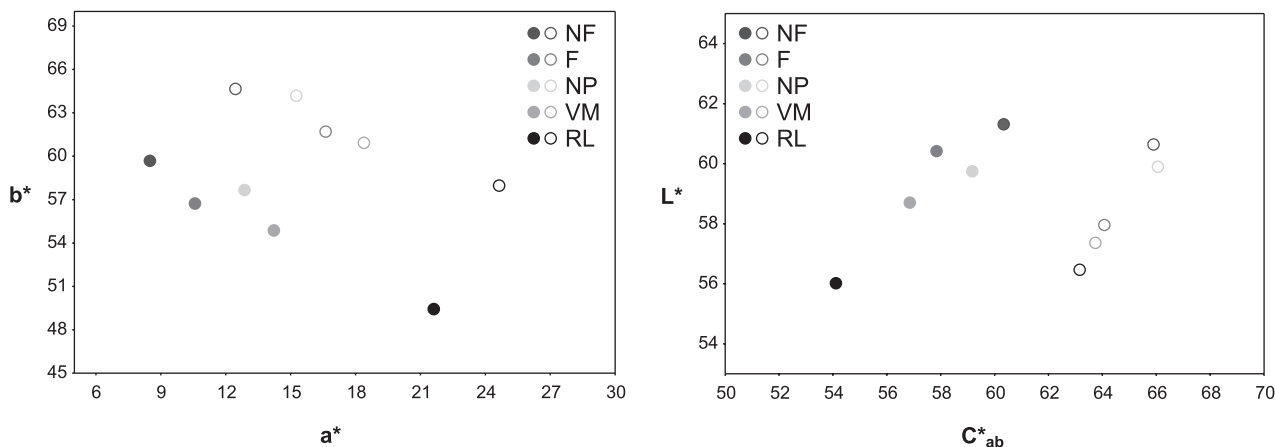
**Instrumental Color Characterization**

The orange varieties included in this study were collected during the stage of optimum maturity. As shown in Table 1, the mean values for soluble solid content were very close. Because of the influence of the pulp content in the final color, the OJs were passed through a sieve in order to have a similar pulp content (mean = 4.65% ± 1.63).

In Fig. 1, the CIELAB color space ( $a^*b^*$  and  $C^*_{ab}L^*$  planes) illustrates the color of the five orange varieties included in this study and measured by both methods (spectroradiometer and DigiEye). The values of the coordinate  $L^*$  ranged from 56.09 in the lighter OJ to 61.34 in the darker one;  $C^*_{ab}$  ranged from 54.03 in the dullest OJ to 60.29 in the most vivid, and  $h_{ab}$  ranged from 66.43 for the most reddish to 81.99 in the most yellow, measured by image analyses.

In the spectroradiometric analyses, values ranged from 56.58 to 60.66 for  $L^*$ , from 63.11 to 66.02 for  $C^*_{ab}$  and from 66.43 to 81.99 for  $h_{ab}$ . ANOVA (Table 3) showed that the five varieties were significantly different in  $h_{ab}$ , the qualitative component of color, but not in  $C^*_{ab}$ , the quantitative component of color, or in lightness.

The slight variations observed in the color coordinates values measured by both techniques were significant



**FIG. 1.** COLOR COORDINATES OF ORANGE JUICE SAMPLES IN THE  $a^*b^*$  AND  $C^*_{ab}L^*$  PLANES. MEASUREMENTS MADE BY SPECTRORADIOMETRY ○ AND IMAGE ANALYSE ● TECHNIQUES

**TABLE 3.** COLOR COORDINATES AND MEAN  $\Delta E^*_{ab}$  VALUES (OF EACH VARIETY IN RELATION TO THE REST) OF THE VARIETIES MEASURED IN THE SPECTRORADIOMETER (A) AND BY IMAGE ANALYSIS (B)

Varieties	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C^*_{ab}$	$h_{ab}$	$\Delta E^*_{ab}$
(A)						
NF	60.66 ± 0.121 <sup>a</sup>	12.40 ± 0.476 <sup>a</sup>	64.66 ± 0.356 <sup>a</sup>	65.84 ± 0.260 <sup>a</sup>	79.14 ± 0.465 <sup>a</sup>	6.518
F	57.99 ± 0.212 <sup>b</sup>	16.61 ± 0.180 <sup>b</sup>	61.80 ± 0.076 <sup>b</sup>	63.99 ± 0.027 <sup>b</sup>	74.96 ± 0.174 <sup>b</sup>	5.015
NP	59.96 ± 0.230 <sup>a</sup>	15.21 ± 0.238 <sup>c</sup>	64.24 ± 0.560 <sup>a</sup>	66.02 ± 0.490 <sup>a</sup>	76.68 ± 0.313 <sup>c</sup>	5.814
VM	57.41 ± 0.090 <sup>bc</sup>	18.29 ± 0.096 <sup>d</sup>	60.98 ± 0.143 <sup>b</sup>	63.66 ± 0.109 <sup>b</sup>	73.30 ± 0.120 <sup>d</sup>	4.484
RL	56.48 ± 0.723 <sup>c</sup>	24.60 ± 0.141 <sup>e</sup>	58.12 ± 0.150 <sup>c</sup>	63.11 ± 0.084 <sup>b</sup>	67.06 ± 0.171 <sup>e</sup>	8.388
(B)						
NF	61.34 ± 0.297 <sup>a</sup>	8.40 ± 0.513 <sup>a</sup>	59.70 ± 0.501 <sup>a</sup>	60.29 ± 0.529 <sup>a</sup>	81.99 ± 0.460 <sup>a</sup>	8.508
F	60.43 ± 0.284 <sup>a</sup>	10.48 ± 0.891 <sup>b</sup>	56.87 ± 0.484 <sup>b</sup>	57.84 ± 0.577 <sup>bc</sup>	79.57 ± 0.828 <sup>b</sup>	6.163
NP	59.77 ± 0.280 <sup>ab</sup>	12.77 ± 0.380 <sup>c</sup>	57.73 ± 0.365 <sup>b</sup>	59.12 ± 0.364 <sup>ac</sup>	77.53 ± 0.370 <sup>c</sup>	5.852
VM	58.75 ± 0.240 <sup>b</sup>	14.17 ± 0.487 <sup>d</sup>	55.01 ± 0.628 <sup>b</sup>	56.81 ± 0.605 <sup>b</sup>	75.55 ± 0.519 <sup>d</sup>	6.295
RL	56.09 ± 0.388 <sup>c</sup>	21.61 ± 0.483 <sup>e</sup>	49.52 ± 0.559 <sup>c</sup>	54.03 ± 0.626 <sup>d</sup>	66.43 ± 0.418 <sup>e</sup>	13.430

<sup>a-e</sup> Different superscripts within columns for each method indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

( $P < 0.05$ ) only in the case of  $b^*$  and  $C^*_{ab}$ . Instrumental measurements are considered an accurate and suitable method for evaluating color in food, as it has already been reported for wine (Martínez *et al.* 2001). However, there are significant differences between measurements, depending on the technique used. They maybe related mainly to differences in the thickness of the measured sample or other secondary factors such as illumination conditions, or the effect of the surface of the container. In this sense, it is interesting to compare different techniques in order to find out the one that best correlate with sensory evaluation.

### Correlations between Sensory and Instrumental Evaluation of OJ Color

Few studies have addressed the correlation between the visual evaluation and the instrumental measurements of OJs color (Huggart *et al.* 1966; Meléndez-Martínez *et al.* 2005a). In this study, we aimed at evaluating the psychophysical parameters of color in terms of lightness, hue and chroma, which is a step toward to the global evaluation of color in terms of a subjective color sensation. For that reason, the panel was trained in the tristimulus colorimetry concepts of lightness, hue and chroma, and was trained on these concepts in OJs. They were asked to evaluate the color attributes (lightness, hue and chroma) separately by sorting the OJs to an ever-increasing degree of hue (yellowish–reddish), chroma (dull–vivid) and lightness (clear–dark).

When these evaluations were compared with the instrumental measurements, the results showed that judges were able to order the OJs correctly based on hue ( $h_{ab}$ ) and lightness ( $L^*$ ). According to hue (yellowish–reddish), all the samples were correctly ordered, except the samples Fisher (F) and Navel Powell (NP). According to  $L^*$ , 17% of the panel was able to order the samples correctly while 83% ordered

correctly only the samples with  $\Delta L^* > 0.663$ . According to chrome ( $C^*_{ab}$ ) only 17% of the OJs were ordered properly.

In order to explain these results, the instrumental color differences ( $\Delta E^*_{ab}$ ) were calculated. The mean  $\Delta E^*_{ab}$  values for OJs are shown in Table 3. The individual  $\Delta E^*_{ab}$  ranged between 2.9–11.7 (calculated for the spectroradiometer) and 2.5–14 (calculated for the DigiEye). These values are over the range 0.38–0.73 CIELAB units, and over 1.75 CIELAB units, which are considered as the threshold and suprathreshold color difference, respectively (Martínez *et al.* 2001). From an industrial point of view, the ranges of color differences 1.1–2.8 and 2.8–5.6 CIELAB units correspond with rigorous and normal tolerances, respectively, whereas color differences over 5.6 CIELAB units ought to be easily distinguished (Lozano 1978; Melgosa *et al.* 1997, 2001).

To further understand the contradictory results related to chroma, the CIELAB color difference,  $\Delta E^*_{ab}$ , was split in the three components; lightness difference ( $\Delta L^*$ ), chroma difference ( $\Delta C^*_{ab}$ ) and hue difference ( $\Delta H^*_{ab}$ ). Figure 2 shows the contribution (as percentage) of each component to the total color differences detected in each comparison. It can be observed that the main contribution to the whole color difference was related to the qualitative component of color ( $\Delta H^*_{ab}$ ), as previously discussed.

Accordingly, when they had to score the different OJs according to the intensity of the color attributes, they scored as significantly different all the OJs according to  $h_{ab}$  (from the most yellowish [NF, Navel Foyos] to the most reddish [RL, Rohde Late]), and  $L^*$  (from the highest [NF] to the darkest [RL]). But, as expected, only some varieties were scored as different ( $P < 0.05$ ) according to  $C^*_{ab}$  (Table 4). This may be due to the low chrome differences among samples ( $\Delta C^*_{ab}$  ranged 1.03–2.77) and consequently to the lower contribution of this color parameter to the total color differences (Fig. 2). As previously stated by other authors (Shewfelt *et al.* 1987), hue

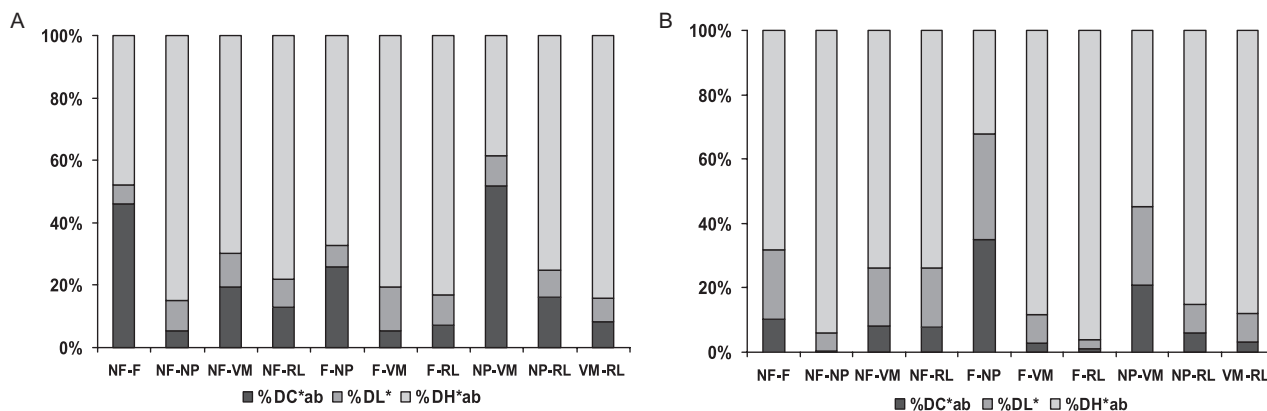


FIG. 2. CONTRIBUTION OF  $\Delta C^*_{ab}$ ,  $\Delta L^*$  AND  $\Delta H^*_{ab}$  TO COLOR DIFFERENCES AMONG SAMPLES (A) DIGIEYE AND (B) SPECTRORADIOMETER

differences are much more easily detected than variations in chroma or lightness.

The correlations between the score values given by the panelists and the instrumental measurements were also explored (Table 5). The qualitative color attribute  $h_{ab}$  was better correlated with the spectroradiometer measurements than with DigiEye, while for Lightness, the correlations were the other way round. The visual evaluation of  $C^*_{ab}$  was not correlated with any of the instrumental measurements, probably because of the fact that it is not an intuitive attribute. These results indicate that this would not be a good parameter to take into account for the visual discrimination of OJs color.

**Consumers' Preference Ranking Test.** A consumer panel was used to investigate color preferences. 77.5% of consumers declared to be habitual consumers of OJ. Of these, 73% showed a clear preference for freshly squeezed, while the rest preferred the commercial OJ and 5% consumed both.

**Preference Rank.** Figure 3 shows the frequencies of the preference rank for each sample. For the varieties NF, F, NP and Valencia Midnight (VM), the mode is unique but the frequencies are not normally distributed. For RL two modes are observed, which suggests a mixture of two distributions rather than a unique distribution; this means that the group of 111 consumers could be divided into subgroups, one that preferred the samples color and one that did not. To further explore the population's segmentation, a cluster analysis was conducted (results are shown below).

**Sample Ranking Test.** Table 6 shows the preference data for the consumers' panel and the rank sums grouped by age, sex and consumption habits. The preferred samples were the most orangish variety VM, followed by F (without significant differences between them), while the least rated was sample NF, clearly different of the rest, because it received the lowest scores in all age groups of the population. A significant preference ( $P < 0.05$ ) was observed for the OJs with intermediate  $h_{ab}$  and  $L^*$  values: VM and F. On the other hand, the least preferred OJ was the one with the highest lightness and hue values, the most yellowish, the NF variety, clearly different from the rest. Moreover this sample showed the lowest RAE value (Table 1).

According to gender, it was observed that the most preferred variety in both groups was one with orangish hue (VM), followed by the most reddish (RL) in the men's group, and the one with an intermediate hue in women (F). Women and men under age 20 did not record significant differences between samples. Regular and nonregular consumers of OJs also showed significant differences in preferences. While the first group significantly preferred a variety with an orangish hue VM, the second one did not show a significant preference for any variety, rather all three of them equally: F, VM and RL.

Consumers under 20 and over 30 years showed a clear preference for the most reddish (RL) sample, which was also the sample with highest RAE value (Table 1) and so with the highest nutritional value for retinol. The intermediate group (20–29) preferred other varieties and the most reddish (RL) was the least preferred.

TABLE 4. MEAN SCORES FOR THE COLORIMETRIC PARAMETERS GIVEN BY THE PANEL

	RL	NF	F	VM	NP
$h_{ab}$	7.88 ± 1.36 <sup>a</sup>	1.55 ± 0.90 <sup>b</sup>	4.27 ± 1.18 <sup>c</sup>	5.63 ± 1.31 <sup>d</sup>	2.97 ± 1.05 <sup>e</sup>
$L^*$	7.98 ± 1.41 <sup>a</sup>	2.34 ± 1.00 <sup>b</sup>	4.39 ± 1.38 <sup>c</sup>	6.12 ± 1.05 <sup>d</sup>	3.92 ± 1.03 <sup>c</sup>
$C^*_{ab}$	5.65 ± 2.58 <sup>a</sup>	5.89 ± 2.43 <sup>a</sup>	4.76 ± 1.50 <sup>ab</sup>	3.64 ± 1.60 <sup>b</sup>	4.67 ± 1.83 <sup>ab</sup>

<sup>a-e</sup> Different superscripts within rows indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).



**TABLE 5.** SIMPLE REGRESSION COEFFICIENTS (*r*) AND SIGNIFICANCE LEVELS (*P*) BETWEEN INSTRUMENTAL AND SENSORY EVALUATION OF COLOR

Parameter	Spectroradiometer measurement	Image analyses
Lightness ( <i>L</i> *)	-0.94 (0.018)	-0.96 (0.008)
Chroma ( <i>C</i> * <sub>ab</sub> )	0.22 (0.717)	0.069 (0.911)
Hue ( <i>h</i> <sub>ab</sub> )	-0.98 (0.002)	-0.92 (0.026)

In this study, we have only evaluated color and not other sensory attributes that could be influenced by the color variations observed. Previous studies by Tepper (1993) demonstrated that slight color variations in OJs reduce consumers' acceptance of the color of the samples but had little influence on the rating of flavor, sweetness or overall liking. This and previous studies indicates that color variable become less significant when considered in the context of other attributes.

*Consumers' Segmentation.* To find out if there were groups of consumers differing in their preferences for OJ color, a segmentation of the panel group was done by Cluster analysis (Vigneau *et al.* 2007). The results are shown in Fig. 4. Three groups of consumers were clearly identified. Rank sums for each segment are shown in Table 7. The first segment (21.62%) showed a clear preference for the sample NF followed by *F* while in the second segment (45.05%) significantly preferred RL and the worst evaluated was NF. Curiously these were the samples with the highest and lowest RAE values, respectively (Table 1). The third segment (33.33% of consumers) gave the highest punctuation to the

**TABLE 6.** PREFERENCE DATA: RANK SUMS GROUPED BY AGE SEX AND CONSUMPTION HABITS

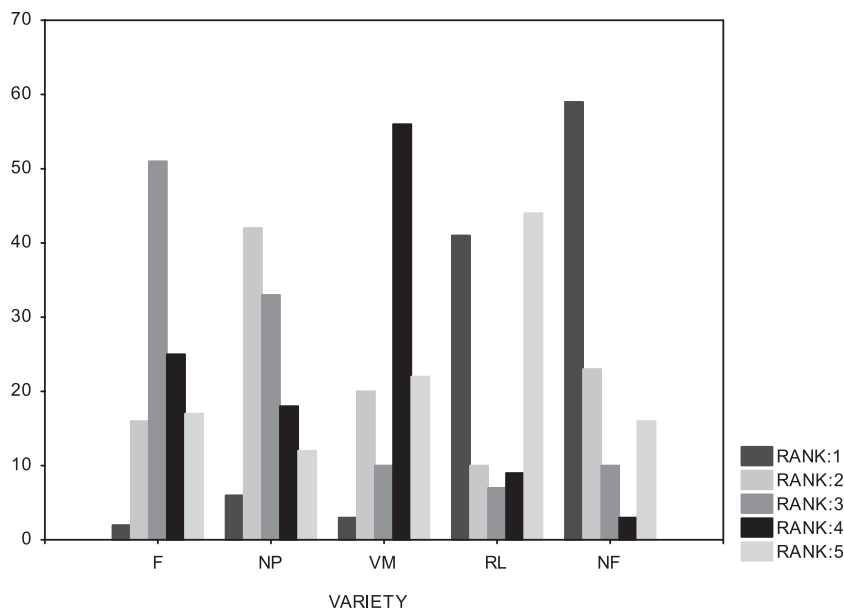
	<i>n</i>	NF	<i>F</i>	NP	VM	RL
All	111	227 <sup>a</sup>	372 <sup>b</sup>	321 <sup>c</sup>	407 <sup>b</sup>	338 <sup>bc</sup>
By gender						
Women	78	151 <sup>a</sup>	270 <sup>b</sup>	228 <sup>c</sup>	286 <sup>b</sup>	222 <sup>c</sup>
Men	33	63 <sup>a</sup>	102 <sup>bc</sup>	93 <sup>c</sup>	121 <sup>b</sup>	116 <sup>b</sup>
By gender and sex						
W < 20	15	38 <sup>a</sup>	44 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>	49 <sup>a</sup>
M < 20	4	8 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>
W 20–29	50	100 <sup>a</sup>	181 <sup>b</sup>	386 <sup>c</sup>	186 <sup>b</sup>	144 <sup>c</sup>
M 20–29	24	49 <sup>a</sup>	75 <sup>bc</sup>	69 <sup>c</sup>	88 <sup>bd</sup>	79 <sup>cd</sup>
W > 30	13	26 <sup>a</sup>	45 <sup>bc</sup>	46 <sup>bc</sup>	49 <sup>c</sup>	29 <sup>a</sup>
M > 30	5	6 <sup>a</sup>	16 <sup>bc</sup>	13 <sup>b</sup>	19 <sup>bc</sup>	21 <sup>c</sup>
By consumption habits						
Regular consumers of OJ	86	186 <sup>a</sup>	282 <sup>b</sup>	250 <sup>b</sup>	319 <sup>c</sup>	254 <sup>b</sup>
Commercial OJ	19	45 <sup>a</sup>	57 <sup>ab</sup>	59 <sup>ab</sup>	66 <sup>b</sup>	58 <sup>ab</sup>
Fresh home squeezed OJ	63	137 <sup>a</sup>	212 <sup>b</sup>	179 <sup>c</sup>	238 <sup>b</sup>	179 <sup>c</sup>
Any	4	4 <sup>a</sup>	13 <sup>b</sup>	11 <sup>b</sup>	15 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>
No regular consumer	25	41 <sup>a</sup>	90 <sup>b</sup>	72 <sup>c</sup>	88 <sup>bc</sup>	84 <sup>bc</sup>

Ranking preference: 1 the lowest, 5 the highest preferred.

<sup>a-d</sup> Different superscripts in rows indicate statistically significant differences (*P* < 0.05).

OJ, orange juice.

sample VM (with intermediate RAE value). These observations give additional information to the general results discussed earlier. For instance, although the most yellowish OJ (NF) was the worst evaluated for all the groups, one group of consumers (segment 1; 21.62%) showed a clear preference for this variety. Therefore there was a group of consumers that showed a preference for the yellowish samples, another more numerous group that preferred samples with intermediate *h*<sub>ab</sub>



**FIG. 3.** FREQUENCY DISTRIBUTION OF OVERALL PREFERENCES FOR JUICE COLOR IN DIFFERENT ORANGE VARIETIES. SAMPLES CODES IN TABLE 1

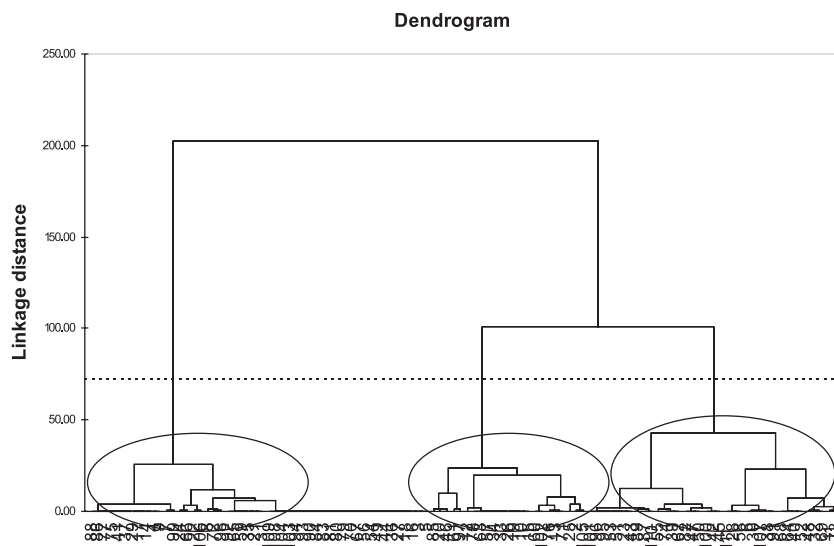


FIG. 4. DENDROGRAM OF CONSUMERS ( $N = 111$ )

and  $L^*$  values (VM) and other group (45.05%) for which the favorite sample was the most reddish (RL), with the highest RAE value. The three consumer clusters did not differ in terms of gender or age, indicating that these variables did not influence color preference patterns. Previous studies on consumer's color acceptance of a different product (strawberry nectar from puree) showed similar results, where neither gender nor age or consumption habits had significant impact on color acceptance (Gossinger *et al.* 2009).

## CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

In this study correlational associations between panelists' color evaluation and the instrumental values showed that the psychological qualitative color attribute  $h_{ab}$  is well correlated with the spectroradiometer measurements while lightness was better correlated with the DigiEye measurements. However, these results indicate that the quantitative color attribute chroma does not seem to be very intuitive for the judges, so it is not well evaluated visually, and no correlation with instrumental measurement was observed.

TABLE 7. RANK SUMS FOR DIFFERENT SEGMENTS OF CONSUMERS

Samples	SEGMENTS		
	1 ( $n = 24$ ) 21.62%	2 ( $n = 50$ ) 45.05%	3 ( $n = 37$ ) 33.33%
NF	104 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	63 <sup>a</sup>
F	86 <sup>a</sup>	139 <sup>b</sup>	147 <sup>b</sup>
NP	78 <sup>b</sup>	107 <sup>c</sup>	136 <sup>b</sup>
VM	51 <sup>c</sup>	205 <sup>d</sup>	147 <sup>b</sup>
RL	41 <sup>d</sup>	239 <sup>e</sup>	58 <sup>a</sup>

Ranking preference: 1 the lowest, 5 the highest.

<sup>a-d</sup> Different superscripts in columns indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

When evaluating consumers' preferences, no clear preference for any one of the varieties was observed although, in general, it seems that consumers prefer samples with orangish hue.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by funding from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía by the project P08-AGR-03784. RFV holds a grant from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

## REFERENCES

- ANTONELLI, A., COCCHI, M., FAVA, P., FOCA, G., FRANCHINI, G.C., MANZINI, D. and ULRICI, A. 2004. Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm. *Anal. Chim. Acta* 515, 3–13.
- AOAC 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed.
- BARRON, R.W., MARAULJA, M.D. and HUGGART, R.L. 1967. Instrumental and visual methods for measuring orange juice color. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 80, 308–311.
- BIRDSALL, L. 1955. Consumer preferences in citrus juices. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 68, 133–136.
- BUSLIG, B.S. 1991. Orange juice color measurement with a sphere spectrophotometer. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 104, 131–134.
- CASAS, A. and MALLENT, D. 1988. El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, de la variedad y de la temperatura. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.* 28, 184–202.

- EAGERMAN, B.A. 1978. Orange juice color measurement using general purpose tristimulus colorimeters. *J. Food Sci.* 43, 428–430.
- FERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, R., STINCO, C., MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., HEREDIA, F.J. and VICARIO, I.M. 2010. Orange juice color: Visual evaluation and consumer preference. AIC 2010 Color and Food, Interim Meeting of the International Color Association, 357–360.
- FRANCIS, F.J. and CLYDESDALE, F.M. 1975. *Food Colorimetry: Theory and Applications*, AVI Publ. Co., Westport CT.
- GOSSINGER, M., MAYER, F., RADOCHAN, N., HÖFLER, M., BONER, A., GROLLE, E., NOSKO, E., BAUER, R. and BERCHOFER, E. 2009. Consumer's color acceptance of strawberry nectars from puree. *J. Sensory Studies* 24, 78–92.
- HEREDIA, F.J., GONZÁLEZ-MIRET, M.L., ÁLVAREZ, C. and RAMÍREZ, A. 2006. DigiFood® (Análisis de imagen).
- HOEGG, J. and ALBA, J.W. 2007. Taste perception: More than meets the tongue. *J. Consum. Res.* 33, 490–498.
- HUGGART, R.L., BARRON, R.W. and WENZEL, F.W. 1966. Evolution of the Hunter Citrus Colorimeter for measuring the color of orange juice. *Food Technol.* 20, 109–111.
- HUGGART, R.L., PETRUS, D.R. and BUZZ LIG, B.S. 1977. Color aspects of Florida commercial grapefruit juices. *Proc. Florida State Hort. Soc.* 90, 173–175.
- JOHNSON, G.M. and FAIRCHILD, M.D. 2003. Visual psychophysics and color appearance. In *Digital Color Imaging Handbook* (G. Sharma ed.) pp. 115–171, CRC Press, Boca Raton, FL.
- KRINSKY, N., MAYNE, S.T. and SIES, H. 2004. *Carotenoids in Health and Disease*, Marcel Dekker, New York, NY.
- LEE, H.S. 2001. Characterization of carotenoids in juice of red navel orange (Cara Cara). *J. Agric. Food Chem.* 49, 2563–2568.
- LEE, H.S. 2002. Characterization of major anthocyanins and the color of red-fleshed Budd blood orange (*Citrus sinensis*). *J. Agric. Food Chem.* 50, 1243–1246.
- LOZANO, R.D. 1978. *El Color Y Su Medición*. Americalee, Buenos Aires.
- LUCKOW, T. and DELAHUNTY, C. 2004. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Res. Int.* 37, 805–814.
- LUO, M.R., CUI, C.G. and LI, C. 2001. British Patent Entitled apparatus and method for measuring colour (DigiEye System), 0124683.4.
- MARTÍNEZ, J.A., MELGOSA, M., PÉREZ, M.M., HITA, E. and NEGUERUELA, A.I. 2001. Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci. Technol. Int.* 7, 439–444.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., VICARIO, I.M. and HEREDIA, F.J. 2005a. Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: Effect of the background. *Food Qual. Prefer.* 16, 471–478.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., VICARIO, I.M. and HEREDIA, F.J. 2005b. Instrumental measurement of orange juice colour: A review. *J. Sci. Food Agric.* 85, 894–901.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., VICARIO, I.M. and HEREDIA, F.J. 2007. Rapid assessment of vitamin A activity through objective color measurements for the quality control of orange juices with diverse carotenoid profiles. *J. Agric. Food Chem.* 55, 2808–2815.
- MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.J., VICARIO, I.M. and HEREDIA, F.J. 2009. Effect of ascorbic acid on deterioration of carotenoids and colour in ultrafrozen orange juice. *J. Food Compos. Anal.* 22, 295–302.
- MELGOSA, M., HITA, E., POZA, A.J., ALMAN, D.H. and BERNS, R.S. 1997. Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. *Color Res. Appl.* 22, 148–155.
- MELGOSA, M., PÉREZ, M.M., YEBRA, A., HUERTAS, R. and HITA, E. 2001. Algunas reflexiones y recientes recomendaciones internacionales sobre evaluación de diferencias de color. *Opt. Pura Apl.* 34, 1–10.
- O'MAHONY, M. 1986. *Sensory Evaluation of Food: Statistical Methods and Procedures*, Marcel Dekker, New York, NY.
- PANGBORN, R.M. 1960. Influence of color on the discrimination of sweetness. *Am. J. Psychol.* 73, 229–238.
- ROBARDS, K. and ANTOLOVICH, M. 1995. Methods for assessing the authenticity of orange juice. A review. *Analyst* 120, 1–28.
- SHEWFELT, R.L., PRUSSIA, S.E., RESURRECCION, A.V., HURST, W.C. and CAMPBELL, D.T. 1987. Quality changes of vine-ripened tomatoes within the postharvest handling system. *J. Food Sci.* 52, 661–664.
- STATSOFT, I. 2007. STATISTICA, version 8.0.
- TEPPER, B.J. 1993. Effects of a slight color variation on consumer acceptance of orange juice. *J. Sensory Studies* 8, 145–154.
- TRUMBO, P., YATES, A.A., SCHILICKER, S. and POOS, M. 2001. Dietary reference intakes: Vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet. Assoc.* 101, 294–301.
- VIGNEAU, E., QANNARI, E.M., PUNTER, P.H. and KNOOPS, S. 2007. Segmentation of a panel of consumers using clustering of variables around latent directions of preference. *Food Qual. Prefer.* 12, 359–363.





### **Capítulo 3: EVALUACIÓN VISUAL DEL ZUMO DE NARANJA: ENTRENAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE UMBRAL.**

#### **ANTECEDENTES**

El color puede ser evaluado instrumental o visualmente. La medida instrumental del color normalmente requiere aparatos que no están siempre disponibles en las pequeñas y medianas industrias, por lo que la evaluación visual puede suponer una buena alternativa.

Al objeto de usar el análisis visual como un control objetivo de calidad, es necesario estandarizar las condiciones de medida para poder establecer comparaciones con las medidas instrumentales. Algunos estudios previos han mostrado que una buena correlación puede obtenerse cuando las medidas instrumentales y sensoriales se realizan considerando distintos aspectos como el fondo, el entorno, o la iluminación (Fernández-Vázquez y col., 2011; Meléndez-Martínez y col., 2005). Sin embargo, aunque la evaluación del color se incluye en numerosos estudios sensoriales, (Calvo y col., 2001; Frata y col., 2006; Poelman y Delahunty, 2011), hay muy pocos trabajos que incluyan un entrenamiento específico para su valoración en los alimentos de una forma detallada. Un ejemplo de un entrenamiento específico en la evaluación visual de yogurt de fresa fue llevado a cabo por Gambaro y col. (2001). Basándonos en esta experiencia, hemos entrenado a un panel para evaluar el zumo de naranja (OJ) de una manera fiable y reproducible.

Un aspecto importante en la evaluación visual del color que ha suscitado gran interés es la evaluación de las diferencias de color. Concretamente, las conocidas como “pequeñas diferencias detectables” han sido muy importantes en el desarrollo de la Colorimetría. Así, existen ecuaciones para calcular las diferencias de color en el espacio CIELAB entre dos estímulos colorimétricos, que no son más que expresiones matemáticas que permiten la obtención del número  $\Delta E^*_{ab}$ . Éste, es un número positivo que permanece invariable cuando los productos son intercambiados (Melgosa y col., 2001).

Hoy por hoy, el cálculo de las diferencias de color tiene muchas aplicaciones en la Colorimetría, como por ejemplo, en la reproducibilidad del color en la fabricación de productos y sistemas de comunicación, o el estudio de la decoloración de los alimentos, las obras de arte, etc. o incluso, más recientemente, se ha aplicado en la determinación de la tolerancia de variaciones de color en el OJ por parte del consumidor (Wei y col., 2012).

Uno de los problemas clave en la evaluación visual del color es el establecimiento del umbral de diferenciación entre dos productos con colores similares. Algunos trabajos previos han estudiado los umbrales de diferenciación utilizando diferentes patrones de color (Berns y col., 1991; Martínez y col., 2001) y además, Martínez y col. (2001) publicaron un estudio para establecer el umbral para la discriminación visual entre vinos.

Recientemente Wei y col. (2012) establecieron cual sería el color ideal de un OJ y la tolerancia del consumidor a las modificaciones de éste, usando la visualización digital. Sin embargo, hasta el momento, la literatura referida al OJ no recoge datos sobre las diferencias de color que pueden ser detectadas entre dos OJs basándose en muestras reales, aunque este tipo de información podría ser muy útil para la industria de cítricos.

## **OBJETIVOS**

En este trabajo se han planteado dos objetivos generales: El primero de ellos se refiere al desarrollo de un entrenamiento específico para evaluar el color del OJ visualmente, mientras que el segundo pretende estudiar los umbrales de diferenciación visual en esta bebida.

Los objetivos concretos planteados en este trabajo fueron:

- Establecer un protocolo específico de entrenamiento visual para la evaluación del OJ.
- Comprobar la eficacia de dicho entrenamiento.

- Estudiar las diferencias de color entre OJs que pueden ser percibidas por un panel de observadores entrenado.
- Estudiar las diferencias de color entre OJs que pueden ser percibidas por un panel de observadores no entrenado.
- Proponer umbrales de diferenciación del color en OJs en ambos paneles.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Medidas instrumentales del color*

Todas las muestras utilizadas en este trabajo fueron colocadas en botes de plástico de 75 mL de capacidad para evaluarlas colorimétricamente mediante análisis de imagen (Sistema DigiEye, VeriVide Ltd., Leicester, Reino Unido) utilizando un entorno gris y un fondo blanco.

### *Entrenamiento del panel*

Se diseñó un protocolo para la selección y entrenamiento de los jueces, basándonos en el trabajo de Gambaro y col. (2001). Todas las pruebas sensoriales de este trabajo fueron llevadas a cabo en una cabina VeriVide CAC Portable cabinet (dimensiones del área de visión: 635 mm anchura, 280 mm altura, y 280 mm profundidad) para controlar las condiciones de iluminación y observación. Se eligió el simulador de D65 como fuente de iluminación y, fondo blanco y entorno gris, para las medidas objetivas hechas mediante análisis de imagen. Además se utilizó el mismo recipiente que en las medidas instrumentales.

La selección del panel se realizó partiendo de 12 catadores, a los que se les realizó la prueba Farnsworth-Munsell 100-Hue Test para verificar que todos ellos poseían una visión normal. Seguidamente se eliminó a los panelistas que no presentaron buenas habilidades para detectar ligeras diferencias de tono e intensidad. Para ello se usaron diferentes soluciones acuosas preparadas con distintas proporciones de dos colorantes alimentarios (McCormick, España

S.A): 500 y 12000  $\mu\text{L/L}$  de colorante rojo y amarillo respectivamente, para las diluciones amarillentas; 1250 y 12000  $\mu\text{L/L}$  de rojo y amarillo para las diluciones anaranjadas; y 3000 y 12000  $\mu\text{L/L}$  de colorante rojo y amarillo para las soluciones rojizas. De cada una de estas mezclas se prepararon diez diluciones (100, 78, 47, 36, 29, 22, 17, 14, 10, y 5%). Las sesiones se organizaron de la siguiente manera: en primer lugar la clasificación por tono se hizo con las muestras correspondientes a cada nivel de dilución ( $n=3$ ) separadamente, teniendo los panelistas que clasificarlas en tono amarillento, anaranjado y rojizo (10 evaluaciones). En segundo lugar para la ordenación de la intensidad los panelistas recibieron cada serie completa (amarillenta, anaranjada, y rojiza) de forma separada y se les pidió que las ordenaran de menor a mayor intensidad. Para la selección de los asesores el criterio seguido fue: (1) eliminar a aquellos que no fueran capaces de clasificar las muestras correctamente según su tono y, (2) eliminar a aquellos cuyo coeficiente de correlación de Spearman no fuera significativo después de ordenar las muestras ( $p > 0.05$ ) (O'Mahony, 1986). Sólo uno de los panelistas fue eliminado en esta fase.

Finalmente los panelistas seleccionados fueron entrenados usando dos muestras de OJs comerciales (COJ-I y COJ-II), y seis muestras preparadas con diluciones de COJ-II (6, 10, 30, 50, 60, y 80 %). Para el entrenamiento en la evaluación visual se utilizaron dos escalas no estructuradas, ancladas en los extremos. Los atributos en los que se entrenó a los panelistas fueron el tono y la intensidad. En este estudio, el croma y la claridad no se consideraron como atributos individuales ya que en estudios previos se ha observado que los panelistas presentaban dificultades para entender y evaluar el croma (Fernández-Vázquez y col., 2011). Por esta razón, la intensidad fue elegida como la mejor manera de evaluar los dos parámetros visualmente de una forma conjunta. El tono se puntuó de amarillento a rojizo y la intensidad se evaluó de baja a alta.

Las muestras se evaluaron en sesiones de 15 minutos y al final de cada una se llevó a cabo una pequeña puesta en común de los resultados, dirigida por el líder del panel, con el objetivo de unificar los criterios de evaluación. En cada sesión, los panelistas evaluaron por duplicado las muestras comerciales y

un par de muestras diluidas. Además, todos los asesores evaluaron las mismas muestras, con un orden aleatorio. Este diseño permitió evaluar la intensidad de color y el tono de las muestras, además de determinar la reproducibilidad y la consistencia del panel, que fue evaluada a lo largo de las diferentes sesiones. Se observó que las desviaciones estándar disminuían desde la primera a la última sesión (de 1.66 a 0.55 y de 1.75 a 0.58 en tono e intensidad respectivamente). El error entre la penúltima y última sesión fue de 6.6% en tono y 4.5% en intensidad (ambos menores del 10%) lo que demostró la uniformidad conseguida por el panel. Finalmente, 8 fueron los observadores seleccionados para formar parte del panel entrenado.

Se llevaron a cabo dos análisis de la varianza, uno incluyendo tres factores (asesor, muestra y repetición) con los datos de las muestras COJ-I y COJ-II, y otro incluyendo dos factores (asesor y muestra) con todas las muestras evaluadas. No se encontraron efectos significativos ( $p > 0.05$ ) entre asesores y repeticiones, sin embargo, sí se obtuvo un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) relativo a las muestras en ambas pruebas. Estos resultados confirman que el entrenamiento del panel cumplió con el objetivo planteado, ya que el panel era capaz de diferenciar visualmente unas muestras de otras.

Para comprobar la objetividad de los panelistas, se exploró la correlación entre las puntuaciones otorgadas y las medidas instrumentales (Tabla 9). El tono evaluado visualmente correlacionó de forma significativa ( $p < 0.05$ ) con el parámetro  $h_{ab}$ . Las puntuaciones de intensidad correlacionaron ( $p < 0.05$ ) con los parámetros  $L^*$  y  $C^*_{ab}$ . En el análisis visual, los panelistas frecuentemente interpretan el croma y la claridad como expresiones cuantitativas del color, por lo que se ensayaron distintas ecuaciones que incluían ambos parámetros, como  $C^*_{ab}(100-L^*)$  y  $C^*_{ab}/L^*$ . En este sentido, merece la pena destacar que las altas correlaciones encontradas ( $p < 0.05$ ) entre la intensidad percibida y las ecuaciones propuestas (que relacionan cantidad de color con la inversa de la claridad ( $C^*_{ab}/L^*$ ) o de forma similar con la "oscuridad" ( $C^*_{ab}(100-L^*)$ ), son de gran utilidad para relacionar la evaluación visual e instrumental del color.

**Tabla 9.** Coeficientes de correlación ( $R^2$ ) obtenidos entre las valoraciones del panel entrenado y los parámetros colorimétricos.

	$h_{ab}$	$L^*$	$C^*_{ab}$	$(C^*_{ab}/L^*)$	$C^*_{ab}(100-L^*)$
Intensidad	-	0.89	0.74	0.83	0.87
Tono	0.97	-	-	-	-

*Umbral de diferenciación del color*

Se adquirieron en diferentes supermercados 16 OJs comerciales (5 procedentes de zumo a base de concentrado, 6 procedentes de naranjas exprimidas y conservados a 4°C, y 5 procedentes de naranjas exprimidas y conservados a temperatura ambiente). Las muestras fueron elegidas para conseguir toda la variedad de color de los OJs disponibles comercialmente. Se evaluaron colorimétricamente (por análisis de imagen) y se calcularon las diferencias de color entre ellas ( $\Delta E^*_{ab}$ ) por medio de la siguiente ecuación:

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Los valores de la coordenada  $L^*$  se encontraron entre 61.32 (el OJ más oscuro) y 66.87 (el más claro). El tono mostró valores de 77.6 (el OJ más rojizo) a 83.7 (el más amarillento). El rango para el croma fue 54.23-59.10. Las diferencias de color ( $\Delta E^*_{ab}$ ) entre cada pareja de muestras (120) fueron de 0.47 a 8.53 unidades CIELAB.

Al objeto de establecer el umbral de diferenciación de color en un panel entrenado y no entrenado, cada par de muestras fue evaluado por el panel de 8 observadores entrenados y luego por uno formado por 10 panelistas con visión normal del color (Farnsworth-Munsell 100-Hue Test) pero sin entrenamiento previo. Los pares de muestras fueron colocados en el centro de una cabina VeriVide CAC 120 con un entorno gris y un fondo blanco, situándose los observadores a 50 cm de la misma.

La tarea de cada observador consistió en expresar si podían notar las diferencias de color entre los dos OJ (1) o no (0). Llevaron a cabo cada prueba

dos veces, en dos sesiones diferentes: uno con el par de muestras contiguas en el centro de la cabina (experimento a); y otro con el par de muestras situado en el centro pero separado por 15 cm (experimento b). Los resultados finales se expresaron como el porcentaje de respuestas que detectaban diferencia de color entre cada par de OJs ( $\Delta V$ : diferencias visuales de color).



**Figura 50.** Disposición de las muestras en la evaluación visual

Se estudió la correlación entre las diferencias de color percibidas visualmente y las medidas instrumentalmente. Así, las diferencias visuales de color ( $\Delta V$ ) fueron representadas frente  $\Delta E^*_{ab}$  medido instrumentalmente. Luego, los datos se ajustaron a una curva “S-shaped” dada por la ecuación  $y = A/[1 + \exp(B + Cx)]$ , maximizando el valor de  $r^2$ , usando el software MATLAB R2011b (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts).

Para el cálculo del umbral de diferenciación de color final, el 50% suele considerarse como una medida típica de la tolerancia de las diferencias de color percibidas por los observadores (*Alman y col., 1989; Berns y col., 1991; Qiao y col., 1998*). Los valores de  $\Delta E^*_{ab}$  correspondientes al 50% de  $\Delta V$  fueron 1.63 unidades CIELAB para el experimento con las muestras unidas en el centro (a) y 1.44 unidades CIELAB en el experimento con las muestras separadas por 15 cm (b) en el panel entrenado. Ambos valores fueron muy similares, mostrando solo una diferencia de 0.19 unidades CIELAB. Este resultado puede deberse a que la distancia entre las muestras (15 cm) y el entrenamiento de los panelistas no fueron suficientes para influir en la percepción de los panelistas



comparando ambos experimentos. Después de estos resultados un umbral de diferenciación de color de 1.5 unidades CIELAB podría proponerse para un panel entrenado.

Sin embargo, en el panel no entrenado, los valores de  $\Delta E^*_{ab}$  correspondientes al 50% de  $\Delta V$  fueron 2.78 unidades CIELAB en el experimento a y 2.27 unidades CIELAB en el experimento b. Estos resultados confirman la importancia del entrenamiento pero, como este panel no entrenado representaría a los potenciales consumidores de OJ, es un resultado de claro interés para la industria de cítricos. Se observa que el valor en el experimento a (con las muestras unidas en el centro) fue algo mayor, lo que puede estar relacionado con un aumento de la sensibilidad del panel debido a la proximidad de las muestras.

Hasta el momento no se habían realizado experimentos sobre las diferencias de color percibidas en el OJ basándose en muestras reales. Otros estudios basados en patrones de color propusieron considerar un rango de 0.38–0.73 unidades CIELAB, y sobre 1.75 unidades CIELAB como umbral y supraumbral de diferencias de color, respectivamente, mientras que con unas 5 unidades CIELAB nos estaríamos refiriendo a “grandes diferencias de color” (Berns y col., 1991; Brown, 1957; Brown y MacAdam, 1949; Cheung y Rigg, 1986; Luo y Rigg, 1986; Macadam, 1942; Melgosa y col., 1997; Witt, 1990; Wyszecki y Fielder, 1971). Considerando los resultados discutidos previamente se propone un valor de unas 2.8 unidades CIELAB como una primera estimación del umbral de diferenciación del color para los consumidores de OJ. Estos resultados están en concordancia con otro publicado previamente en un estudio con vino tinto que proponía el umbral de diferenciación en unas 3.0 unidades CIELAB (Martínez y col., 2001). Sin embargo, un valor menor (1.5 unidades CIELAB) se propone en el caso de un panel entrenado.

## **CONCLUSIONES**

- En este estudio se desarrolla un entrenamiento específico para la evaluación visual del OJ, demostrando su utilidad y eficacia.
- La intensidad se propone como un nuevo atributo para evaluar conjuntamente la claridad y el croma en el OJ, con buenas correlaciones con los parámetros instrumentales.
- Se han propuesto por primera vez, umbrales de diferenciación del color en el OJ, estableciendo valores de 1.5 unidades CIELAB para un panel entrenado y 2.8 unidades CIELAB para un panel no entrenado.



***“Colour training and colour differences thresholds in orange juice”.***

<sup>1</sup>Rocío Fernández-Vázquez, <sup>1</sup>Carla M. Stinco, <sup>2</sup>Dolores Hernanz, <sup>1</sup>Francisco J. Heredia,

<sup>1</sup>Isabel M. Vicario

<sup>1</sup>Food Colour & Quality Laboratory, Department Nutrition & Food Science.  
Universidad de Sevilla Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain. [www.color.us.es](http://www.color.us.es)

<sup>2</sup>Department Analytical Chemistry. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia,  
41012 Sevilla, Spain.

\* Corresponding author:

Isabel M. Vicario

Food Colour & Quality Lab., Dept. Nutrition & Food Science. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Sevilla. 41012-Sevilla, Spain

Tel.: +34 954556339 Fax: +34 954557017

Email: [vicario@us.es](mailto:vicario@us.es)

Enviado a Food Quality and Preference (en revision)

## **Abstract**

This study was aimed at training a panel of assessors to evaluate specifically orange juice colour, and to establish the colour difference threshold in orange juice for a trained and untrained panel. Panellists were first preselected using Farnsworth-Munsell 100-Hue Test and then trained with a specific method for orange juice colour. This training allowed assessors to evaluate visually orange juice samples in hue and intensity. The final selection of assessors was a panel of 8 trained observers with reproducibility and repeatability, and a significant discrimination among the samples ( $p < 0.05$ ).

On the other hand, commercial orange juices were evaluated both instrumentally by image analysis and visually by the trained panel, and the untrained panel. Instrumental colour measurements and visual evaluation were correlated. Values around 1.5 and 2.8 CIELAB units could be consider the threshold for colour differences between two orange juices for the trained and untrained panel, respectively.

**Keywords:** Colour, orange juice, sensory training, colour differences

## 1. Introduction

Colour is one of the most important visual attributes in food and usually is the first one evaluated by consumers and is associated to the concept of quality (Huggart, Petrus, & Buzz Lig, 1977; Tepper, 1993; Pangborn, 1960). In orange juices, the natural bright colour is considered one of their main advantages over other juices (Barron, Maraulja, & Huggart, 1967) and has attached great importance since some studies have probed that it may influence flavour perception and other quality attributes (Tepper, 1993; Fernández-Vázquez et al., 2012).

Colour can be evaluated by instrumental or visual analysis. Humans and instruments measure colour in different ways. Humans see colours in terms of lightness, hue and chroma by integrating complex perceptions. Instruments, on the other hand, are capable of seeing pure values of the colorimetric coordinates CIELAB  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$ .

Nowadays, there are new advances in image acquisition technology that offer the possibility of using technically sophisticated apparatus available at relatively low cost to evaluate colour in terms of millions of pixels. In comparison with the traditional light sensors, the main advantage is that they allow making a detailed evaluation of a wider area of any food product, with inhomogeneous colour possible. Every different colour in the image of the analyzed food matrix can be accounted for by one or more pixels (Antonelli et al., 2004). Furthermore, it is based upon digital cameras, which can quickly capture images in digital format (DigiEye<sup>®</sup>) (Luo, Cui, & Li, 2001) and offers a more reliable measurement of the food colour, which can be correlated with sensory analysis and other colour measurements (Fernández-Vázquez, Stinco, Melendez-Martinez, Heredia, & Vicario I.M, 2011).

Anyway, colour measurement usually requires instruments that are not always available in small and medium size companies and visual evaluation could be an alternative.

Human colour vision is a quite complex process and colour is undoubtedly a perception, a virtual property of the material. In order to use visual analysis as an objective quality control it is necessary to standardize the measurement conditions, to be able to compare with instrumental measurement. Previous studies have shown that a good correlation can be achieved when the instrumental and sensory measurements are done considering different aspect such as background, surround or illumination (Fernández-Vázquez, Stinco, Melendez-Martinez, Heredia, & Vicario I.M, 2011; Meléndez-Martínez, Vicario, & Heredia, 2005).

Although colour evaluation is included in many sensory studies (Poelman & Delahunty, 2011; Calvo, Salvador, & Fiszman, 2001; Frata, Valim, & Monteiro, 2006), there are very few studies which specially train the panellists to do the visual evaluation of food with more details. An example of an specific training in visual evaluation was done by Gambaro *et al.* (2001) for strawberry yogurt. Based on this experience, we have particularly trained a panel to evaluate orange juice colour in a reproducible and repeatable way. On the other hand, the evaluation of colour differences has had a high interest for long time. Specifically, “just noticeable differences” have been very important in the development of the Colorimetry. There are equations to find out the colour difference between two stimuli in the CIELAB space, which are mathematical expressions which allows us to obtain the number  $\Delta E^*_{ab}$ . This is the positive number which stays invariable when the products are exchanged (Melgosa, Pérez, Yebra, Huertas, & Hita, 2001). At the present time, calculation of colour differences has many applications in Colorimetry, such as reproducibility of colour in manufactured products and communication systems, or in the study of the colour fading in food, works of art, etc. or more recently to determine colour tolerance in orange juice (Wei, Ou, Lou & Hutchings, 2012).

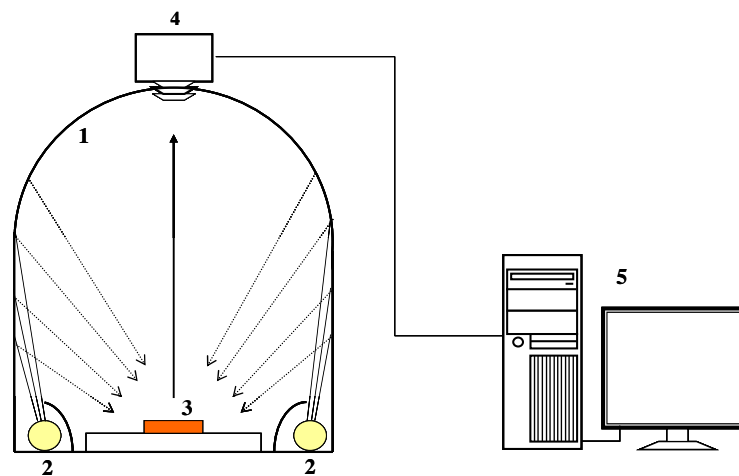
One of the key problems in the visual evaluation is establishing the threshold for colour differences. Previous studies have explored colour threshold using colour standards (Berns, Alman, Reniff, Snyder, & Balonon-Rosen, 1991). An attempt to stablish the thresholds for visual discrimination between wines was also published by Martinez *et al.* (2001). Recently Wei *et al.* (2012) established the colour of an ideal orange juice and the colour tolerance, using a digital display. However, so far, literature on orange juice colour does not provide data on the colour differences that can be visually detected between two orange juices (based on real samples) by consumers, although this type of information could be very useful for the orange juice industry.

The objectives of this study were: (1) to train a panel of assessors to evaluate specifically orange juice colour, and (2) to study the visually perceived colour difference by the observers' panel (trained and untrained) in a complete range of different colour orange juices to establish the colour difference threshold in this popular beverage.

## 2. Material and methods

### 2.1. Instrumental colour measurement

The DigiEye imaging system was used to capture the digital images (Luo et al., 2001). The latter system includes a calibrated digital camera 10.2-megapixel Nikon D80 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) and an objective Nikkor 35-mm f/2D (Nikon Corporation), a colour sensor for display calibration, and an illumination box designed by VeriVide Ltd. (Leicester, UK) (Figure 1).



- 1: Domed cabinet
- 2: Fluorescent tubes (D65 simulator)
- 3: Sample
- 4: Digital camera
- 5: PC with Digifood<sup>®</sup> Software

Figure 1. Scheme of the DigiEye System.

For objective colour specifications, the samples were placed in 75 mL capacity transparent plastic bottles (Figure 2) and measured against a grey surround ( $L^* = 50$ ) and white background. Digital images were made in order to obtain the total appearance of juice at depths observed by consumers. In these measurements, the samples were illuminated by a diffuse D65 simulator.





Figure 2. Bottles used for instrumental colour measurements and visual evaluation.

For obtaining CIELAB coordinates, we used the DigiFood software (Heredia, González-Miret, Álvarez, & Ramírez, 2006), which allows the transformation of RGB values into the CIELAB colour parameters, based on computational solutions (León, Mery, Pedreschi & León, 2006).

From the CIELAB uniform colour space, the psychophysical parameters chroma ( $C_{ab}^*$ ) and hue ( $h_{ab}$ ) are defined as:

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}, \quad h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$$

Chroma ( $C_{ab}^*$ ) is used to determine the degree of difference of a hue in comparison with a grey colour with the same lightness, and is considered the quantitative attribute of colourfulness. Hue ( $h_{ab}$ ) is the attribute according to which colours are usually defined as reddish, greenish, etc. and is used to define the difference of a colour with reference to a grey colour with the same lightness. This attribute is related to the differences in reflectance at different wavelengths and is considered the qualitative attribute of colour.

Colour differences were calculated as the Euclidean distance between two points in the 3-D space defined by  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ :

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

## 2.2. Colour training

Briefly, a protocol was designed for the selection and training of assessors based on the methodology proposed by Gambaro *et al.* (2001). First, a preliminary panellist selection was made using the Farnsworth-Munsell 100-Hue Test. Then, those panellists who did not present a good skill to discriminate light differences in tone and intensity using

blended of colouring dilutions were rejected. Finally, the selected panel was training using two commercial samples and a serie of dilutions of one of them.

### *2.2.1. Panel Selection*

A panel of 12 assessors were recruited from students and staff at the University of Seville and then preselected according to their normal colour vision following ISO 11037 (1999). The Farnsworth-Munsell 100-Hue Test for the examination of Colour Discrimination (Farnsworth 1957) was used to verify the normal vision. It allows to separate persons with normal colour vision into classes of superior, average and low colour discrimination, and to measure the zones of colour confusion in colour defective persons.

To determine the ability to discriminate among slight tone and intensity differences in orange colour, aqueous orange-coloured solutions were prepared using two food dyes (red and yellow food dyes from McCormick, Spain S.A) blended in different proportions: 500 and 12000  $\mu\text{L/L}$  of red and yellow food dye respectively, for yellowish dilutions; 1250 and 12000  $\mu\text{L/L}$  of red and yellow food dye for orangish dilutions; and 3000 and 12000  $\mu\text{L/L}$  of red and yellow food dye for reddish dilutions. Ten aqueous solutions of each blend of colourings were prepared (100, 78, 47, 36, 29, 22, 17, 14, 10, and 5 %). These solutions (75 mL) were placed in bottles of transparent plastic and coded with 2 digit random numbers.

The test was carried out using a VeriVide CAC Portable cabinet (dimension of viewing area: 635 mm width, 280 mm height, and 280 mm depth) to control illumination and observation conditions. D65 was used as source of illumination (the same used in the instrumental measurements) (CIE, 2007), a white background and a grey surround were selected to simulate the objective measurements made by image analyses (Stinco et al., 2012).

The evaluation sessions were organized as follows: in a first stage (hue classification) assessors dealt with the samples ( $n=3$ ) corresponding to the each dilution level separately and were asked to sort them in yellowish, orangish, and reddish hues (10 evaluations). In a second stage (intensity ranking), the assessors were given the whole dilution series (yellowish, orangish and reddish) separately, and they were asked to rank them according to the increasing intensity.

To select the assessors, the criteria used were: (1) reject those who were unable to accomplish sorting the tubes into the three tone groups and (2) reject those whose

Spearman's ranked correlation coefficients ( $p$ ) of sensory ranking versus colour concentrations were not significant ( $p > 0.05$ ) (O'Mahony, 1986).

### *2.2.2. Panel training*

Two nonstructured 10 cm long scales, anchored at the end, were used to train the assessors in colour evaluation. The colour attributes trained were hue and intensity. In this study, chroma and lightness were not considered separately as individual attributes because in previous studies it was observed that panellists had difficulties to understand and evaluate chroma (Fernández-Vázquez, Stinco, Melendez-Martinez, Heredia, & Vicario I.M, 2011). For this reason, intensity was assayed as the best way to evaluate both parameters visually. Hue was evaluated from yellowish to reddish and intensity was evaluated from low to high.

A collection of samples were selected to encompass the full range of colour intensity and hue in commercial orange juice. Two commercial orange juice samples (COJ I and COJ II), and six samples prepared from dilutions of COJ II (6, 10, 30, 50, 60, and 80 %) were used. These samples were evaluated in 15 min sessions, and at the end of each session a meeting of 30 minutes was done by the leader of the panel and all the panellists to unify the criteria of evaluation. In each session, assessors evaluated duplicates of the commercial samples and a couple of diluted samples.

The samples evaluated in each session were the same for all assessors, being the order randomized across assessors. This design allowed training of the assessors in evaluating orange colour intensity and hue as well as determining their reproducibility and performance consistency. A three factor ANOVA (assessor, sample, and repetition) for samples COJ I and COJ II, and a two factor ANOVA (assessor and sample) for these two samples and all the dilutions were performed on the data obtained (O'Mahony 1986). According to the results obtained, those assessors with the highest variance and greater judgement dispersion were withdrawn from the panel.

## **2.3. Colour differences thresholds**

### *2.3.1. Orange juices samples*

16 commercial orange juices (5 from concentrated, 6 from squeezed oranges and stored at 4°C, and 5 from squeezed oranges and stored at room temperature) were purchased from different supermarkets in Spain. These samples were chosen in order to collect the variety of the orange juices' colour available in the supermarket. Each sample was

placed in 75 mL capacity transparent plastic bottles to measure its colour by image analyses and then to evaluate the colour differences.

### 2.3.2. Sensory evaluation

The samples were compared by pairs (120 comparisons) by the trained panel of 8 observers with normal colour vision and previously trained in colour discrimination experiments.

Afterwards, ten panellists recruited also from students and staff at the University of Seville, with normal vision (according to the Farnsworth-Munsell 100-Hue Test) but no previous knowledge in colour science, repeated the experiment with the aim of establishing the colour difference threshold for untrained observers.

120 pairs of samples were displayed on the centre of the VeriVide CAC 120 cabinet. Observers were situated 50 cm in front of the samples, with white background and grey surround. The task of each observer was to judge whether they could notice the colour difference between the two orange juice samples (1) or if they could not (0). They did the test twice per pair of samples in two different sessions: one with the couple of samples side by side (experiment a); and another one with the samples separated by 15 cm (experiment b). In this way, each observer in the trained panel (8 panellists) evaluated the 120 pairs of samples once (960 judgments in total), similarly did the group of 10 untrained observers (1200 judgments in total). The final results were expressed as “visual colour difference” ( $\Delta V$ ) which was calculated as the percentage of positive panellists' responses (1).

The visual judgments were made immediately after the instrumental colour measurements in order to avoid the colour variation of the samples.

The correlation between the visually perceived and instrumentally measured colour differences were explored following procedures previously described elsewhere (Davidson & Friede, 1953; Kuehni, 1976; Stroocka, Brockes, & Paffhausen, 1983; Martínez et al., 2001). The percentage of the positive colour differences perceived by both panels ( $\Delta V$ ) were plotted against the CIELAB colour differences ( $(\Delta E^*_{ab})$ ) instrumentally measured. Then, an S-shaped curve ( $y = A/[1 + \exp(B + Cx)]$ ) was fitted using an iterative algorithm of successive approximations to the function and its derivatives, until maximizing the value of  $r^2$  (Martínez et al., 2001). The software MATLAB R2011b (The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts) was used for this purpose. For the final difference threshold, the 50% of positive responses by the

observers was considered as the typical measurement of tolerance or acceptability of colour differences perceived (Alman, Berns, Snyder, & Larsen, 1989; Berns et al., 1991; Qiao, Berns, Reniff, & Montag, 1998).

## **2.4. Data analysis**

All statistical analyses were performed using the program Statistica 8 for Windows (StatSoft, 2007).

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Colour training**

#### *3.1.1. Panel Selection*

The Farnsworth-Munsell 100-Hue Test was applied to the assessors and results showed that all passed the test with punctuation lower than 48. This means that some of them was in the group of superior discrimination (scores lower than 16) and others were in the group of average discrimination (scores lower than 100). An example of the results is shown in Figure 3. The severity of the defect can be gauged by the extent of the 'bulge', a severe degree of defect would show clear bipolarity with high error scores; moderate cases would show small 'bulges' and lower total error scores; mild cases with good colour discrimination would show no 'bulge' and cannot be identified by this test.

Objective measures of the food dye solutions used in tone separation and intensity ranking were made by image analyses. The yellowish series had a lightness ranging from 56.02 to 76.17; the orangish from 48.14 to 74.01 and finally the reddish series from 43.51 to 70.11. Chroma ranges were 44.45-65.23, 46.57-62.29, and 44.12-60.48 for the yellowish, the orangish and the reddish series, respectively. Finally, hue angle data ranged from 58.1° to 95.9° in yellowish series, from 37.0° to 91.3° in the orangish series and from 30.8° to 83.3° in the reddish series (Figure 4).

After the panellists sorted the samples out and ranked them according to increasing intensity, just one panellist was removed from the panel following the criteria used for the selection (Spearman's ranked correlation coefficient was not significant).

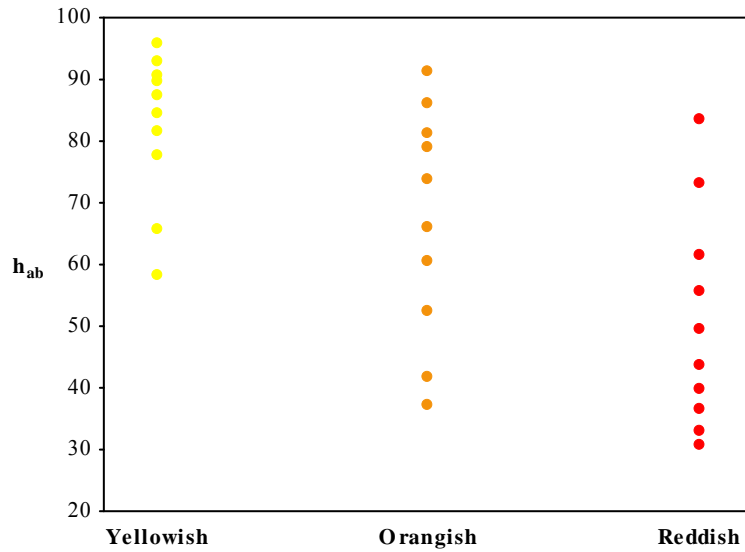


Figure 4. Hue of the series of different colorant dilutions prepared for selecting the panellists

### 3.1.2. Panel training

The objective colour of the training solutions, both commercial orange juices and their dilutions, were analysed by image analysis. The values of the coordinate  $L^*$  ranged from 64.70 to 72.03; hue ranged from 78.5 (the most reddish OJ) to 92.8 (the most yellow) and the chroma ranged from 42.65 to 60.79. Figure 5 shows the samples in the CIELAB space and the coordinate  $L^*$ .

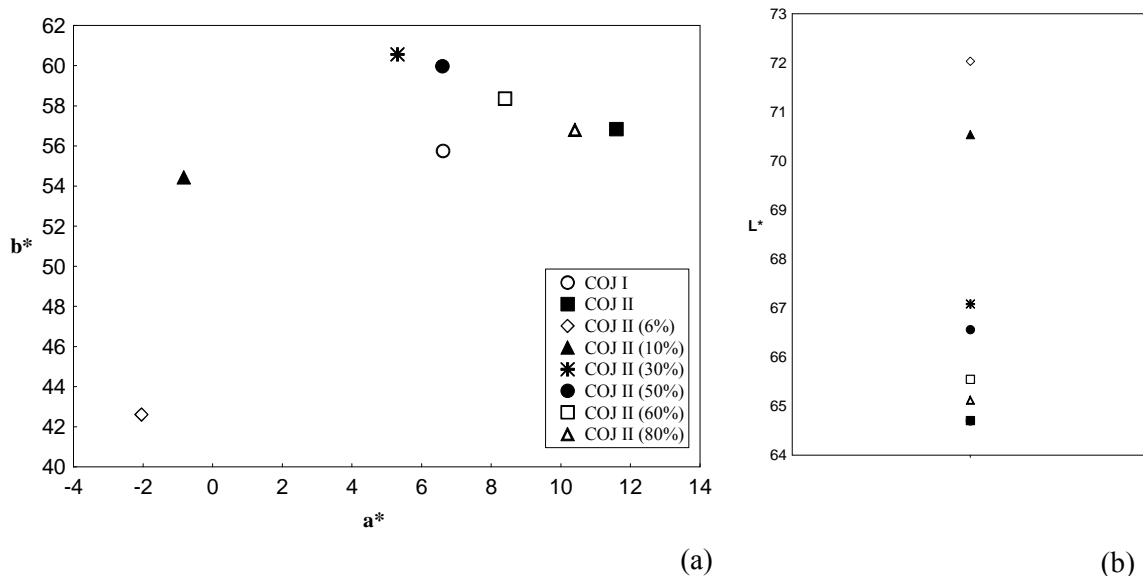


Figure 5. Colour coordinates of the commercial orange juice samples used in the training of the panel in (a) the  $a^*b^*$  plane and (b) lightness

Panellists were trained in different sessions until a consistent panel of assessors was obtained. Figure 6 shows the evolution in the scores for sample COJ I along the sessions. Standard deviations decreased from the first to the last session (from 1.66 to

0.55 and from 1.75 to 0.58 in hue and intensity respectively). The error between the last and the penultimate session was 6.6 % in hue and 4.5 % in intensity (both cases less than 10 %) in agreement with an increasing uniformity of the panel. Finally, eight panellists were selected to be part of the panel.

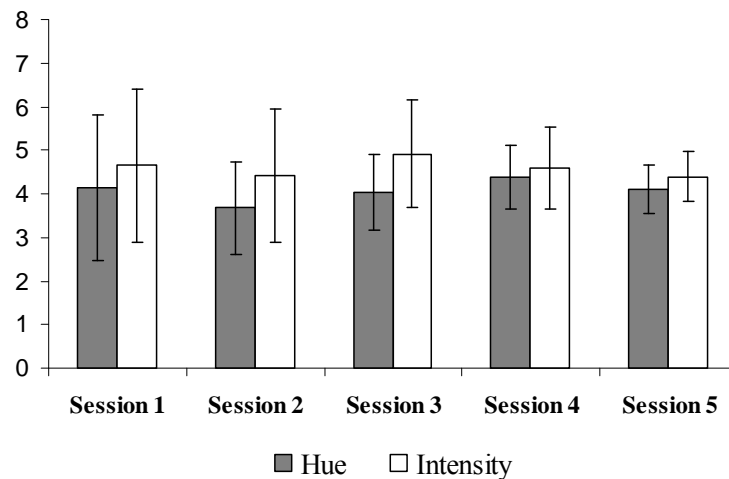


Figure 6. Evolution of the evaluations of hue and intensity done by the panel (mean and standard deviation) along the training sessions

A three factor ANOVA (assessor, sample, and repetition) for samples COJ I and COJ II, and a two factor ANOVA (assessor and sample) for all the samples were performed. Non-significant effects ( $p > 0.05$ ) were obtained for assessors and repetition, however, sample effects were obtained in both tests, as it was the objective (Table 1).

Table 1. Three factor ANOVA for hue and intensity data.

Effect	Level of Significance	
	Hue	Intensity
Assessor	0.159	0.281
Sample	0.002	0.009
Repetition	0.540	0.724
Assessor - Sample	0.073	0.479
Repetition - Assessor	0.245	0.308
Repetition - Sample	0.252	0.242

In order to ascertain if the panellists were correctly trained in colour evaluation, the sensory score were compared to the instrumental values. Table 2 shows the final scores given by the panel to the samples evaluated and their standard deviations. Surprisingly, from samples COJ II to COJ II 50% panellists did not find significant differences in hue and intensity. This could be explained by the fact that they evaluated the samples

separately, not comparing between them, which supposed an extra difficulty in the evaluator task. Furthermore, differences among these samples in hue, lightness and chroma, were not too pronounced (for example among COJ II and COJ II 50%, difference in lightness was 1.8 CIELAB units). However, among samples whose differences in colorimetric parameter measured instrumentally were higher (such as COJ II and COJ II 30%) panellists did find significant differences in hue and intensity in their visual evaluations.

Table 2. Mean scores for hue and intensity given by the panel

Samples	Hue	Intensity
COJ I	4.10 ± 0.55 <sup>a</sup>	4.39 ± 0.58 <sup>a</sup>
COJ II	5.90 ± 0.60 <sup>c</sup>	6.88 ± 0.45 <sup>c</sup>
COJ II (80%)	5.66 ± 1.03 <sup>c</sup>	6.91 ± 0.84 <sup>c</sup>
COJ II (60%)	5.65 ± 1.07 <sup>c</sup>	6.19 ± 1.02 <sup>c</sup>
COJ II (50%)	5.26 ± 0.93 <sup>c</sup>	6.19 ± 1.01 <sup>c</sup>
COJ II (30%)	4.00 ± 0.34 <sup>a</sup>	4.43 ± 0.63 <sup>a</sup>
COJ II (10%)	0.84 ± 0.55 <sup>b</sup>	2.02 ± 0.53 <sup>b</sup>
COJ II (6%)	0.75 ± 0.62 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.88 <sup>b</sup>

<sup>a-c</sup> Different superscripts within columns indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ )

In order to probe the reliability of the panel, it is important to highlight its uniformity and also evaluate the visual and instrumental correlations. The correlation between hue and the  $h_{ab}$  parameter was explored, resulting  $r^*$  statistically significant ( $r^* = -0.97$ ). As it was explained previously, in this study colour intensity is proposed as an attribute related to both lightness and chrome. In accordance, correlation coefficients between intensity and both lightness and chrome were explored, resulting significant in both cases ( $r^* = -0.89$  and  $r^* = 0.74$  respectively). Equations including  $C^*_{ab}$  and  $L^*$ , like  $C^*_{ab}(100-L^*)$  and  $C^*_{ab}/L^*$  were explored in a try to relate both parameters in a unique correlation with the intensity. Statistically significant correlation coefficient were obtained for both expressions ( $r^* = 0.87$  and  $r^* = 0.83$ , respectively). In visual analysis, the observers frequently interpret chroma and lightness as the quantitative expressions of colour. In this sense, it is noteworthy to mention that the correlations found between perceived intensity and the proposed equations (which relate quantity of colour to the inverse of lightness ( $C^*_{ab}/L^*$ ) or in a similar way to “darkness” ( $C^*_{ab}(100-L^*)$ ), attach great relevance to establish correlations between the instrumental and sensory evaluation of colour.

Finally, a significant ( $r^* = 0.93$ ) correlation between intensity measured by the panel and the orange juice dilutions was found.



### 3.2. Colour differences thresholds

In Figure 7, the CIELAB colour space ( $a^*b^*$  plane) (*a*) and  $L^*$  (*b*) illustrates the colour of the samples included in this study and measured by digital image analyses. It can be observed that they encompassed a wide range of colour in commercial orange juices. The values of the coordinate  $L^*$  ranged from 61.32 (the darkest) to 66.87 (the lightest). Hue ranged from  $77.6^\circ$  (the most reddish OJ) to  $83.7^\circ$  (the most yellowish). Range for the coordinate  $C^*_{ab}$  was 54.23-59.10. CIELAB colour differences  $\Delta E^*_{ab}$  were calculated in each pair of orange juice and ranged from 0.47 to 8.53.

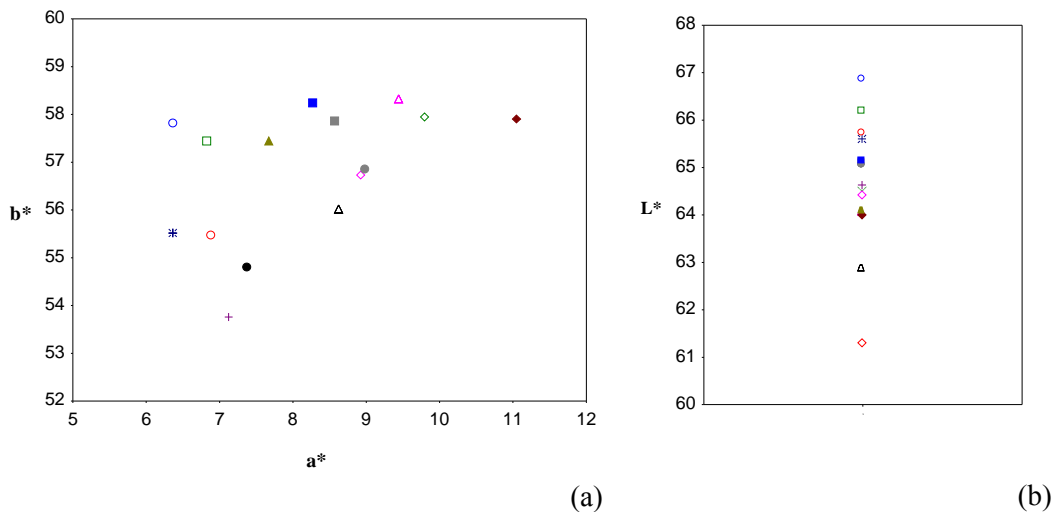


Figure 7. Colour coordinates of the orange juice samples used in the colour threshold study in (a) the  $a^*b^*$  plane and (b) lightness

The results of the correlation between the instrumental measurements and the visual evaluations done by the trained and untrained panels are shown in Figures 8 and 9, respectively. The CIELAB colour-differences instrumentally measured for each pair of samples were plotted against their visually perceived colour differences ( $\Delta V$ ). Both experiments (*a*) side by side and (*b*) separated samples are presented as separated graphs. As mentioned above, the equation of the fitted curve for all the situations was  $\Delta V = A/[1 + \exp (B + C\Delta E^*_{ab})]$ . The coefficients of the fitted curves corresponding to each experiment are shown in Table 3.

Table 3. Coefficients for the fitted equations ( $\Delta V = A/[1 + \exp (B + C\Delta E^*_{ab})]$ ) resulting from each of the thresholds experiments (side by side and separated samples) in both panels (trained and untrained).

	Trained panel				Untrained panel			
	A	B	C	r <sup>2</sup>	A	B	C	r <sup>2</sup>
(a) Side by side	93.0	2.38	-1.5	0.49	99.77	2.59	-0.93	0.50
(b) Separated	97.6	1.80	-1.26	0.51	101.7	1.60	-0.70	0.40

For the final threshold calculations, the 50% probability was considered as a typical measurement of tolerance or acceptability of colour differences perceived by the observers (Alman, Berns, Snyder, & Larsen, 1989; Berns et al., 1991; Qiao, Berns, Reniff, & Montag, 1998). The values of  $\Delta E^*_{ab}$  corresponding to 50% of colour differences perceived ( $\Delta V$ ) were 1.63 CIELAB units for the side by side and 1.44 CIELAB units in separated observations in the trained panel (Figure 8).

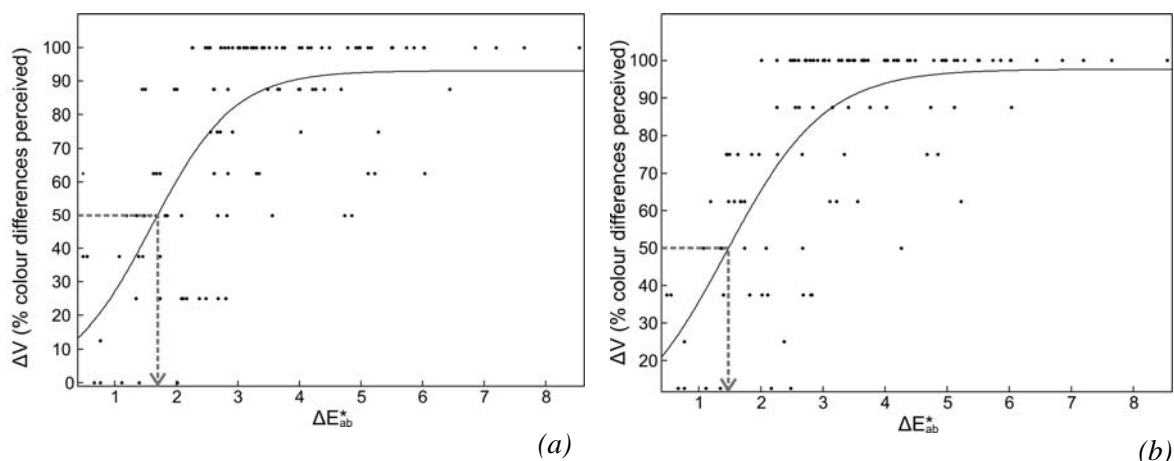


Figure 8. Trained panel observers' answers in percentages ( $\Delta V$ ) versus instrumental colour differences for each pair of orange juice samples and the corresponding fitted curves for the experiments (a) side by side and (b) separated.

Both values are very similar (only show a difference of 0.19 CIELAB units). It might be because the distance between the samples (15 cm) was not enough to change the panellists' perception comparing separated and side by side evaluation. Moreover, training of the panellists did that these small differences were not enough to change their responses. After this results a suprathreshold of 1.5 CIELAB units could be propose for a trained panel.

However, in the untrained panellists the values of  $\Delta E^*_{ab}$  corresponding to 50% of colour differences perceived were 2.78 CIELAB units for the side by side and 2.27 CIELAB units for the separated observations (Figure 9). These higher values could be explained by the lack of training of knowledge about colour theory. Since this would be the case of the main potential consumer this is an interesting result for the citrus industry.

The higher threshold in the case of side by side samples could be related to an increase in the sensibility of the panel due to the closeness of the samples.

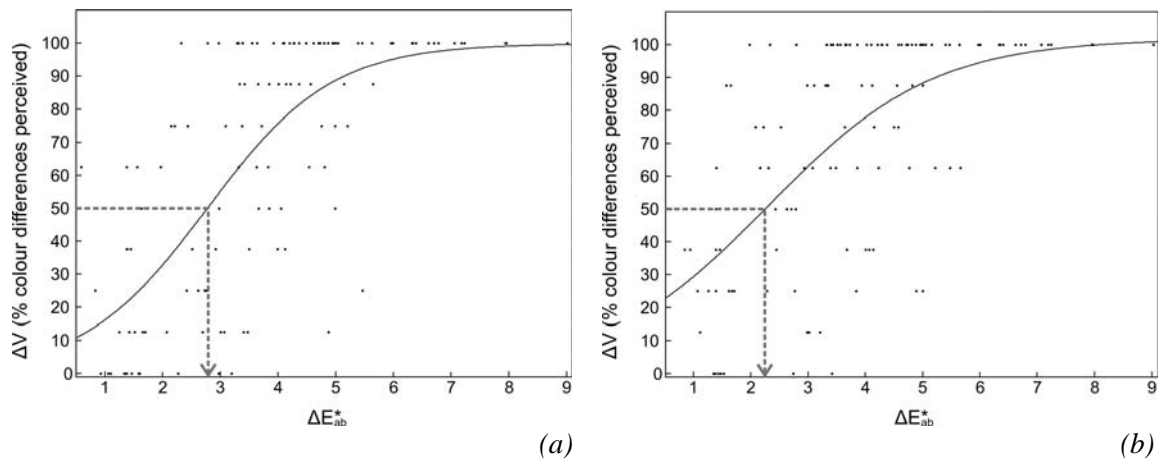


Figure 9. Untrained panel observers' answers in percentages ( $\Delta V$ ) versus instrumental colour differences for each pair of orange juice samples and the corresponding fitted curves for the experiments (a) side by side and (b) separated.

Up to now, no experiments on colour-differences perceived by observers in orange juice, based on real samples have been reported. Previous studies based on standard propose considering a range of 0.38–0.73 CIELAB units, and over 1.75 CIELAB units as the threshold and suprathreshold colour difference, respectively, while over 5 CIELAB units could be refer as “big colour differences” (Macadam, 1942; Brown & MacAdam, 1949; Brown & MacAdam, 1949; Brown, 1957; Wyszecki & Fielder, 1971; Witt, 1990; Luo & Rigg, 1986; Cheung & Rigg, 1986; Berns et al., 1991; Melgosa, Hita, Poza, Alman, & Berns, 1997). Considering the results previously discussed we propose a value of around 2.8 CIELAB units as a preliminary estimate of colour difference threshold in orange juice consumers. These results are in accordance with previously published studies in red wine which reported a value around 3.0 CIELAB units (Martínez et al., 2001). However, a lower colour difference of 1.5 CIELAB units is proposed for a trained panel.

#### **4. Conclusions**

To sum up, in this study a specific training method for visual evaluation adapted to orange juice was set up, demonstrating its utility and efficiency. Intensity is proposed as a new attribute to jointly evaluate chroma and lightness, with good correlations with the instrumental colour parameters. Furthermore, for the first time a colour-difference threshold of 1.5 CIELAB units for a trained panel and 2.8 CIELAB units for untrained panellists are proposed.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by funding from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía by the project P08- AGR-03784. RFV holds a grant from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía. Special thanks to Francisco José Rodríguez Pulido and Jose Miguel Hernández Hierro for their collaboration on the use of software MATLAB R2011b.

## References

- Alman, D. H., Berns, R. S., Snyder, G. D., & Larsen, W. A. (1989). Performance testing of color-difference metrics using a color tolerance dataset. *Color Research & Application*, *14*, 139-151.
- Barron, R. W., Maraulja, M. D., & Huggart, R. L. (1967). Instrumental and visual methods for measuring orange juice color. Florida State Horticultural Society. In (pp. 308-311).
- Berns, R. S., Alman, D. H., Reniff, L., Snyder, G. D., & Balonon-Rosen, M. R. (1991). Visual determination of suprathreshold color-difference tolerances using probit analysis. *Color Research & Application*, *16*, 297-316.
- Brown, W. R. J. (1957). Color Discrimination of Twelve Observers. *Journal of the Optical Society of America*, *47*, 137-143.
- Brown, W. R. J. & MacAdam, D. L. (1949). Visual Sensitivities to Combined Chromaticity and Luminance Differences. *Journal of the Optical Society of America*, *39*, 808-823.
- Calvo, C., Salvador, A., & Fiszman, S. (2001). Influence of colour intensity on the perception of colour and sweetness in various fruit-flavoured yoghurts. *European Food Research and Technology*, *213*, 99-103.
- Cheung, M. & Rigg, B. (1986). Colour-difference ellipsoids for five CIE colour centres. *Color Research & Application*, *11*, 185-195.
- CIE (2007). Commission internationale de l'Eclairage. Standard Illuminants for Colorimetry. ISO, 11664-2:2007.
- Davidson, H. R. & Friede, E. L. A. I. (1953). The Size of Acceptable Color Differences. *Journal of the Optical Society of America*, *43*, 581-589.

Fernández-Vázquez, R., Stinco, C., Melendez-Martinez, A. J., Heredia, F. J., & Vicario I.M (2011). Visual and instrumental evaluation of orange juice color: a consumers' preference study. *Journal of Sensory Studies*, 26, 436-444.

Fernández-Vázquez, R., Fisk, I., Hort, J., Hewson, L., Hernanz Vila, D., Heredia, F. J. et al. (2012). Colour influence on the perception of flavour, sweetness, sourness and overall liking in orange juice. *Proceedings of 5th European Conference on Sensory and Consumer Research, Bern, Switzerland*.

Frata, M., Valim, M. F., & Monteiro, M. (2006). Preference mapping of commercial orange juices. *Fruit processing*, 2, 116-121.

Gambaro, A. D. R. I., Giménez, A., & Burgueño, J. (2001). Sensory and instrumental evaluation of strawberry yogurt color. *Journal of Sensory Studies*, 16, 11-22.

Heredia, F. J., González-Miret, M. L., Álvarez, C., & Ramírez, A. (2006). DigiFood® (Análisis de imagen). [No. SE-01298].

Ref Type: Patent

Huggart, R. L., Petrus, D. R., & Buzz Lig, B. S. (1977). Color aspects of Florida commercial grapefruit juices. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 90, 173-175.

Kuehni, R. G. (1976). Color-tolerance data and the tentative CIE 1976 L\*a\*b\* formula. *Journal of the Optical Society of America*, 66, 497-500.

León, K., Domingo M., Franco P., & León J. (2006). Color measurement in L\*a\*b\* units from RGB digital images. *Food Research International*, 39, 1084-1091.

Luo, M. R., Cui, C. G., & Li, C. (4-10-2001). British Patent Entitled apparatus and method for measuring colour (DigiEye System). 0124683.4. Ref Type: Patent

Luo, M. R. & Rigg, B. (1986). Chromaticity-discrimination ellipses for surface colours. *Color Research & Application*, 11, 25-42.

Macadam, D. L. (1942). Visual Sensitivities to Color Differences in Daylight. *Journal of the Optical Society of America*, 32, 247-273.

Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines. *Food Science and Technology International*, 7, 439-444.

Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2005). Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: effect of the background. *Food Quality and Preference*, 16, 471-478.

Melgosa, M., Hita, E., Poza, A. J., Alman, D. H., & Berns, R. S. (1997). Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. *Color Research & Application*, 22, 148-155.

Melgosa, M., Pérez, M. M., Yebra, A., Huertas, R., & Hita, E. (2001). Some reflections and recent international recommendations on color-difference evaluation. *Óptica Pura y Aplicada*, 34, 1-10.

O'Mahony, M. (1986). *Sensory Evaluation of food: Statistical methods and procedures*. (Marcel Dekker ed.) New York.

Pangborn, R. M. (1960). Influence of Color on the Discrimination of Sweetness. *The American Journal of Psychology*, 73, 229-238.

Poelman, A. A. M. & Delahunty, C. M. (2011). The effect of preparation method and typicality of colour on children's acceptance for vegetables. *Food Quality and Preference*, 22, 355-364.

Qiao, Y., Berns, R. S., Reniff, L., & Montag, E. (1998). Visual determination of hue suprathreshold color-difference tolerances. *Color Research & Application*, 23, 302-313.

StatSoft, I. (2007). STATISTICA, version 8.0 [Computer software].

Stinco, C., Fernández-Vázquez, R., Meléndez-Martínez, A. J., Heredia, F. J., Bejines-Mejías, E., & Vicario, I. M. (2012). Influence of Different Backgrounds on the Instrumental Color Specification of Orange Juices. In J. Caivano & M. Buera (Eds.), *Color in Food. Technological and Psychophysical Aspects* (pp. 143-150). New York: CRC Press. Taylor & Francis Group.

Strocka, D., Brockes, A., & Paffhausen, W. (1983). Influence of experimental parameters on the evaluation of color-difference ellipsoids. *Color Research & Application*, 8, 169-175.

Tepper, B. J. (1993). Effects of a slight color variation on consumer acceptance of orange juice. *Journal of Sensory Studies*, 8, 145-154.

Wei, S.T., Ou, L.C. Luo, M.R. & Hutchings, J.B. (2012). Optimisation of food expectations using product colour and appearance. *Food Quality and Preference* 23, 49–62.

Witt, K. (1990). Parametric effects on surface color-difference evaluation at threshold. *Color Research & Application*, 15, 189-199.

Wyszecki, G. N. T. & Fielder, G. H. (1971). New Color-Matching Ellipses. *Journal of the Optical Society of America*, 61, 1135-1152.





## **Capítulo 4: INFLUENCIA DEL COLOR EN LA PERCEPCIÓN SENSORIAL DEL ZUMO DE NARANJA Y LA EVALUACIÓN HEDÓNICA DEL CONSUMIDOR**

### **ANTECEDENTES**

El flavor se define como “una compleja combinación de las sensaciones olfativas, gustativas y trigeminales percibidas durante el consumo de los alimentos y bebidas. Éste puede verse influenciado por efectos táctiles, térmicos, desagradables y/o cinestésicos” (ISO 5492 1992). Según la ISO las señales visuales y aditivas no pertenecen intrínsecamente al flavor aunque éstas pueden modificarlo. Los aspectos visuales como el color de los alimentos podrían entonces modificar la percepción del flavor influenciando los atributos olfativos y gustativos y/o modificando la percepción multisensorial de este atributo (Spence y col., 2010).

Los investigadores han estudiado la influencia del color en el gusto y el flavor (desde una perspectiva teórica y práctica) y también en la aceptabilidad de los alimentos durante décadas, pero por el momento, no se ha conseguido una inequívoca respuesta a esta cuestión.

El color de muchas frutas va transformándose del verde al rojo, pasando por el amarillo, durante su proceso de maduración. Esta correlación natural entre el gusto y el color podría explicar las conclusiones alcanzadas por algunos estudios en los que se asocia el color verde con la acidez y el rojo con el dulzor. Por ejemplo, un estudio de Huggart y col. (1977) concluyó que el color estaba relacionado con la percepción del dulzor y otras características de calidad; y las asociaciones verde-acidez y rojo-dulzor también fueron demostradas por Pangborn (1960) al estudiar el zumo de melocotón. Sin embargo, otros estudios no han logrado demostrar relación alguna entre el color y las características sensoriales, como es el caso de Alley y Alley (1998), Chan y Kane (1997), Frank y col. (1989), Gifford y Clydesdale (1986), Gifford y col. (1987), y Zampini y col. (2007; 2008).

Otros estudios realizados por DuBose y col. (1980), Christensen (1983), Guinard y Souchart (1998), y Zellner y Durlach (2003), concluyeron que unos alimentos con una coloración apropiada eran percibidos como de mayor calidad y con un flavor más intenso que aquellos que no tenían una coloración adecuada. Por otra parte, es un hecho ampliamente aceptado que los alimentos pueden ser más o menos apetecibles por su apariencia antes de probarlos (Spence y col., 2010), existiendo estudios que demuestran que la evaluación hedónica está también influenciada por el color. Por ejemplo Schutz (1954) estudió la influencia de la apariencia del zumo de naranja (OJ) en la preferencia del consumidor y observó que éstos se decantaban por los zumos más anaranjados antes que por los amarillentos. Sin embargo, hasta ahora pocos estudios han investigado el efecto que producen ligeras modificaciones en el color del OJ sobre otros atributos sensoriales como sabor y flavor.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo fue profundizar en las implicaciones del color en otros atributos sensoriales relacionados con la calidad de los zumos cítricos (sabor y flavor).

Los objetivos concretos planteados fueron:

- Examinar la influencia que ligeras modificaciones en el color (hacia tonos más rojizos y verdosos) tienen en la percepción del flavor del OJ, su dulzor y acidez.
- Examinar el efecto que esta variación de color produce en la respuesta hedónica de los consumidores antes de probar el OJ (evaluación hedónica esperada) y después (evaluación hedónica real).
- Estudiar si existen distintos grupos de población que presenten actitudes distintas ante modificaciones del color de los zumos.

## MUESTRAS

Un zumo comercial procedente de naranjas frescas (Tropicana) se eligió como zumo control (COJ). A partir de éste, se hicieron ligeras modificaciones en el tono (a rojizo y a verdoso) mediante la adición de colorantes alimentarios. 50 mg/L de colorante rojo “Red Food Colouring, Super Cook” se añadieron para obtener un OJ más rojizo (ROJ) y 250 mg/L de colorante verde “Green Food Colouring, Super Cook” para obtener un zumo ligeramente más verdoso (GOJ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Caracterización colorimétrica instrumental*

Las coordenadas colorimétricas del espacio CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) de las muestras se obtuvieron con un colorímetro (Hunterlab Color Quest XE, Universal Software V. 4.1) previamente calibrado.

Las muestras GOJ mostraron menores valores de  $a^*$  (ya que eran más verdosas), mientras que las muestras ROJ obtuvieron los valores más altos (más rojizas). Las muestras del grupo COJ se situaron entre los dos grupos anteriores. Los valores medios de la coordenada  $L^*$  fueron 47.94, 46.84 y 46.08 para GOJ, ROJ, y COJ respectivamente.

### *Percepción del flavor, el dulzor y la acidez del zumo de naranja*

Todos los ensayos sensoriales incluidos en este trabajo se realizaron en salas de cata con cabinas normalizadas y utilizando el software Fizz (Biosystemes, Couternon, Francia) para la recogida y el posterior análisis de datos.

Como paso previo, se llevó a cabo un test triangular en botes ámbar y con luz roja en el que participaron 12 panelistas. Éste sirvió para demostrar que los colorantes alimentarios utilizados no modificaban el flavor de los zumos.

Para comprobar el efecto que provocaban las variaciones de color en los zumos, 30 panelistas participaron en pruebas de comparación por parejas en las que tenían que elegir cuál de las dos muestras (GOJ-COJ; ROJ-COJ; y ROJ-GOJ) tenía un flavor más intenso a naranja, cuál era la más dulce y cuál era la más ácida. Los resultados sólo mostraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en la comparación de COJ y GOJ, eligiendo GOJ como la más ácida.

*Estudio de consumidores: Influencia del color en la evaluación del consumidor antes y después del consumo de zumo de naranja.*

En el estudio participaron 100 consumidores europeos, reclutados entre estudiantes y personal de la Universidad de Nottingham. Previamente se les realizó una encuesta para recoger tanto datos demográficos como de hábitos de consumo del OJ. Los participantes se agruparon en 10 categorías basadas en género y edad (18-25 años, 26-35 años, 36-45 años, 46-55 años, y mayores de 56 años). De los 100 consumidores, la mayoría fueron mujeres (66%) entre 18 y 25 años (57%). En cuanto a sus hábitos de consumo, el 38% de los participantes consumían zumo menos de una vez a la semana, el 18% una vez a la semana, el 12% dos veces por semana y, por último, el 32% tomaban zumo más de dos veces por semana. El tipo de zumo más consumido fue el zumo a partir de concentrado (51%), seguido del comercial procedente de naranjas exprimidas (44%), y, curiosamente, sólo un 5% de los consumidores tomaban habitualmente OJ exprimido en sus casas.

Seguidamente evaluaron las muestras de zumo en dos fases: primero otorgando la puntuación sólo después de observarlas (evaluación hedónica esperada) y a continuación, otorgando la puntuación después de haberlas ingerido (evaluación hedónica real). Para la recogida de estos datos se utilizó una escala LAM (“Escala anclada afectiva de magnitudes”). Esta escala fue elegida porque es un instrumento simple y fácil de usar para ensayos hedónicos en alimentos, y además tiene buena fiabilidad y mejor poder de discriminación que las escalas hedónicas de 9 puntos (Schutz y Cardello, 2001).

Como paso previo en el análisis de datos se aplicó el test de normalidad (Saphiro-Wilk) que confirmó que los datos obtenidos no seguían una

distribución normal ( $p < 0.05$ ). Por este motivo, se usaron pruebas no paramétricas (Wilcoxon) para realizar el análisis descriptivo de los datos y comprobar si había o no diferencias significativas entre ellos.

Los resultados mostraron diferencias significativas en la puntuación otorgada después de observar los zumos, siendo la muestra ROJ la mejor valorada (69.03). Esto puede deberse a que la adición de colorante rojo llevó a tonalidades más rojizas, provocando la percepción del zumo como más fresco y natural. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las puntuaciones otorgadas después de consumir el zumo.

Comparando la evaluación hedónica esperada con la evaluación hedónica real se observó un incremento significativo en la puntuación, después de probar el zumo, en las muestras COJ y GOJ, lo que confirma una influencia significativa del color en la evaluación hedónica esperada de estas muestras.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de Cluster para comprobar si los consumidores se podían agrupar en función de las puntuaciones otorgadas a las muestras y el resultado del mismo mostró la existencia de tres grupos diferenciados.

En el primer grupo (52%), con valores más altos en todas las muestras en ambas pruebas, no se encontraron diferencias significativas entre los distintos zumos. Sin embargo, el segundo grupo (20%) puntuó significativamente más baja la muestra control que las dos muestras modificadas en ambas evaluaciones (media de 38.80 y 46.90 en la evaluación hedónica esperada y real, respectivamente), siendo ambas puntuaciones consideradas por debajo del nivel medio de aceptación dentro de la escala. El tercer grupo (28.28%), se puntuó significativamente más baja la muestra GOJ que el resto, en el test de evaluación hedónica esperada, y COJ se puntuó significativamente mejor que las otras muestras en la evaluación hedónica real.

Comparando los datos obtenidos en la prueba de evaluación hedónica esperada con aquellos obtenidos en la evaluación hedónica real, los resultados en el primer grupo mostraron diferencias significativas entre ambas pruebas en

las muestras ROJ y GOJ, pero no en la muestra control. Por tanto para estos consumidores la variación de color tuvo una influencia negativa, ya que cuando observaron las muestras GOJ y ROJ, las puntuaron peor que después de probarlas. En el cluster 2, no se encontraron diferencias significativas entre las dos pruebas en ninguna de las muestras. Por último, el tercer grupo estuvo influenciado negativamente por la variación hacia el color verde en la muestra GOJ, puntuándose ésta como la más baja (47.71), pero mejorando la evaluación en la prueba hedónica después de su consumo (56.50). Sin embargo, evaluaron las muestras COJ y ROJ sin diferencias significativas entre ambas pruebas.

Finalmente se realizó un mapa interno de preferencias para visualizar el comportamiento de los grupos de consumidores de una manera gráfica. Las dos primeras dimensiones cubrieron el 86.18% del total de la varianza, por lo que no se consideró incluir una tercera dimensión. La segunda dimensión separó claramente la prueba hedónica real para los tres zumos (valores positivos), de la prueba hedónica esperada (valores negativos). El mapa de preferencias mostró que las puntuaciones de ambas pruebas no se separaban significativamente en el caso de las muestras COJ y ROJ pero sí en la muestra GOJ, que quedaba muy alejada del resto. La primera dimensión separó COJ del resto de las muestras aunque en la evaluación esperada ROJ se situó más cerca de COJ.

## **CONCLUSIONES**

- La variación del color de los zumos de naranja hacia tonos más verdosos aumenta la percepción de la acidez, mientras que la variación a tonos más rojizos no tiene ningún efecto en la percepción del dulzor, la acidez o el flavor.
- La percepción del dulzor y el flavor no se ve afectada por ninguna variación de color.
- Cuando se estudia la evaluación hedónica esperada y real de los zumos de naranja modificados, la muestra ROJ tiene resultados similares entre

- la evaluación hedónica esperada y la real, mientras que COJ y GOJ son evaluados de una manera diferente antes y después de la degustación.
- El análisis de cluster muestra distintas preferencias entre los grupos de población. No se encuentra ninguna relación con las características demográficas, pero los hábitos de consumo (marcas de consumo, tipo de OJ y frecuencia de consumo) parecen estar relacionados con la forma en que los consumidores evalúan los zumos antes y después de probarlos. Así, algunos grupos de población se ven más afectados que otros por el color.
  - En el grupo 1, la variación de color del zumo control hacia tonos verdosos y rojizos tiene una influencia negativa en la evaluación hedónica esperada, mientras que el grupo 3 se ve influenciado de forma negativa por las variaciones hacia el color verde. En cuanto al grupo 2, no se encuentran diferencias significativas entre la evaluación hedónica esperada y la real.
  - Estos resultados demuestran el impacto del color en la percepción sensorial del OJ aunque es necesario profundizar en la investigación para entender su influencia en la percepción y el gusto en los diferentes productos, así como en otros grupos de población.





***“Color influences sensory perception and liking of orange juice”***

<sup>1</sup>Rocío Fernández-Vázquez, <sup>2</sup>Joanne Hort, <sup>2</sup>Louise Hewson, <sup>2</sup>Ian Fisk, <sup>3</sup>Dolores Hernanz;  
<sup>1</sup>F.J. Heredia Mira; <sup>1</sup>Isabel M. Vicario<sup>(\*)</sup>

<sup>1</sup>Food Colour & Quality Laboratory, Department of Nutrition & Food Science. Universidad de Sevilla Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain. [www.color.us.es](http://www.color.us.es)

<sup>2</sup>School of Biosciences, Division of Food Sciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, Leicestershire LE12 5RD, UK

<sup>3</sup> Department of Analytical Chemistry. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain.

\* Corresponding author:

Isabel M. Vicario

Food Colour & Quality Laboratory, Department of Nutrition & Food Science. Universidad de Sevilla

Postal address: Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain

Tel.: +34 954556339 Fax: +34 954557017

Email: [vicario@us.es](mailto:vicario@us.es)

Enviado a British Food Journal (en revision)

**Structured Abstract:**

Purpose - This study was aimed to assess the effect that slight hue variations in orange juice (OJ) (reddish to greenish) on perceived flavour intensity, sweetness and sourness, and on expected and actually liking.

Design/methodology/approach - A commercial orange juice (OJ) was selected as control (COJ), and colour-modified OJs were obtained by adding red or green food dyes (ROJ and GOJ) which did not alter the flavour of the juice. A series of paired comparison tests were performed by 30 naive panellists to determine the influence of OJ colour on flavour intensity, sweetness, and sourness. Then, 100 orange juice consumers were asked to rate expected liking of OJ samples firstly by visual evaluation and subsequently for actual liking on consumption, using a labelled affective magnitude (LAM) scale.

Findings - Results of pair comparison tests indicated that colour changes did not affect flavour intensity and sweetness, but greenish hue (GOJ) significantly increased the perceived sourness. Results of the consumers' study indicated significant differences in expected liking between the OJ samples, with ROJ having the highest expected liking. However, scores of actual liking after consumption were not significantly different. COJ and GOJ showed a significant increase in actual liking compared to expected liking.

Originality/Value - The relevance of colour as a quality attribute which influences consumer perception is not fully understand. In this study we have shed some light on how slight variations in orange juice (OJ) hue (reddish to greenish hues) affect the perceived flavour intensity, sweetness and sourness, and expected and actually liking of orange juice.

**Keywords:**

Colour, orange juice, pair comparison, consumer study.

**Article Classification:**

Research paper

## **Introduction**

Orange juice, is one of the most popular and more consumed juices in the world because of its sensory properties (Rouseff et al., 2009). Among quality attributes appreciated by consumers, colour has been highlighted, as influencing consumer acceptance (Melendez-Martinez et al., 2004).

Flavour is defined as a “complex combination of the olfactory, gustatory and trigeminal sensations perceived during tasting. The flavour may be influenced by tactile, thermal, painful and/or kinaesthetic effects” (ISO, 1992). Visual and auditory cues are not intrinsic to the flavour according to the ISO, although they may modify it (Spence et al., 2010). Visual cues, such as a food’s colour, may then modify the perception of a food’s flavour by influencing the gustatory and olfactory attributes, and/or by influencing the overall multisensory flavour percept (Spence et al., 2010).

Researchers have been investigating the influence of colour in taste and flavour (both on a theoretical and practical level) and also in acceptability of food for decades but, an unequivocal answer to this question has not, as yet, been reached.

Colours of many fruits transform from green, through yellow, to red colours during the ripening process. This natural colour-taste correlation might be used to explain the findings of some studies which associate green colours with sourness and red with sweetness. For example, Maga (1974) found that red colouring had no significant effect on sensitivity to sweet taste in coloured solutions but he also concluded that addition a green colouring did increase sensitivity to sweet taste. According to Clydesdale et al. (1992) perceived sweetness of sucrose concentrations and non-alcoholic beverages increased with intensity of redness. Huggart et al. (1977) concluded that colour was related to the sweetness and other quality characteristics. The greenness-sourness and redness-sweetness associations were also found in Pangborn’s (1960) study using pear nectar.

However, according to Spence et al. (2010), other studies have failed to demonstrate any such link between colour and sensory characteristics (e.g. Alley and Alley (1998), Chan and Kane (1997), Frank et al. (1989), Gifford and Clydesdale (1986), Gifford et al. (1987), Zampini et al. (2007; 2008)).

Recently, Wei et al. (2012) quantified the relationships between orange juice colour and observer response. Acceptability for orange juice colour was examined, and relationships between juice colour and expected intensity of sourness, sweetness, bitterness, flavour strength and freshness were established using a calibrated digital display. They found that highly saturated orange juice colours tended to be expected to have a stronger flavour. The

reason for this may be that it is the natural colour for orange juice. However, this study examined only expected liking, as it was done on virtual orange juice samples shown on computer screens.

Studies by DuBose et al. (1980), Christensen (1983), Guinard and Souchard (1998) and Zellner and Durlach (2003), also claimed that appropriately coloured foods were perceived to have a stronger intensity of flavour and better quality than inappropriately coloured foods but in these studies the panellists tasted the samples, not only observed them.

It is a fact widely accepted that food can be more or less appealing because of its appearance, before testing it (Spence et al., 2010). Hedonic quality was also found to be influenced by colour. Influence of orange juice colour on appearance and flavour was studied by Schutz (1954) and the results showed that observers preferred the appearance of an orange coloured juice over a yellow coloured juice.

So far, few studies have investigated modest colour changes in orange juices without modifying other characteristics such as flavour and sweetness. Tepper (1993) was the first to explore how small amount of green food colouring added to orange juice influenced flavour, sweetness and overall liking. The study suggested that acceptance of consumers was reduced by the green colour but had little influence on flavour, sweetness and overall liking. Here, we have widened the objectives of the investigation to include a wider range of hues (using a green and red food colouring) and attributes evaluated (flavour, sweetness, and sourness). We have also evaluated expected liking and actually liking which is a relevant aspect, since colour is the first attribute evaluated by consumers prior to consumption.

## **Materials and Methods**

- **Samples**

A commercial fresh orange juice (Tropicana, United Kingdom) was selected to be the control orange juice (COJ). Two colour modified samples were prepared by addition of food colourings (Supercook, United Kingdom); 50mg/L red food colouring (ROJ) or 250mg/L green food colouring (GOJ).

- **Instrumental colour characterisation**

A Hunterlab Color Quest XE colorimeter (Universal Software V. 4.1) was used for colour measurements. Samples were measured in triplicate in a 10 mm glass cuvette (original Minolta). CIELAB (CIE, 1978) coordinates ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b$ ) were obtained directly from the instrument. The colour value " $L^*$ ", measuring lightness, is quantified on a scale from 0 to

100. The colour value "a\*" quantifies red (positive values) to green (negative values), and the colour value "b\*" quantifies yellow (positive values) to blue (negative values). From the uniform colour space, the psychological parameters chroma ( $C_{ab}^*$ ) and hue ( $h_{ab}$ ) are defined:

$$C_{ab}^* = \left[ (a^*)^2 + (b^*)^2 \right]^{1/2}$$

$$h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$$

$C_{ab}^*$  represents the quantitative attribute of colourfulness and is used to determine the degree of difference of a hue in comparison to a grey colour with the same lightness.  $h_{ab}$  represents the qualitative attribute according to which colours have been traditionally defined as reddish, greenish, etc and is used to define the difference of a colour with reference to a grey colour with the same lightness (Meléndez-Martínez et al., 2005).

Colour differences ( $\Delta E_{ab}^*$ ), which are very important to evaluate the relationships between visual and numerical analyses (Melgosa et al., 1997), were calculated as the Euclidean distance between two points in the 3-D space defined by  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ :

- **Sensory Evaluation**

*Influence of colour on perceived sweetness, sourness and OJ flavour.*

Firstly, to identify if the addition of the food colouring had any physicochemical effect that may impact flavour perception, an overall difference test (triangle test, (ISO 4120:2005, 2005)) was performed comparing both colour modified OJ's with the control OJ. 12 naive assessors were recruited from staff and students at University of Nottingham to take part in the study. Two triangle tests were performed (COJ vs ROJ and COJ vs GOJ). For each test assessors were presented with 3 samples, told 2 were identical and asked to determine the odd sample. Samples (15 ml) were presented in dark amber glass bottles, labelled with random 3 digit codes, in a randomized order across the panel and under red light conditions to ensure no visual cues were available to panellists.

To examine the influence of colour modification on perception a series of attribute specific difference tests were performed (Paired comparison, (ISO 5495:2005)). 30 untrained assessors were recruited from staff and students of University of Nottingham. Multiple pairwise comparison tests compared all combinations of COJ, ROJ and GOJ for each attribute of interest – sweetness, sourness and OJ flavour. For each paired comparison, assessors were presented with 2 samples and asked to determine which was the most intense

for the attribute in question. Samples (15 ml) were presented in clear glass vials, labelled with random 3 digit codes and the order randomised across the panel,

*Influence of colour on expected and actual liking of orange juice.*

100 European orange juice consumers were recruited from staff and students of University of Nottingham to take part in the study. Information regarding demographics and consumption and purchase habits were collected via a questionnaire prior to the sensory assessment of the samples. A labelled affective magnitude scale (LAM) was presented for consumers to rate expected liking of each of the 3 orange juices (COJ, ROJ and GOJ) based on visual assessment only. A second LAM scale was used for consumers to rate actual liking of the products following consumption. Samples (15 ml) were presented monadically in clear glass vials, labelled with random 3 digits codes, in a randomised order across the panel.

All sensory testing was carried out in purpose designed individual sensory booths, under Northern Hemisphere lighting conditions. Unsalted cracker (Rakusen's, UK) and mineral water (Evian, France) were available for assessors to palate cleanse before and between tasting samples. Data was captured using Fizz Network sensory software (Biosystemes, France).

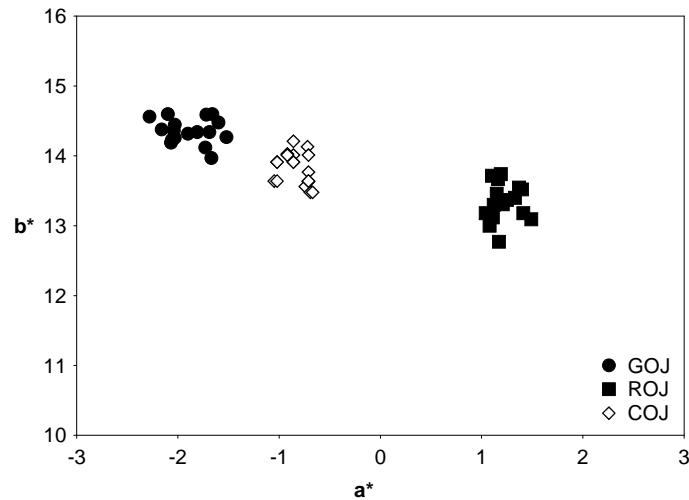
- **Data analysis**

Discrimination tests (triangle and paired comparisons) were analysed using Fizz Calculations software (Biosystemes, France). Consumer data first underwent normality testing (Saphiro-Wilk test) and was subsequently analysed using non-parametric tests to identify differences between samples (Wilcoxon test) with Statistica 8 for Windows (StatSoft, 2007), and XLStat (Version 2009.6.03, Addinsoft, USA). Consumer data were further examined using hierarchal cluster analysis, using Squared Euclidean Distances and Wards criterion and internal preference mapping (XLStat, Addinsoft, USA).

## **Results and discussion**

- **Instrumental colour characterization**

In Figure 1, the CIELAB colour space ( $a^*b^*$  plane) illustrates the colour of the samples included in this study and measured by colorimeter. It can be observed that GOJ showed lower values of  $a^*$ , while ROJ showed the highest value. COJ was placed between the other two groups. The averages of the coordinate  $L^*$  were 47.94, 46.84 and 46.08 for GOJ, ROJ, and COJ respectively. Accordingly the hue angle was lower for the ROJ ( $84.70^\circ$ ) and higher for the GOJ ( $97.28^\circ$ ), while the COJ value ( $94.25^\circ$ ) was nearer to the GOJ.



**Figure 1.** Colour coordinates of samples in the  $a^*b^*$  plane.

$\Delta E^*_{ab}$  for the samples was calculated with mean values for  $L^*$ ,  $a^*$ , and  $b^*$  corresponding to each orange juice, to ensure that the differences between samples could be noticed by the panellists. Results were 5.97; 2.84; and 3.49, between samples GOJ-ROJ; GOJ-COJ; and ROJ-COJ respectively. These values are over the range 0.38–0.73 CIELAB units, and over 1.75 CIELAB units, which are considered as the threshold and suprathreshold colour difference, respectively (Martínez et al., 2001). This means that samples were slightly different and that these differences should be perceived by a normal vision human eye.

- **Sensory Evaluation**

1. *Influence of colour on perceived sweetness, sourness and orange juice flavour*

Results from triangle tests comparing the COJ and the colour modified samples, ROJ or GOJ, provided insufficient evidence to conclude that either of the two colour modified samples were perceptibly different to the COJ ( $\alpha=0.05$ ) confirming that the dye had no influence on taste, flavour or texture.

1. *Influence of colour on sweetness perception.*

Comparisons for sweetness did not show significant differences in COJ-ROJ, COJ-GOJ or GOJ-ROJ ( $p>0.05$  in all of the cases), so across the range of colour differences in this study, sweetness did not appear to be influenced by colour (Table 1). Results in this study are in agreement with those reported by Tepper (1993) related to slight green colour variation in OJ (no effect on sweetness perception was found). Moreover, studies in other beverages and solutions also have reported similar findings. Frank et al. (1989) reported that adding red food colouring to either an odourless or strawberry odour-sweetened aqueous samples failed to



increase perceived sweetness ratings of the orange red-looking drinks relative to participants' assessment of the clear drinks; Alley and Alley (1998) reported no effect of the addition of colour (red, blue, yellow, and green) when compared to a clear, no-colour-added baseline, on participants' ratings of the sweetness of either sweetened water or gelatine samples; and Zampini et al. (2007) also failed to demonstrate an easily interpretable effect of variations in colour intensity on perceived sweetness intensity. In other hand Johnson and Clydesdale (1982) found that on average, when odourless solutions were red coloured (with different intensities), participants could more easily detect the presence of sucrose than when they were uncoloured, though the intensity of the colour did not have a significant effect on their performance.

Table 1. Influence of color on perceived sweetness, sourness and OJ flavour. Pair comparison tests.

Test	Answers Taken	Product	Answer	Signif. (Risk)
<b>Sweetness</b>				
Control vs Green	30	Control	16	0.8555
		Green	14	
Control vs Red	30	Control	16	0.8555
		Red	14	
Red vs Green	30	Red	16	0.8555
		Green	14	
<b>Sourness</b>				
Control vs Green	30	Control	9	0.0428*
		Green	21	
Control vs Red	30	Control	15	>0.9999
		Red	15	
Red vs Green	30	Red	13	0.5847
		Green	17	
<b>Flavor</b>				
Control vs Green	30	Control	14	0.8555
		Green	16	
Control vs Red	30	Control	19	0.2005
		Red	11	
Red vs Green	30	Red	14	0.8555
		Green	16	

\*Significant at  $p < 0.05$

#### *Influence of colour on sourness perception.*

Sourness perception was significantly affected in the pair COJ-GOJ ( $p < 0.05$ ) with the GOJ detected as the sourest sample (Table 1). Hence the panellists were influenced by green colour when they evaluated the sourness. Similarly, Pangborn (1960) demonstrated that green food colouring enhanced sourness ratings in pear nectar, though it should be noted that Pangborn (1963) subsequently failed to replicate this finding. Contrary to these results, Maga

(1974) reported that green and yellow colorants in water solutions decreased sour taste sensitivity and red colouring had no effect. In accordance to this, we found no significant difference in the pair ROJ-GOJ

*Influence of colour on flavour perception.*

When flavour perception was explored, again, no statistically significant differences were found in any of the comparisons (GOJ-COJ, ROJ-COJ, and GOJ-ROJ) (Table 1), in accordance with findings reported by Tepper (1993), who concluded that slight colour variation in orange juice had little influence in flavour. On the other hand, DuBose et al. (1980) reported that overall flavour intensity was affected by colour intensity, with higher colour intensity solutions giving rise to stronger flavour evaluation responses by participants for orange flavoured beverages. Meanwhile, Kostyla (1978) reported that the addition of yellow and blue colour to sweetened cherry flavoured beverages decreased flavour ratings while the addition of red colouring increased sweetness.

*2. Influence of colour on expected and actual liking*

Demographic and OJ consumption habits of the 100 consumers are described in Table 2. Among the 100 consumers, the majority were females (66%), between 18 and 25 years (57%). In terms of consumptions habits, 38% of the consumers consumed OJ less than once a week, 18% once a week, 12% twice a week and finally, 32% of consumers consumed OJ more than twice a week. The most frequently consumed OJ was from concentrate (51%), followed by freshly squeezed (44%), and only 5% of consumers reported to consume homemade OJ. Finally, the most frequently consumed brand was Tropicana (33%) which was the one chosen for this study, followed by other retailed brands as Tesco and Sainsbury, (19 and 13% respectively).

Table 2. Demographic characteristics and OJ consumptions habits.

	Frecuency response (%)
Gender	
Male	34
Female	66
Age	
18-25	57
26- 35	20
36-45	10
46-55	4
Over 55	9
Consumption habits	
< once a week	38
Once a week	18
Twice a week	12
>Twice a week	32
Kinds of OJ	
From concentrate	51
Freshly squeezed	44
Homemade	5
OJ brands	
Tropicana	33
Tesco	19
Sainsbury	13
ASDA	2
Morrisons	3
Other	19
Not answer	11

Results showed (Table 3) significant differences in expected liking, with the ROJ scoring highest (mean 69.03). This is likely to relate to the association of more reddish hues to a freshly squeezed orange juice so indicating superior quality. However, there were not significant differences in actual liking between any of the samples, this result would be in accordance with Tepper (1993), who concluded that slight green colour variation reduced consumer acceptance but had little influence on overall liking. Moreover, it can be observed that when comparing expected liking with actual liking, there was a significant increase in actual liking of COJ and GOJ, suggesting that modification of the OJ colour resulted in a negative impact on consumers expected liking.

Table 3. Mean and standard deviations score for the samples.

	Expected liking	Actually Liking
Control OJ	62.59 ± 17.73 <sup>a1</sup>	66.40 ± 18.06 <sup>b1</sup>
Red OJ	69.03 ± 12.81 <sup>a2</sup>	68.48 ± 15.89 <sup>a1</sup>
Green OJ	64.18 ± 15.21 <sup>a1</sup>	69.34 ± 14.13 <sup>b1</sup>

Different letters superscripts within rows and different numbers within columns indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

### *Cluster Analysis.*

In order to find out if there were groups of consumers differing in expected and actual liking, a segmentation of the panel group was done by Cluster analysis (Vigneau et al., 2007) and three groups of consumers were clearly identified (Figure 2).

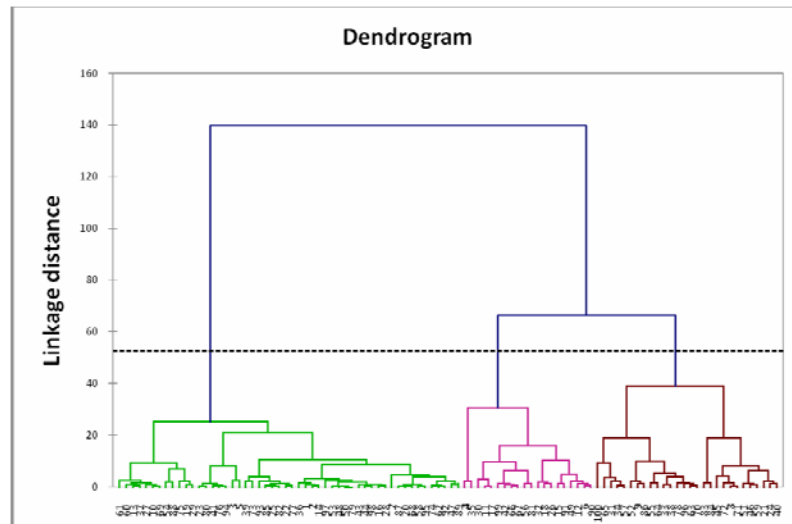


Figure 2. Dendrogram of consumers (n = 100)

Characteristics of each cluster in terms of demography and orange juice consumption are showed in Table 4. No marked differences in demographic characteristics were found. However, differences in OJ consumption frequency was observed; cluster 1 consumed OJ more frequently than the others clusters, with 44.2% consuming OJ more than twice a week in comparison to 15% and 21.4% of consumers in clusters 2 and 3 respectively. In terms of the kind and brands of the OJ mostly consumed, clear differences were also found. Cluster 2 have a higher consumption of Morrisons (19%) compared to other clusters but not compared to their consumption of other brands, moreover they reported a higher consumption of homemade OJ (10%). While in cluster 3 concentrate OJ (57.1%) was primarily consumed followed by freshly squeezed (39.3%), in cluster 1 more people reported to consume freshly squeezed OJ followed by concentrate OJ (51.9% and 44.2% respectively). Different kinds and brands of OJ have different colours (Fernández-Vázquez et al., 2010), and this may have influenced the consumer scores, as they would be familiar with a certain colour in OJ. Scores for the samples given by each cluster are reflected in Table 5.

Table 4. Demographic characteristics and OJ consumptions habits for each cluster.

	Frequency response (%)		
	Cluster 1, n=52	Cluster 2, n=20	Cluster 3, n=28
Gender			
Male	38.5	30	28.6
Female	61.5	70	71.4
Age			
18-25	63.5	55	46.4
26- 35	13.5	30	25
36-45	13.5	5	7.1
46-55	1.9	5	7.1
Over 55	7.7	5	14.3
Consumption habits			
< once a week	30.8	40	50
Once a week	13.5	35	14.3
Twice a week	11.5	10	14.3
>Twice a week	44.2	15	21.4
Kinds of OJ			
From concentrate	44.2	60	57.1
Freshly squeezed	51.9	30	39.3
Homemade	3.8	10	3.6
OJ brands			
Tropicana	36.54	25	32.14
Tesco	23.08	18	10.71
Sainsbury	13.46	20	7.14
ASDA	3.84	0	0
Morrisons	1.92	19	3.57
Other	11.54	25	28.57
Not answer	9.62	20	17.86

*Differences among samples in expected and actual liking.*

Cluster 1 (52%), were the most frequent OJ consumers, scored all the samples higher in expected and actual liking than the other clusters and showed no significant differences in either expected or actual liking between the samples (Table 5). However, the Cluster 2 (20%) scored the control sample significantly lower in expected and actual liking compared to the colour-modified samples (average 38.80 and 46.90 respectively), so evaluated it as disliked, demonstrating significant differences from the rest of the samples. Interestingly, this cluster consumed the brand Tropicana (used in this study as control sample) in less proportion than the other groups. In Cluster 3 (28.28%), GOJ was scored significantly lower than the other samples for expected liking (47.71 as opposed to 61.96 and 63.14 for COJ and ROJ, respectively) whilst COJ was scored significant higher than the other samples in actual liking (68.43 in front of 56.89 and 56.50 for ROJ and GOJ, respectively).

Table 5. Mean and standard deviations score for the samples in each cluster.

Cluster	Samples	Expected liking	Actually Liking
1 (n=52, 52%)	Control OJ	72.08 ± 9.78 <sup>a1</sup>	72.81 ± 13.20 <sup>a1</sup>
	Red OJ	72.06 ± 11.20 <sup>a1</sup>	76.35 ± 8.71 <sup>b1</sup>
	Green OJ	72.06 ± 9.92 <sup>a1</sup>	77.17 ± 10.15 <sup>b1</sup>
2 (n=20, 20%)	Control OJ	38.80 ± 11.69 <sup>a1</sup>	46.90 ± 18.58 <sup>a1</sup>
	Red OJ	69.40 ± 15.44 <sup>a2</sup>	64.25 ± 17.01 <sup>a2</sup>
	Green OJ	66.75 ± 8.56 <sup>a2</sup>	66.95 ± 11.09 <sup>a2</sup>
3 (n=28, 28%)	Control OJ	61.96 ± 16.82 <sup>a1</sup>	68.43 ± 16.09 <sup>a1</sup>
	Red OJ	63.14 ± 11.97 <sup>a1</sup>	56.89 ± 17.53 <sup>a2</sup>
	Green OJ	47.71 ± 14.32 <sup>a2</sup>	56.50 ± 12.57 <sup>b2</sup>

Different superscripts letters within rows and different numbers within columns for each cluster indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ).

#### *Expected liking vs. actual liking.*

Consumers in cluster 1 showed significant differences between expected and actual liking for ROJ and GOJ. For these consumers colour hue variation in relation to COJ had a negative influence on expected liking, since scores were lower than actually liking. In cluster 2 significant differences between expected and overall liking were not found for any of the samples. Finally, Cluster 3 was clearly negatively influenced by green colour in the sample, scoring GOJ as the lowest in expected liking (mean 47.71) indicating that they disliked the sample, however, on consumption of the sample, liking increased (actual liking score mean 56.50). There were no significant differences in this cluster between expected and actual liking for COJ and ROJ samples.

These results, in general agree with results published previously by Fernández-Vázquez et al. (2011) suggesting that no clear preferences for any colour was observed but, there are some segments in population that showed different preference in OJ colour. They found that consumer clusters did not differ in terms of gender, age, or consumption habits indicating that these variables did not influence colour preference patterns. Other previous studies on consumer's colour acceptance of a different product (strawberry nectar from puree) showed similar results, indicating that neither gender nor age or consumption habits had significant impact on colour acceptance (Gossinger et al., 2009).

#### *Internal Preference mapping.*

Internal preference mapping refers to the analysis of preference data only and it was conducted to visualize the behaviour of the clusters of consumers. Two preference dimensions accounted for 86.18% of the total variance, so the third preference dimension was not considered. In Figure 3 it can be observed that the second dimension clearly separated the

actual liking for the three orange juices (positive values) from the expected liking (negative values). In COJ and ROJ actual liking and expect liking were not significantly separated this was not the case for GOJ for which expected and actual liking were clearly separated.

Considering actual liking, cluster 1 showed preferences for ROJ and GOJ, while cluster 3 was clearly closer to COJ, indicating an increase in the scores after tasting the OJs. However, cluster 2, which was situated in the lower half of the second dimension, did not show any preference for any of the OJs after tasting them. On the other hand this cluster (2) showed a clear preference for ROJ but only before testing it.

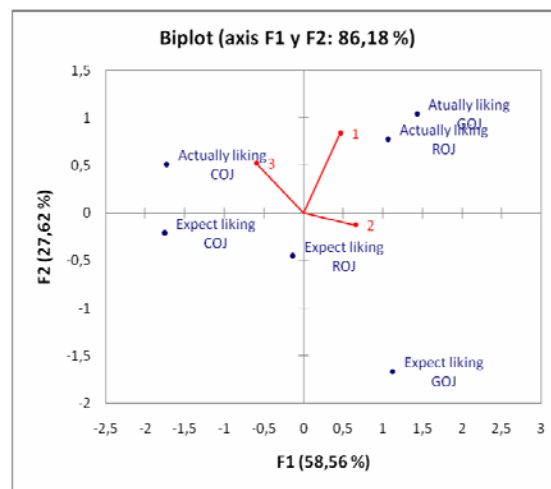


Figure 3. Internal preference mapping defined by the two first preference dimensions from the consumers' cluster.

## Conclusions

In this research, the variation of OJ colour towards more greenish hues was found to increase the sourness perception, while variations to more reddish hues did not have any effect. Sweetness and flavour were not affected by colour variation. When expected liking and actual liking of colour modified OJs were evaluated using a consumer panel some interesting results were observed. While ROJ was similar in expected and actual liking, COJ and GOJ were evaluated significantly different after tasting. The cluster analysis showed different preferences for different groups of population. No relationship with demographics characteristics were found in the clusters but consumption habits (brands, type of orange juice and frequency of consumption) seemed to be related with expected and actually liking of OJ. Some groups of population were more affected than others by colour. In cluster 1, colour hue variation in relation to COJ had a negative influence in the expected liking and cluster 3 was clearly negatively influenced by green colour. However, significant differences between

expected and overall liking were not found in cluster 2. The impact of colour on sensory perception remains inconclusive and more research is needed to understand its influence on perception and liking in different products, since it seems to be product specific.

### **Acknowledgments**

This work was supported by funding from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía by the project P08- AGR-03784. RFV holds a grant from the Conserjería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.



## References

Alley, R.L. and Alley, T.R. (1998), "The influence of physical state and color on perceived sweetness", *Journal of Psychology: Interdisciplinary Applied*, vol. 132, pp. 561-568.

Chan, M.M. and Kane-Martinelly, C. (1997), "The effect of color on perceived flavor intensity and acceptance of foods by young adults and elderly adults", *Journal of American Dietetic Association*, vol. 132, pp. 561-568.

Christensen, C.M. (1983), "Effects of Color on Aroma, Flavor and Texture Judgments of Foods", *Journal of Food Science*, vol. 48, No. 3, pp. 787-790.

Clydesdale, F.M., Gover, R., and Fugardi, C. (1992), "The effect of color on thirst quenching, sweetness, acceptability and flavour intensity in fruit punch flavored beverages", *Journal of Food Quality*, vol. 15, No. 1, pp. 19-38.

Dubose, C.N., Cardello, A.V., and Maller, O. (1980), "Effects of colorants and flavorants on identification, perceived flavor intensity, and hedonic intensity, and hedonic quality of fruit-flavored beverages and cake", *Journal of Food Science*, vol. 45, No. 5, pp. 1393-1399.

Fernández-Vázquez R., Stinco C, Escudero-Gilete M.L., Melendez-Martinez, A.J., Heredia, F.J., and Vicario I.M. (2010), "Estudio Preliminar Sobre la Utilidad del Color para Clasificar los Zumos de Naranja Según su Elaboración", *Optica Pura y Aplicada*, vol. 43, No. 4, pp. 245-249.

Fernández-Vázquez, R., Stinco, C., Melendez-Martinez, A.J., Heredia, F.J., and Vicario I.M. (2011), "Visual and instrumental evaluation of orange juice color: a consumers' preference study", *Journal of Sensory Studies*, vol. 26, No. 6, pp. 436-444.

Frank, R.A., Ducheny, K., and Mize, S.J. (1989), Strawberry odor, but not red color, enhances the sweetness of sucrose solutions. *Chemical Senses*, vol. 14, No. 3, pp. 371-377.

Gifford, S.R. and Clydesdale, F.M. (1986), "The psychophysical relationship between color and sodium chloride concentrations in model systems", *Journal of Food Protection*, vol. 49, pp. 977-982.

Gifford, S.R., Clydesdale, F.M., and Damon, R.A. (1987), "The psychophysical relationship between color and salt concentrations in chicken flavored broths", *Journal of Sensory Studies*, vol. 2, No. 2, pp. 137-147.

Gossinger, M., Mayer, F., Radochan, N., Höfler, M., Boner, A., Grolle, E., Nosko, E., Bauer, R., and Berchofer, E. (2009), "Consumer's color acceptance of strawberry nectars from puree", *Journal of Sensory Studies*, vol. 24, pp. 78-92.

Guinard, J., Souchrd, A., Picot, M., and Rogeaux, M.S.J.M. (1998), "Determinants of the Thirst-quenching Character of Beer" *Appetite*, vol. 31, No. 1, pp. 101-115.

Huggart, R.L., Petrus, D.R., and Buzz Lig, B.S. (1977), "Color aspects of Florida commercial grapefruit juices", *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, vol. 90, pp. 173-175.

ISO 5492:1992. (1992), Standard 5492: terms relating to sensory analysis. International Organization for Standardization.

ISO 4120:2005. (2005), Sensory analysis. Methodology. Triangle test. International Organization for Standardization.

ISO 5495:2005. (2005), Sensory analysis. Methodology. Paired comparison test. International Organization for Standardization.

Johnson, J. and Clydesdale, F.M. (1982), "Perceived Sweetness and Redness in Colored Sucrose Solutions", *Journal of Food Science*, vol. 47, No. 3, pp. 747-752.

Kostyla, A.S. (1978), *The psychophysical relationships between color and flavor of some fruit flavored beverages*. University of Massachusetts, Amherst.

Maga, J.A. (1974), "Influence of color on taste thresholds", *Chemical Senses and Flavor*, vol. 1, pp. 115-119.

Martínez, J.A., Melgosa, M., Pérez, M.M., Hita, E., and Negueruela, A.I. (2001), "Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines", *Food Science and Technology International*, vol. 7, No. 5, pp. 439-444.

Melendez-Martinez, A.J., Vicario I.M, and Heredia, F.J. (2004), El color del zumo de naranja (II): Aspectos físicos. *Alimentación, equipos y tecnología*, vol. 186, pp. 103-106.

Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., and Heredia, F.J. (2005), "Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: effect of the background", *Food Quality and Preference*, vol. 16, No. 5, pp. 471-478.

Melgosa, M., Hita, E., Poza, A.J., Alman, D.H., and Berns, R.S. (1997), "Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors", *Color Research & Application*, vol. 22, No. 3, pp. 148-155.

Pangborn, R.M.H.B. (1963), "The influence of color on discrimination of sweetness and sourness in pear-nectar", *American Journal of Psychology*, vol. 76, pp. 315-317.

Pangborn, R.M. (1960), "Influence of Color on the Discrimination of Sweetness. The American", *Journal of Psychology*, vol. 73, No. 2, pp. 229-238.

Rouseff, R.L., Ruiz Perez-Cacho, P., and Jabalpurwala, F. (2009), "Historical Review of Citrus Flavor Research during the Past 100 Years", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, No. 18, pp. 8115-8124.

Schutz, H.G. (1954), *Colour in relation to food preference*, Colour in foods, a symposium, pp. 16-21.

Spence, C., Levitan, C.A., Shankar, M.U., and Zampini, M. (2010), "Does Food Color Influence Taste and Flavor Perception in Humans?", *Chemosensory Perception*, vol. 3, pp. 68-84.

Tepper, B.J. (1993), "Effects of a slight color variation on consumer acceptance of orange juice", *Journal of Sensory Studies*, vol. 8, No. 2, pp. 145-154.

Vigneau, E., Qannari, E.M., Punter, P.H., and Knoop, S. (2007), "Segmentation of a panel of consumers using clustering of variables around latent directions of preference", *Food Quality and Preference*, vol. 12, No. 5-7, pp. 359-363.

Wei, S.-T., Ou, L.-C., Luo, M.R., and Hutchings, J.B. (2012), "Optimisation of Food Expectations Using Product Colour and Appearance", *Food Quality and Preference*, vol. 23, pp. 49-62.

Zampini, M., Sanabria, D., Phillips, N., and Spence, C. (2007), "The multisensory perception of flavor: Assessing the influence of color cues on flavor discrimination responses", *Food Quality and Preference*, vol. 18, No. 7, pp. 975-984.

Zampini, M., Wantling, E., Phillips, N., and Spence, C. (2008), "Multisensory flavor perception: Assessing the influence of fruit acids and color cues on the perception of fruit-flavored beverages", *Food Quality and Preference*, vol. 19, No. 3, pp. 335-343.

Zellner, D.A. and Durlach, P. (2003), "Effect on color on expected and experienced refreshment, intensity, and liking of beverages", *The American Journal of Psychology*, vol. 116, pp. 633-647.



## **Capítulo 5: EFECTO DEL PROCESADO INDUSTRIAL DE DESAMARGADO EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES DEL ZUMO DE NARANJA**

### **ANTECEDENTES**

El OJ es uno de los zumos de fruta más populares del mundo, debido en gran parte, a sus apreciadas propiedades sensoriales (Melendez-Martinez y col., 2004). Sin embargo, uno de los principales problemas que se presenta en la industria de zumos cítricos es la formación de compuestos amargos después de la extracción del zumo (Fayoux y col., 2007).

Los limonoides son un grupo de compuestos relacionados químicamente con los derivados triterpénicos. Estos compuestos están presentes en el albedo y las semillas de ciertas variedades de naranja y pomelo en forma de monolactona de limonina (compuesto insípido). Cuando el tejido de la fruta es dañado o se extrae el zumo, este compuesto entra en contacto con el medio ácido y se convierte en limonina (compuesto amargo).

Altos niveles de amargor en el zumo de naranja provocan desagrado en los consumidores, por lo que un proceso de desamargado (DP) en el OJ se hace necesario en algunas naranjas para mejorar la aceptabilidad por parte de los consumidores.

La técnica más utilizada en la industria cítrica para reducir el desamargado es la eliminación de forma selectiva de los limonoides mediante el uso de polímeros absorbentes (Johnson y Candler, 1986; Konno y col., 1982). Sin embargo, algunos estudios han concluido que otros compuestos, además de la limonina, pueden verse reducidos por el DP, como la vitamina C, la hesperidina, y la naringina, o los compuestos fenólicos (Lee y Kim, 2003). Además de estas disminuciones, los polímeros adsorbentes podrían tener también la capacidad de adsorber compuestos volátiles, como han concluido algunos estudios en otros procesos industriales (Ericson y col., 1992; Krings y col., 1993; Selli y col., 2003; Tseng y col., 1993). En este sentido, en el zumo de naranja después del DP también ha sido descrito un efecto de “perdida de

flavor” (Fayoux y col., 2007). Sin embargo, esta adsorción del flavor durante el DP podría tener un efecto positivo en la calidad sensorial del OJ, ya que algunos compuestos conocidos como “off-flavours”, o sus precursores, podrían verse también reducidos (Ma y Lada, 2003). Otras propiedades sensoriales, como el color, podrían verse también modificadas debido a una posible adsorción de los pigmentos en la resina durante el DP (Lee y Kim, 2003).

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue estudiar el efecto del DP industrial en algunos parámetros de calidad del OJ (*Citrus sinensis L. Var. salustiana*) relacionados con la percepción sensorial.

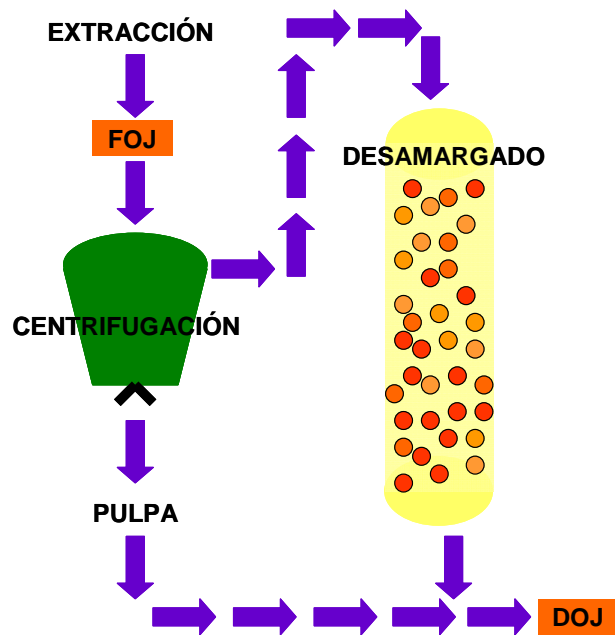
Los objetivos concretos planteados fueron:

- Evaluar el efecto del DP en los parámetros fisicoquímicos.
- Estudiar cómo influye el DP en el contenido fenólico.
- Analizar las coordenadas colorimétricas de los zumos (mediante análisis de imagen) en los OJ antes y después del DP.
- Estudiar el efecto que produce el DP en el perfil aromático.
- Evaluar el efecto del DP en la percepción sensorial de los panelistas.

## MUESTRAS

Las muestras de zumo de naranja variedad Salustiana se tomaron directamente de la línea industrial de producción de la empresa " Zumos Pascual" (Palma del Río, Córdoba, España) en diferentes momentos durante la temporada 2011. El proceso industrial consiste en la extracción del zumo con un extractor industrial tipo FMC® (FMC Food Tech System Citrus, Lakeland, EE.UU.). Posteriormente el zumo se pasa por dos filtraciones “finishers” cuya función es la eliminación de restos de cáscaras, semillas y algo de pulpa. Las muestras de zumo fresco (FOJ) se tomaron al finalizar esta etapa.

El proceso de desamargado comienza con una centrifugación (modelo de centrífuga GEA Westfalia Group, Munich, Alemania) para eliminar el exceso de pulpa hasta alcanzar una proporción del 1-3% (p/p). Posteriormente, el zumo pasa a través de una columna, rellena con una resina polimérica, específica para eliminar los componentes amargos. Esta resina es neutra, hidrofóbica sin grupos funcionales, y está formada por perlas porosas de tamaño uniforme (0.44 a 0.54 mm). El modelo de resina utilizado fue Lewatit VPOC 1064 PH MD (Bayer, Alemania). Después de pasar a través de la resina, el zumo se reconstituye mediante la adición de pulpa hasta el nivel deseado. Las muestras de zumo desamargado (DOJ) se tomaron al finalizar esta etapa. Se analizaron un total de 27 muestras FOJ y DOJ tomadas en 9 fechas distintas (3 muestras/día).



**Figura 51.** Esquema del proceso de desamargado



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Parámetros fisicoquímicos*

La acidez, el pH, y los sólidos solubles totales se midieron según los métodos de la AOAC (AOAC, 1995).

El DP no produjo variaciones significativas en los parámetros fisicoquímicos. El valor de pH osciló entre  $3.9 \pm 0.1$  en el FOJ y  $4.0 \pm 0.2$  en el DOJ, lo que coincide con resultados previamente publicados para esta variedad (Del Caro y col., 2004). Igualmente la acidez presentó valores entre 0.6 a 0.8 g de ácido cítrico/100 mL, en ambos zumos. Estudios previos (Del Caro y col., 2004; Gómez-López y col., 2010), encontraron valores de acidez ligeramente más altos en OJ frescos (0.9-1.1 g ácido cítrico/100 mL). Kola y col.(2010) tampoco observaron un descenso significativo de la acidez causado por el DP, con un valor de 1.4 g ácido cítrico/100 mL. El rango de sólidos solubles totales analizado fue de 10.1 a 12.5 °Brix (media 11.7 °Brix) en FOJ, lo cual está muy próximo a los valores publicados para zumos de otras variedades de naranjas (11.9 - 12.8 °Brix) (Del Caro y col., 2004; Tribess y col., 2009). En el DOJ el valor fue de  $11.2 \pm 0.5$  °Brix, sin un descenso significativo en relación con FOJ. de acuerdo con los resultados de otros autores (Kola y col.,(2010).

### *Contenido de fenoles totales*

El contenido de fenoles totales, determinado por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, Jr., 1965), fue de  $716 \pm 109$  mg ácido gálico/L, valor similar al encontrado en otras variedades de naranjas (524-696 mg ácido gálico/L) (Rapisarda y col.,2008), aunque más alto que el de la naranja sanguina (255 mg ácido gálico/L) (Tounsi y col.(2011) El DP produjo un descenso ( $p < 0.05$ ) significativo en el contenido de fenoles totales del 24%, presentando el DOJ una concentración de  $547 \pm 109$  mg ácido gálico/L.

### *Medida instrumental del color*

Las muestras utilizadas en este trabajo fueron colocadas en botes de plástico de 75 mL de capacidad para evaluarlas colorimétricamente mediante

análisis de imagen (Sistema DigiEye, VeriVide Ltd., Leicester, Reino Unido) utilizando un entorno gris y un fondo blanco.

Los valores de  $L^*$  fueron  $63.03 \pm 1.29$  y  $61.08 \pm 1.32$ , en FOJ y DOJ, respectivamente, mostrando un incremento en los valores medios del 12.36% como consecuencia del DP, mientras que los valores medios de tono descendieron un 2.13% (de 83.23 a 81.45) en DOJ, siendo ambos cambios estadísticamente significativos. Esto quiere decir que los zumos se hicieron más oscuros y rojizos después del tratamiento. En cuanto al croma, los valores fueron  $60.24 \pm 1.35$  y  $60.22 \pm 1.20$  en FOJ y DOJ, respectivamente. Este parámetro colorimétrico no mostró un claro patrón de comportamiento comparando FOJ y DOJ.

Las diferencias de color ( $\Delta E^*_{ab}$ ) entre FOJ y DOJ presentaron un valor medio de 2.72. Además, estas diferencias fueron divididas entre los tres componentes que la integran: diferencias de claridad ( $\Delta L^*$ ), croma ( $\Delta C^*_{ab}$ ), y tono ( $\Delta H^*_{ab}$ ), comprobándose que las mayores contribuciones a la diferencia total de color procedían de las diferencias de tono y claridad.

#### *Análisis de compuestos volátiles por cromatografía de gases*

El perfil aromático de los OJ fue analizado mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama. Los compuestos analizados fueron limoneno,  $\alpha$ -pineno, etil butirato, octanal, linalol, y citral, elegidos por haber sido identificados en la bibliografía como los que más contribuyen al aroma del OJ, pudiendo incluso ser usados en la autenticación del mismo (Robards y Antolovich, 1995). Además, también se analizó el  $\alpha$ -terpineol, que es un compuesto conocido por ser responsable de un cierto aroma desagradable en el zumo (Naim y col., 1998).

Las concentraciones de todos los compuestos aromáticos descendieron de forma significativa ( $p < 0.05$ ) en los zumos desamargados, con reducciones entre el 16 al 61%, respecto al zumo fresco. Estos resultados son similares a los obtenidos por Kranz y col. (2011) para el desamargado de zumo de pomelo, en el que concluyeron que el DP tenía un fuerte impacto en los compuestos

volátiles del mismo. El compuesto de mayor concentración fue el limoneno, compuesto reconocido como el terpeno mayoritario en el OJ (Brat y col., 2003; Fan y col., 2009; Jordan y col., 2001; Kelebek y Selli, 2011; Moufida y Marzouk, 2003; Rega y col., 2004). Éste presentó concentraciones de  $1667 \pm 330$  y  $793 \pm 395$  mg/L en FOJ y DOJ, respectivamente. El siguiente compuesto, en niveles de concentración fue el etil butirato (108 mg/L en FOJ) seguido por el  $\alpha$ -pineno (21 mg/L en FOJ). Kranz y col. (2011) también encontraron que el  $\alpha$ -terpineol era el compuesto que presentaba una mayor afinidad por la resina adsorbente, sin embargo, en nuestro estudio, el octanal fue el compuesto que decreció en mayor proporción, de 13 a 5 mg/L (61 % de descenso) como consecuencia del DP.

#### *Análisis multivariante*

Por último, se realizó un análisis multivariante para determinar si era posible discriminar entre los dos tipos de zumos según el contenido fenólico total, los parámetros colorimétricos y el perfil aromático. Se realizó un análisis discriminante usando el DP como criterio para la comparación y de todas las variables incluidas, siete fueron significativas ( $p < 0.05$ ): contenido total de fenoles,  $\alpha$ -pineno, linalol,  $\alpha$ -terpineol, a\*, etil butirato y b\* (en orden decreciente según su contribución). Como fueron considerados sólo dos grupos de muestras en el modelo, se obtuvo una única función de clasificación, con un porcentaje de clasificación correcta de las muestras del 100%.

#### *Análisis sensorial*

Para evaluar si el DP produce diferencias perceptibles de color, aroma y gusto se realizaron, de forma separada, pruebas específicas de comparación por parejas (ISO 5495:2005). En el estudio participaron panelistas no entrenados seleccionados entre el personal y los estudiantes de la Universidad de Sevilla (n=12). Cada pareja de muestras (FOJ versus DOJ) fue evaluada en su fase visual, olfativa y gustativa en sesiones distintas, teniendo los panelistas que decidir si encontraban diferencias o no entre ellas. Además, en todas las sesiones, los panelistas podían decidir cual de las muestras preferían y realizar comentarios respecto a los OJs.

En primer lugar se llevó a cabo la prueba visual, y sus resultados demostraron que existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la percepción del color de los OJs por parte de los panelistas. Las diferencias de color ( $\Delta E^*_{ab}$ ) entre cada par de muestras podría explicar estos resultados ya que, como se discutió anteriormente, la media de la diferencia de color fue de 2.72 unidades CIELAB. En cuanto a la preferencia por uno u otro tipo de muestras, no se observó un patrón claro en el panel. El 37% de los panelistas no mostró preferencia por ninguna de las muestras, el 48% prefirió DOJ y sólo el 15% mostró preferencia por FOJ.

En segundo lugar, se llevó a cabo la prueba olfativa, que también mostró diferencias significativas entre FOJ y DOJ ( $p < 0.05$ ). Además, el 71% mostró preferencias por FOJ, lo que implica que el DP podría tener un efecto negativo en el OJ. Este resultado podría explicarse por la importante reducción de los compuestos aromáticos que ocurre como consecuencia del DP. Por ejemplo, el octanal, limoneno y  $\alpha$ -pineno, que fueron los compuestos que sufrieron una mayor reducción, son también los responsables de ciertas propiedades sensoriales positivas del OJ, aportando notas cítricas, a limón y menta, y a pino al aroma del OJ, respectivamente (Arena y col., 2000; Arena y col., 2006; Rega y col., 2003). El  $\alpha$ -terpineol también sufrió un importante descenso (30%), pero este hecho no fue suficiente para contrarrestar el efecto negativo producido por el resto de reducciones en los compuestos volátiles de impacto en la percepción del aroma.

Por último, con los resultados de las pruebas de comparación por parejas en la fase gustativa se puede concluir que existían diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre FOJ y DOJ. Sin embargo, una vez más, la preferencia de los panelistas no fue claramente mayoritaria por ninguno de los tipos, ya que el 53% prefirió FOJ, el 35% DOJ y un 13% no mostró preferencia hacia ningún tipo de muestras. El hecho de que no exista una preferencia clara hacia las muestras después del DP, pudo deberse a que, aunque el DP reduce el amargor de las muestras, para algunos panelistas éstas resultaron también demasiado suaves y artificiales.

## CONCLUSIONES

- El proceso de desamargado mediante resinas adsorbentes reduce significativamente el contenido de fenoles totales y de los principales compuestos aromáticos analizados.
- Los parámetros colorimétricos también se vieron afectados por el desamargado, dando zumos más rojizos y oscuros.
- El proceso de desamargado afecta al color, aroma y sabor del OJ y a la forma en la que éstos eran percibidos por panelistas no entrenados.
- Se observa una preferencia significativa en el aroma de los zumos antes de sufrir el proceso de desamargado, pero no en el gusto y el color.

**“Industrial Orange Juice Debitting: Effect on volatile compounds and overall quality attributes”.**

Running title: Overall quality of debittered orange juices

<sup>1</sup>Rocío Fernández-Vázquez, <sup>1</sup>Carla M. Stinco, <sup>2</sup>Dolores Hernanz, <sup>1</sup>Francisco J. Heredia,  
<sup>1</sup>Isabel M. Vicario

<sup>1</sup>Food Colour & Quality Laboratory. Department Nutrition & Food Science. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain. [www.color.us.es](http://www.color.us.es)

<sup>2</sup>Department Analytical Chemistry. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain.

\*Correspondence author:

I.M. Vicario

Food Colour & Quality Laboratory. Department Nutrition & Food Science. Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla

E-mail: [vicario@us.es](mailto:vicario@us.es) Tel: + 34 954556339

Enviado a International Journal of Food Science and Technology (en revision)

## **Abstract**

This study was aimed to analyse the impact of the debittering process (DP) in the overall sensory properties of orange juice (OJ) (*Citrus sinensis* L. Var. Salustiana). The industrial squeezed orange juice (FOJ) and the corresponding OJ after the DP (DOJ) were taken. No significant differences were found in acidity, pH and total soluble solids. Colour was evaluated by image analysis (DigiEye System). Hue and lightness were lower (more reddish and darker) after debittering ( $p < 0.001$ ). Odour profile (limonene,  $\alpha$ -pinene, ethyl butanoate, octanal, linalool, citral and terpineol) decreased significantly (from 16 % to 61 % on average) as well as total phenolic compounds measured by Folin Ciocalteu ( $p < 0.05$ ).

The influence of the debittering on the perceived colour, smell and taste was evaluated by paired comparison tests. The naïve panellists found significant differences not only in taste but also in colour and aroma between FOJ and DOJ, however, preference was not clear.

**Key words:** aroma, colour, debittering, orange juice.

## Introduction

Orange juice is one of the most popular fruit juices and the most consumed in the world, (Melendez-Martinez *et al.*, 2004) largely due to its pleasant sensory properties. One of the major problems in the juice industry worldwide is the formation of bitter compounds after extraction from the fruit (Fayoux *et al.*, 2007). It is due to the formation of limonin from its precursor, limonoate A-ring lactone, when it is released in an acid medium after juice extraction from the membrane tissues (Maier and Beverly, 1968).

High levels of bitterness in orange juices cause dislike among consumers, so debittering of orange juice (OJ) is necessary in early and mid-season oranges to improve the acceptability of OJ by consumers. The most commonly used method to reduce the bitterness in processed citrus juices is the use of polymeric adsorbents to selectively remove limonoids (Johnson and Candler, 1986; Konno *et al.*, 1982). Other compounds rather than limonoids may be reduced by the debittering process (DP) such as vitamin C, hesperidin, and naringin or total phenolic compounds (Kranz *et al.* 2011; Kimball and Norman, 1990; Lee and Kim, 2003).

In addition to the sorption of bitter phenolic compounds, polymeric adsorbents also have the ability to adsorb volatile flavour compounds, as reported for other industrial processes (Ericson, *et al.*, 1992; Krings *et al.*, 1993; Tseng *et al.*, 1993; Selli *et al.*, 2003). In this sense, in debittered orange juice a 'flavour scalping' effect has been described (Fayoux *et al.*, 2007). However, flavour adsorption during the DP may have a positive effect on the sensory quality of orange juices when off-flavours or their precursors are adsorbed (Ma and Lada, 2003). Off-flavours can be formed during heat treatment and storage of juices and have a negative sensory impact on the product. The major off-flavour compound in citrus juices is  $\alpha$ -terpineol, which is formed from d-limonene and linalool (Haleva-Toledo *et al.*, 1999).

Other sensory properties, like colour, could be modified due to a possible absorption of pigments by the resins during the DP (Lee and Kim, 2003).

The aim of this work was to explore the effect of the DP on some quality parameters of OJ (*Citrus sinensis* L. Var. salustiana) related with the sensory perception (phenolic compounds, volatile composition and colour parameters) that could be also affected by the DP, beyond the bitter taste itself. Furthermore, the effect on the perception of orange juice overall quality was also explored by a naïve panel.



## **Material and methods**

### *Chemicals*

The standards limonene,  $\alpha$ - pinene, linalool, octanal, citral, ethyl butyrate, terpineol and gallic acid were purchased from Sigma Aldrich (Poole, United Kingdom). Methanol (HPLC grade) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain), and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and Folin Ciocalteu from Sigma Aldrich (Poole, United Kingdom).

### *Orange juices samples*

Orange juices *Citrus sinensis* cv Salustiana were directly taken from commercial orange juice production line at the firm “Zumos Pascual” (Palma del Rio, Cordoba, Spain) at different times during 2011 season (from February to March).

In the industry, the fresh orange juice is mechanically extracted with an FMC<sup>®</sup> in line Premium Juice Extractor (FMC Food Tech Citrus System, Lakeland, USA). The extracted juice is then conveyed to two finishing operations to separate juice sacs from the juice. The fresh industrial squeezed OJ (FOJ) samples were taken at this stage.

The first step of the DP of FOJ is a pre-treatment of centrifugation (Centrifuge, GEA Westfalia Group, Munich, Germany) in order to remove the excess of pulp (that could cause clogging) until 1-3%. Subsequently, the juice is subjected to the DP which consists in passing the juice through a column packed with a neutral resin with highly specific adsorption to selectively remove the bitter juice components.

The debittering of FOJ was undertaken under own conditions set up at the industry (Zumos Pascual S.A.) The Lewatit VPOC 1064 MD PH (Bayer, Germany) polymeric resin was used as adsorbent. This is a macroporous hydrophobic adsorbent resin without functional groups based on a cross linked polystyrene in the form of porous beads of uniform size (0.44–0.54 mm). The specific area and pore volume of the resin were 800 m<sup>2</sup>/g and 1.2 cm<sup>3</sup>/g, respectively. After passing through the resin, the juice is reconstituted by adding pulp to the desired level. The debittered industrial OJ samples (DOJ) were taken at this stage. 27 samples of FOJ and DOJ counterparts were taken at 9 different dates (3 samples/ day) and immediately frozen until they were analysed. All analyses were done in triplicate.

### *Physicochemical characterization of orange juices*

Acidity, pH, total soluble solids were measured according to AOAC methods (AOAC, 1995). The ratio was calculated by dividing the total soluble solids by the acidity. Measures were made in triplicate.

### *Total phenolic compounds*

Total phenolic compound contents were determined by the Folin-Ciocalteu method (Singleton and Rossi, Jr., 1965). Total phenol values are expressed in gallic acid (mg/L), which is a common reference compound. All analyses were made in triplicate.

### *GC analysis of volatile flavour compounds*

Aroma compounds were extracted according to the method described by Jella *et al.*, (1998). Briefly, 4 mL of pentane-diethyl ether mixture (1:1) was added to 20 mL OJ, and mixed for 12 hours. 25 µL of propyl benzene (50 mg/L) was added to the samples prior to extraction as an internal standard. The resulting emulsion was broken by centrifugation (5 min x 5000 g). The upper layer was carefully removed, dried and finally concentrated to a final volume of 1000 µL. The extractions were carried out in triplicate, and each sample was injected into the GC system three times. 1 µL was analyzed by GC system.

Isolated solvent was chromatographically separated on a capillary column DB-Wax (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) from Varian (Walnut Creek, CA, USA) using an Agilent Technology 6890N GC-FID system (Palo Alto, CA, USA). The following conditions were used: injector temperature 250 °C; detector temperature 250 °C; carrier gas flow (He) 1mL/min. The injections were made in split mode (split ratio 1:25) and the oven temperature was maintained at 40°C for 3 min, then increased from 40 to 200 °C at 6 °C/min and eventually held for 6 min. The quantification of all the compounds was carried out by the internal standard method.

The flavour components were identified by comparison of their retention times with those of standard compounds. Linearity of responses was  $r^2 > 0.998$  across a standard concentration of each compound.

### *Digital image analyses: Instrumental colour measurement*

For colour specifications digital images were made in order to obtain the total appearance of juice at depths observed by consumers. The OJs were placed in 75 mL

capacity transparent plastic bottles. The samples were measured in triplicate against a grey surround and white background using image analyses. The DigiEye imaging system (Luo *et al.*, 2001) was used to capture the digital images. The latter system includes a calibrated digital camera 10.2-megapixel Nikon D80 (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) and an objective Nikkor 35-mm f/2D (Nikon Corporation), a colour sensor for display calibration, and an illumination box designed by VeriVide Ltd. (Leicester, UK). In these measurements, the samples were illuminated by a diffuse D65 simulator. For obtaining CIELAB coordinates from RGB colour space, the DigiFood software (Heredia *et al.*, 2006) was used.

From the CIELAB uniform colour space, the psychophysical parameters chroma ( $C^*_{ab}$ ) and hue ( $h_{ab}$ ) are defined as:

$$C^*_{ab} = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}, \quad h_{ab} = \arctan(b^*/a^*)$$

Chroma ( $C^*_{ab}$ ) is used to determine the degree of difference of a hue in comparison with a grey colour with the same lightness, and is considered the quantitative attribute of colourfulness. Hue ( $h_{ab}$ ) is the attribute according to which colours are usually defined as reddish, greenish, etc. and is used to define the difference of a colour with reference to a grey colour with the same lightness. This attribute is related to the differences in reflectance at different wavelengths and is considered the qualitative attribute of colour.

Colour differences, which are very important to evaluate relationships between visual and numerical analyses (Melgosa *et al.*, 1997), are calculated as the Euclidean distance between two points in the 3-D space defined by  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$ :

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

### *Sensory analyses*

Evaluation of the perceived differences due to the DP in terms of colour, aroma and taste were completed by specific difference tests (Paired comparison, ISO 5495:2005). Untrained assessors were recruited from staff and students of University of Seville (n=12) to take part in the study. Panellists were not informed about the characteristics of the samples so they did not know that samples were FOJ and DOJ.

A paired comparison tests (FOJ versus DOJ, for each pair of industrial samples) was performed. Assessors were presented with 2 samples and asked to first look the sample and determine if the samples were different in colour. In the next session, they were

asked to smell the samples and determine if there was any difference between each pair of samples, and finally, the last sessions were to ask them to taste the sample and determine if the samples were different. In all the sessions panellists could choose which sample they preferred and do some comments about the OJs.

Samples (75 ml) were presented in bottles of transparent plastic, labelled with random 3 digit codes, in a randomized order across the panel. Mineral water (Evian, France) and unsalted crackers (Matzo, U.K.) were provided for palate cleansing and all testing were performed in temperature controlled individual test booths. Data were collected using Fizz software (Biosynthesis, France).

#### *Data analysis*

The statistical design consisted of one-way repeated measures analysis of variance (ANOVA). Two factors were considered: the process with two levels (fresh and debittered) and the outcome variables, including the volatile compounds, phenolic content and the physicochemical and the colorimetric variables. The 27 cases (orange juice samples) were used as random factor, for the purpose of establishing differences between process stages (fresh and debittered). Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) were determined using the Turkey multiple comparison procedure. Pattern recognition techniques, such as stepwise Linear Discriminant Analysis (SLDA), were applied on experiment standardized data to distinguish between different types of orange juices. All the statistical analyses were performed with Statistica v.8.0 software (StatSoft, 2007).

Sensory data of pair comparisons tests were analyzed using Friedman test to determine whether the panellists were able to discriminate between samples ( $p < 0.05$ ).

### **Results and discussion**

#### *Physicochemical characterization*

Physicochemical characterization of each of the samples included in the study is shown in Table 1. The DP did not result in significant variations in the physicochemical parameters after the application of repeated measures ANOVA analysis. FOJ showed a pH ranging from 3.7 to 4.1. This result is in agreement with Del Caro *et al.* (2004) who reported a pH in this variety of 3.9. In the case of DOJ, pH ranged from 3.8 to 4.3. Acidity in FOJ and DOJ ranged from 0.6 to 0.8 g of citric acid/100 mL. Other studies reported values a bit higher (0.9 and 1.1 g of citric acid/100 mL) in fresh orange juices

(Del Caro *et al.*, 2004; Gómez-López *et al.*, 2010). Kola *et al.* (2010) neither found a significant decrease of the acidity in samples after debittering, reporting 1.4 g citric acid/100 ml in FOJ and from 1.3 to 1.4 in DOJ.

Total soluble solids ranged from 10.1 to 12.5 °Brix (average 11.7 °Brix) in FOJ, this average value is close to those reported for other OJ (11.9 -12.8 °Brix) (Tribess *et al.*, 2009; Del Caro *et al.*, 2004). In accordance with Kola *et al.* (2010) DOJ total soluble solids was 11.2 °Brix, without a significant decrease in relation to FOJ.

Table 1. Physicochemical characteristics and colour coordinates in FOJ and DOJ (Mean ± SD)

Parameters	FOJ	DOJ
pH	3.9 ± 0.1	4.0 ± 0.2
Acidity <sup>1</sup>	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Total soluble solids <sup>2</sup>	11.7 ± 0.9	11.2 ± 0.5
Ratio <sup>3</sup>	15.8 ± 1.4	15.2 ± 1.2
L*	63.03 ± 1.29	61.08 ± 1.32***
a*	7.08 ± 1.93	8.94 ± 1.72***
b*	59.77 ± 1.49	59.51 ± 1.22
C* <sub>ab</sub>	60.24 ± 1.35	60.22 ± 1.20
h <sub>ab</sub>	83.23 ± 1.94	81.45 ± 1.66***

<sup>1</sup>g of citric acid/100 ml of orange juice; <sup>2</sup>expressed as °Brix; <sup>3</sup>Total soluble solids/acidity  
 Different superscripts within the same row indicate statistically significant differences  
 \*P < 0.05, \*\* P < 0.01 and \*\*\* P < 0.001

### Total phenolic compounds

Based on the absorbance values of extract solutions that reacted with Folin–Ciocalteu reagent, using gallic acid as standard, total phenolic content of juices varied between FOJ and DOJ. The total phenolic content in FOJ was 716 mg gallic acid/L. This result agree with Rapisarda *et al.* (2008) who reported the presence of moderate phenol amounts (524 – 696 mg of gallic acid/L) in five orange genotypes (Tarocco Messina, Tarocco Meli, Moro, Ovale and Valencia) from Italy. Tounsi *et al.* (2011) also studied total phenolic compounds in orange juices, reporting 255 mg of gallic acid/L in blood orange juice.

In contrast, DOJ suffered a significant ( $p < 0.05$ ) decrease in total phenolic compounds due to the DP (24%), so the final concentration in DOJ was 547 mg of gallic acid/L.

### *Digital image analyses: Instrumental colour measurement*

The application of digital image (DigiEye analysis) to evaluate the colour offers a more reliable measurement of the food colour than traditional methods. A better correlation with sensory analysis can be achieved (Fernández-Vázquez *et al.*, 2011). Table 1 shows the colour parameters obtained in fresh and debittered OJ. The values of the coordinate  $L^*$  ranged from 60.02 to 64.30 and from 59.29 to 63.19, in FOJ and DOJ, respectively, showing an increase in average values of 12.36% in DOJ. Hue ranged from 77.94 (the most reddish OJ) to 84.86 (the most yellow) before debittering and from 77.85 to 82.89 after debittering, decreasing 2.13% in DOJ. Ranges for the coordinate  $C^*_{ab}$  were 58.20-62.16 and 58.59-62.50 for OJs and debittered OJs respectively.

Our findings agree with other studies in FOJ of different varieties measured by image analyses which showed values of  $L^*$  ranged from 56.09 to 61.34,  $h_{ab}$  ranged from 66.43 to 81.99, and finally range of chroma was 54.03-60.29 (Fernández-Vázquez *et al.*, 2012).

Coordinate  $h_{ab}$ , the qualitative component of colour, was significantly different ( $p < 0.001$ ) being slightly lower after debittering. This means that debittering makes the samples a bit more reddish. On the other hand,  $L^*$  coordinate was significantly higher before than after debittering, which means that samples were darker after the treatment. Finally, the quantitative component of colour ( $C^*_{ab}$ ), did not show a clear pattern comparing fresh OJs and debittered OJs, and there were not significant differences. Lee and Coates (2003) reported a lightness increase and a chroma decrease after debittering in red grapefruit juice concentrate.

CIELAB colour differences ( $\Delta E^*_{ab}$ ) were calculated between FOJ and DOJ. The average was 2.72, which is close to the threshold for human colour discrimination (Martínez *et al.*, 2001).

The CIELAB colour difference  $\Delta E^*_{ab}$  was split in the three components, called lightness difference ( $\Delta L^*$ ), chroma difference ( $\Delta C^*_{ab}$ ), and hue difference ( $\Delta H^*_{ab}$ ). Figure 1 shows the contribution (as percentage) of each component to the total colour differences detected in comparison of each date (average data of three samples). It can be observed that the main contribution to the whole colour difference was related to the qualitative component of colour ( $\Delta H^*_{ab}$ ) and the lightness ( $\Delta L^*$ ), while chroma difference had a minor contribution to the total difference in most of the cases.

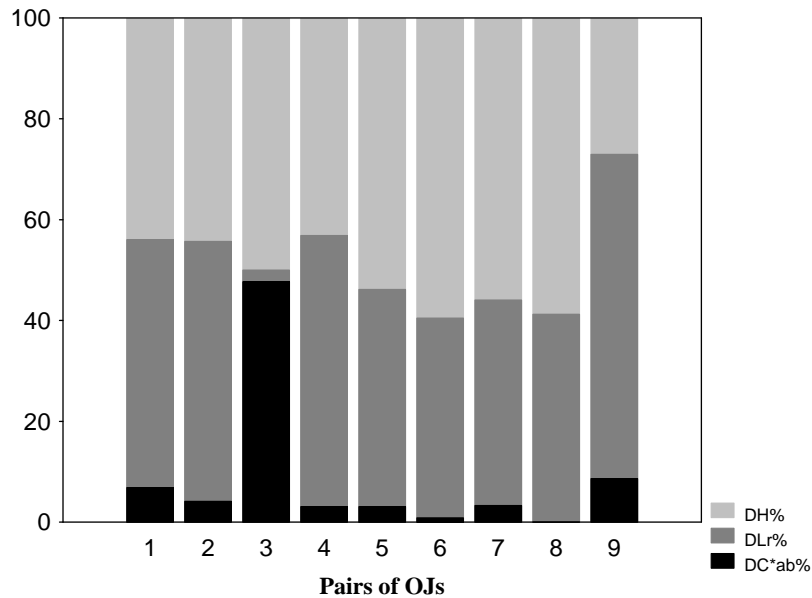


Figure 1. Contribution of  $\Delta C^*_{ab}$ ,  $\Delta L^*$  and  $\Delta h^*_{ab}$  to colour differences between FOJ and DOJ of each date (average data of three samples).

#### *GC analysis of volatile flavour compounds*

Limonene,  $\alpha$ -pinene, ethyl butanoate, octanal, linalool, and citral were chosen because they have been identified as the most contributing compounds to orange flavour, and can be even used in orange juice authentication (Robards and Antolovich, 1995). Moreover, terpineol is a well known off-flavour compound present in citrus products formed from limonene or linalool. This compound exceeds the taste threshold level under practical processing and storage conditions (Naim *et al.*, 1998). Table 2 shows the concentrations for aroma compounds in FOJ and DOJ. All the aroma compounds decreased significantly in DOJ. Percentages of reductions were from 16 % to 61 %. The main compound in both groups was limonene with 1667 and 793 mg/L in FOJ and DOJ, respectively. Limonene has been reported as the major terpene in OJ (Kelebek and Selli, 2011; Jordan *et al.*, 2001; Brat *et al.*, 2003; Rega *et al.*, 2004; Moufida and Marzouk, 2003; Fan *et al.*, 2009) nevertheless limonene is not necessarily the most important or overriding compound when evaluating flavour quality (Jia *et al.*, 1998). The next odour compounds in concentration was the ethyl butyrate (108 mg/L in FOJ) followed by pinene (21 mg/L in FOJ). Recent studies reported concentration of ethyl butyrate of 102 mg/L analyzed in *Citrus sinensis* L.Osbeck (Kelebek and Selli, 2011) and of pinene of < 3 mg/L in a mixture of *Citrus sinensis* Berna, Valencia Late and Salustiana (Jordan *et al.*, 2003). These results are in accordance to those reported by Kranz *et al.* (2011) in

grapefruit juice, who reported that the DP has a strong impact on volatile flavour compounds. Moreover they also reported that the off-flavour compound  $\alpha$ -terpineol had the higher adsorption affinity for the adsorption resin. However our findings point out that octanal is the compound which decreases in a higher proportion, from 13 to 5 mg/L (61 % of decrease).

Table 2. Volatile components in FOJ and DOG (mg/L) (Mean  $\pm$  SD)

Components	FOJ	DOG
Limonene	1667.63 $\pm$ 330.39	792.94 $\pm$ 395.15 <sup>**</sup>
Octanal	13.03 $\pm$ 5.05	5.06 $\pm$ 2.01 <sup>***</sup>
Linalool	21.09 $\pm$ 6.65	17.73 $\pm$ 2.69 <sup>*</sup>
Ethyl Butanoate	107.80 $\pm$ 23.04	85.96 $\pm$ 21.23 <sup>***</sup>
Terpineol	13.88 $\pm$ 4.44	9.76 $\pm$ 3.27 <sup>*</sup>
Citral	12.40 $\pm$ 2.23	8.52 $\pm$ 2.35 <sup>***</sup>
Pinene	20.47 $\pm$ 2.49	13.67 $\pm$ 3.56 <sup>***</sup>

*Different superscripts within the same row indicate statistically significant differences*

*\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$*

#### *SLDA analysis*

Total phenolic compounds, colour parameters, and aroma content were included in a discriminant analysis to enhance the discrimination of the samples using debittering as criterion for comparison. Of these variables, seven were significant ( $p < 0.05$ ) and, in descending order of discriminating power, were total phenolic compounds,  $\alpha$ -pinene, linalool,  $\alpha$ -terpineol, a\*, ethyl butyrate and b\*. Since only two sets were taken into consideration for the model, only one classification function was obtained, which yielded a good separation (100 % correct classification) between the samples (Figure 2). The colorimetric variables a\*, and b\* had positive sign while linalool,  $\alpha$ -pinene, total phenolic compounds,  $\alpha$ -terpineol, and ethyl butyrate had negative sign.



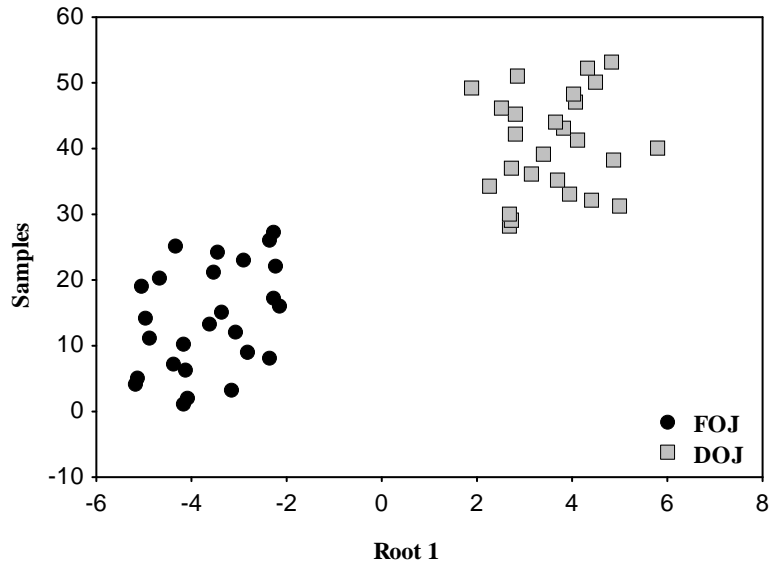


Figure 2. Scatterplot of the orange juice samples in the plane defined by the canonical function when debittering is considered for discrimination.

### *Sensory analyses*

In order to find out sensory differences in colour, aroma, and taste, these attributes were evaluated separately. Results from paired comparison test of the visual evaluation provided sufficient evidence to conclude that a significant difference ( $p < 0.05$ ) existed between the colour of FOJ and DOJ.  $\Delta E^*$  of each pair of samples can explain these results, as it was mentioned before an average difference in colour of 2.72 was calculated. In terms of preference there was not a clear pattern in the panellists. 37% of the responses did not show any preference to none of the sample, 48% preferred the colour after debittering and only 15% preferred the OJs without debittering treatment.

On the other hand, aroma evaluation by panellists showed significant differences ( $p < 0.05$ ) comparing FOJ and DOJ. Moreover, 71% showed a preference for FOJ, pointing out that the DP could have a negative effect in the OJs. This could be due to the aroma reduction in important flavour compounds in DOJ, as reported previously. For example octanal, limonene and  $\alpha$ -pinene, which were the compounds with the major reduction, are also responsible for the positive sensory properties of OJ like citrusy, lemon and mint, and pine, respectively (Rega *et al.*, 2003; Arena *et al.*, 2000; Arena *et al.*, 2006). The off-flavour  $\alpha$ -terpineol also had a significant reduction of 30%, but this effect was not enough to overcome the negative effect of this compound in the flavour.

Results from paired comparison test for taste evaluation provided sufficient evidence to conclude that a significant difference ( $p < 0.05$ ) existed between FOJ and DOJ.

However it was unclear what the panellists' preference was, as 53 % of the answers showed preference for OJs without debittering, 35 % preferred OJs after debittering and 13 % did not show preference to any of the samples compared. This may be related to the fact that after debittering OJs were less bitter, but also too smooth and artificial, as reported by some panellists.

### **Conclusions**

In conclusion, total phenolic compounds and the entire aroma compounds analyzed decreased significantly due to DP. Colour parameters also changed significantly in DOJ, being these orange juices more reddish and darker. Sensory analyses showed that panellists were able to discriminate between FOJ and DOJ in colour, taste and odour. However, they did not show a clear pattern in preference, which means that the DP affect the sensory properties of the orange juice but not always in a negative way.

### **Acknowledgments**

The authors acknowledge the collaboration of Zumos Pascual (Palma del Río, Spain) and especially to Ms Carmona Tirado. This work was supported by funding from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía by the project P08-AGR-03784. RFV holds a grant from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

## References

- AOAC (1995). *Official Methods of Analysis, 16th ed.* (Association of Official Analytical Chemists: Washington, DC. ed.).
- Arena, E., Fallico, B., & Maccarone, E. (2000). Influence of Carotenoids and Pulp on the Color Modification of Blood Orange Juice. *Journal of Food Science*, **65**, 458-460.
- Arena, E., Guarrera, N., Campisi, S., & Nicolosi Asmundo, C. (2006). Comparison of odour active compounds detected by gas-chromatography-olfactometry between hand-squeezed juices from different orange varieties. *Food chemistry*, **98**, 59-63.
- Brat, P., Rega, B., Alter, P., Reynes, M., & Brillouet, J. M. (2003). Distribution of Volatile Compounds in the Pulp, Cloud, and Serum of Freshly Squeezed Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 3442-3447.
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., & Agabbio, M. (2004). Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. *Food chemistry*, **84**, 99-105.
- Ericson, A. P., Matthwes, R. F., Texeira, A. A., & Moye, H. A. (1992). Recovery of Grapefruit Oil Constituents from Processing Waste Water using Styrene-divinylbenzene Resins. *Journal of Food Science*, **57**, 186-189.
- Fan, G., Qiao, Y., Yao, X., Mo, D., Wang, K., & Pan, S. (2009). Free and bound volatile compounds in juice and peel of Jincheng oranges. *European Food Research and Technology*, **229**, 571-578.
- Fayoux, S. C., Hernandez, R. J., & Holland, R. V. (2007). The Debittering of Navel Orange Juice Using Polymeric Films. *Journal of Food Science*, **72**, 143-154.
- Fernández-Vázquez, R., Stinco, C., Melendez-Martinez, A. J., Heredia, F. J., & Vicario I.M (2011). Visual and instrumental evaluation of orange juice color: a consumers' preference study. *Journal of Sensory Studies*, **26**, 436-444.

- Fernández-Vázquez, R., Stinco, C. M., Meléndez-Martínez, A. J., Heredia, F. J., & Vicario, I. M. (2012). Orange Juice Color. Visual Evaluation and Consumer Preference. In: *Color in Food. Technological and Psychophysical Aspects*. (Edited by J. Caivano & M. Buera). Pp. 435-441. New York: CRC Press. Taylor & Francis Group.
- Gómez-López, V. M., Orsolani, L., Martínez-Yépez, A., & Tapia, M. S. (2010). Microbiological and sensory quality of sonicated calcium-added orange juice. *LWT - Food Science and Technology*, **43**, 808-813.
- Haleva-Toledo, E., Naim, M., Zehavi, U., & Rouseff, R. L. (1999). Formation of alpha-terpineol in Citrus Juices, Model and Buffer Solutions. *Journal of Food Science*, **64**, 838-841.
- Heredia, F. J., González-Miret, M. L., Álvarez, C., & Ramírez, A. (2006). DigiFood® (Análisis de imagen). Spanish Patent [No. SE-01298.].
- Jia, M., Zhang, Q. H., & Min, D. B. (1998). Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace Flavor Compounds of Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 2744-2747.
- Johnson, R. L. & Candler, B. V. (1986). Debittering and de-acidification of fruit juices. *Food Technology in Australia*, **38**, 294-297.
- Jordan, M. J., Goodner, K. L., & Laencina, J. (2003). Deaeration and pasteurization effects on the orange juice aromatic fraction. *LWT - Food Science and Technology*, **36**, 391-396.
- Jordan, M. J., Tillman, T. N., Mucci, B., & Laencina, J. (2001). Using HS-SPME to Determine the Effects of Reducing Insoluble Solids on Aromatic Composition of Orange Juice. *LWT - Food Science and Technology*, **34**, 244-250.
- Kelebek, H. & Selli, S. (2011). Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (*Citrus sinensis* L. Osbeck) orange juice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**, 1855-1862.

- Kimball, D. a. & Norman, S. I. (1990). Processing effects during commercial debittering of California navel orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **38**, 1396-1400.
- Kola, O., Kaya, C., Duran, H. +., & Altan, A. (2010). Removal of limonin bitterness by treatment of ion exchange and adsorbent resins. *Food Science and Biotechnology*, **19**, 411-416.
- Konno, A., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., & Yasumatsu, K. (1982). Bitterness reduction of naringin and limonin by B-cyclodextrin. *Agricultural Biology and Chemistry*, **46**, 2203-2208.
- Kranz, P., Adler, P., & Kunz, B. (2011). Sorption of citrus flavour compounds on XAD-7HP resin during the debittering of grapefruit juice. *International Journal of Food Science & Technology*, **46**, 30-36.
- Krings, U., Kelch, M., & Berger, R. G. (1993). Adsorbents for the recovery of aroma compounds in fermentation processes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **58**, 293-299.
- Lee, H. S. & Kim, J. G. (2003). Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate. *Food chemistry*, **82**, 177-180.
- Luo, M. R., Cui, C. G., & Li, C. (2001). Apparatus and method for measuring colour (DigiEye System). British Patent 0124683.4.
- Ma, S. X. & Lada, M. W. (2003). Quality fruit juice beverages having extended quality shelf-life and methods of making the same. United States Patent [6534107], 1-9.
- Maier, V. P. & Beverly, G. D. (1968). Limonin Monolactone, the Nonbitter Precursor Responsible for Delayed Bitterness in Certain Citrus Juices. *Journal of Food Science*, **33**, 488-492.
- Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines. *Food Science and Technology International*, **7**, 439-444.

- Melendez-Martinez, A. J., Vicario I.M, & Heredia, F. J. (2004). El color del zumo de naranja (II): Aspectos físicos. *Alimentación, equipos y tecnología*, **186**, 103-106.
- Melgosa, M., Hita, E., Poza, A. J., Alman, D. H., & Berns, R. S. (1997). Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. *Color Research & Application*, **22**, 148-155.
- Moufida, S. & Marzouk, B. (2003). Biochemical characterization of blood orange, sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*, **62**, 1283-1289.
- Naim, M., Rouseff, R. L., Zehavi, U., Schutz, O., & Halvera-Toledo, E. (1998). Chemical and Sensory Analysis of Off-Flavors in Citrus Products. In: *Flavor Analysis*. Pp. 303-319. American Chemical Society.
- Rapisarda, P., Bianco, M. L., Pannuzzo, P., & Timpanaro, N. (2008). Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. *Postharvest Biology and Technology*, **49**, 348-354.
- Rega, B., Fournier, N., & Guichard, E. (2003). Solid Phase Microextraction (SPME) of Orange Juice Flavor: Odor Representativeness by Direct Gas Chromatography Olfactometry (D-GC-O). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 7092-7099.
- Rega, B., Fournier, N., Nicklaus, S., & Guichard, E. (2004). Role of Pulp in Flavor Release and Sensory Perception in Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 4204-4212.
- Robards, K. & Antolovich, M. (1995). Methods for assessing the authenticity of orange juice. A review. *Analyst*, **120**, 1-28.
- Selli, S., Cabaroglu, T., & Canbas, A. (2003). Flavour components of orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *International Journal of Food Science & Technology*, **38**, 587-593.

- Singleton, V. L. & Rossi, J. A., Jr. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, 144-158.
- StatSoft, I. (2007). STATISTICA, version 8.0 [Computer software].
- Tounsi, M. S., Wannas, W. A., Ouerghemmi, I., Jegham, S., Njima, Y. B., Hamdaoui, G. et al. (2011). Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**, 142-151.
- Tribess, T. B., Rodas, M. A. D. B., Torre, J. C. D. M. D., & Tadini, C. C. (2009). The effect of refrigerated storage on sensory profile and physical-chemical characteristics of minimally pasteurized orange juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, **33**, 264-280.
- Tseng, D. J., Matthews, R. F., Gregory, J. F., Wei, C. I., & Little, R. C. (1993). Sorption of Ethyl Butyrate and Octanal Constituents of Orange Essence by Polymeric Adsorbents. *Journal of Food Science*, **58**, 801-804.

## **Capítulo 6. PUESTA A PUNTO DE TÉCNICAS NOVEDOSAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS COMPUESTOS AROMÁTICOS DEL ZUMO DE NARANJA (ANÁLISIS *IN-VITRO* E *IN-VIVO*) Y ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA PULPA EN LA LIBERACIÓN DE VOLÁTILES**

### **ANTECEDENTES**

El aroma del zumo de naranja (OJ) es uno sus atributos más característicos (Jordán y col., 2001) y consiste en un grupo de compuestos volátiles con una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas y localizados en una amplia gama de estructuras físicas dentro del zumo.

El zumo fresco exprimido manualmente, es un sistema heterogéneo consistente en el suero, que es una fase acuosa, clara, que contiene los compuestos solubles del zumo; y la pulpa, que es una fase insoluble en agua (Brat y col., 2003).

El OJ es una suspensión de partículas (pulpa) en un suero. En ella se distinguen partículas gruesas ( $> 2 \mu\text{m}$ ) que tienden a asentarse durante el almacenamiento, y partículas finas ( $< 2 \mu\text{m}$ ) o pulpa no sedimentable, también denominada “clouds” (Mizrahi y Berk, 1970), que en condiciones favorables permanecen suspendidas en el suero (Baker y Bruemmer, 1969). Ambas partículas, realzan el color, el flavor, el aroma y las sensaciones que produce el OJ en la boca (Brat y col., 2003).

Algunos compuestos aromáticos del OJ se distribuyen de un modo poco uniforme en la matriz del mismo, presentando unos, concentraciones elevadas en la pulpa y otros, en el suero. Por ejemplo, en las frutas cítricas, los monoterpenos y sesquiterpenos son conocidos por estar asociados principalmente a la pulpa (Radford y col., 1974). Brat y col. (2003) estudiaron la distribución de los volátiles en la pulpa, pulpa no sedimentable y suero y mostraron que los monoterpenos y sesquiterpenos se encontraban principalmente en la pulpa y las “clouds”; mientras que esteres y alcoholes



monoterpenos se concentraban principalmente en el suero; y finalmente largas cadenas alifáticas de aldehídos estaban mayoritariamente en la pulpa.

El suero se describe normalmente como un líquido amarillo pálido que generalmente desprende poco aroma por sí mismo pero que actúa como portador y solvente para la emulsión de las partículas menores de 2  $\mu\text{m}$  y la pulpa (Baker y Cameron, 1999). El efecto de los sólidos insolubles en la composición aromática de OJ fue estudiado por Jordán y col. (2001), que mostraron, a través del análisis por SPME, que la disminución de éstos se correspondía con un descenso de las cantidades de muchos compuestos volátiles en el espacio de cabeza. Por ejemplo, concluyeron que el OJ con un 3% de pulpa, tenía una concentración de limoneno de 57 mg/Kg, pero cuando la pulpa aumentaba hasta el 10%, la concentración de limoneno llegaba a 536 mg/Kg.

Para determinar la concentración de los compuestos responsables del flavor en los zumos de fruta, se han desarrollado diferentes métodos analíticos como la SPME (Jordan y col., 2001) y la extracción líquido-líquido con distintas fases orgánicas (Jella y col., 1998). Sin embargo, según nuestro conocimiento, la ionización química a presión atmosférica unida a espectrometría de masas (APCI-MS) no ha sido utilizada hasta ahora para evaluar *in vivo* el efecto de la pulpa en la liberación de los volátiles del zumo de naranja. APCI-MS se utiliza comúnmente para analizar en tiempo real el espacio de cabeza de los alimentos y la fase gaseosa dentro de la cavidad nasal durante el consumo de los mismos (Linforth y Taylor, 2000; Rabe y col., 2004; Tsachaki y col., 2005).

Los compuestos volátiles son percibidos por los consumidores de muchas maneras diferentes. Antes de su consumo, una combinación de parámetros fisicoquímicos como los coeficientes de partición y el coeficiente de transferencia de masa, junto con factores dinámicos (como la mezcla de las fases y el flujo de aire), determinan la distribución relativa de los compuestos volátiles entre el alimento y su espacio de cabeza (Marin y col., 1999). Además, durante el consumo, la disponibilidad de las moléculas aromáticas para su percepción depende de la hidrofobicidad de los compuestos volátiles, su volatilidad, la tensión superficial y varios efectos interfaciales de la matriz.

Aunque la pulpa es una fase ampliamente estudiada, cuya composición y contribución al aroma final del zumo ha sido descrita por diversos autores (Brat y col. 2003), hasta el momento, no está totalmente esclarecido su papel en el perfil de liberación temporal de los compuestos volátiles del zumo de naranja.

## OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la influencia de la pulpa en la liberación de los volátiles del OJ.

Los objetivos concretos planteados fueron:

- Poner a punto técnicas novedosas (APCI-MS *in vitro* e *in vivo*) para el análisis de los compuestos aromáticos del zumo de naranja (análisis *in vitro* e *in vivo*).
- Analizar el contenido de limoneno en la pulpa y suero del OJ.
- Estudiar el efecto de la pulpa en la liberación de limoneno en el espacio de cabeza por APCI-MS en tres situaciones diferentes: condiciones de equilibrio (espacio de cabeza estático), en espacio de cabeza dinámico, y durante el consumo (espacio de cabeza *in vivo*).
- Evaluar las diferencias entre OJs con distinto contenido de pulpa y suero, en cuanto a la percepción del aroma y el flavor a naranja, mediante un panel no entrenado.

## MUESTRAS

Las muestras de OJ (cv. Navelina) se obtuvieron usando un exprimidor doméstico, luego el zumo fue centrifugado (15 min x 2700 g) usando una centrífuga CR3i multifunción (Gormley, Canada) para separar la pulpa del sobrenadante (suero), seguidamente el sobrenadante se filtró con papel y finalmente los OJs fueron reconstituidos con diferentes cantidades de pulpa (0, 5, 10, 15, y 20 g/100 g). Estos porcentajes se eligieron para ser comparables

con estudio previos (Stinco C y col., 2012) y tener en cuenta las posibles aplicaciones comerciales.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### *Concentración de lípidos*

Como los lípidos juegan un importante rol en la asociación de los volátiles con la pulpa, se analizó el contenido de lípidos totales (siguiendo la metodología de Brat y col. (2003)) en la fracción de pulpa húmeda (cuyo contenido en humedad fue de 86.6 g/100 g) mediante extracción con disolventes, obteniendo una concentración de  $1.8 \text{ g} \pm 0.125 \text{ g}/100 \text{ g}$ . Este resultado coincidió con el hallado por Brat y col. (2003).

La implicación de los lípidos en la liberación del aroma desde matrices acuosas es conocida tanto en el espacio de cabeza estático como dinámico (Hatchwell, 1996). Generalmente, los compuestos aromáticos lipofílicos permanecen en la fase lipídica y, por lo tanto, están presentes en menor concentración en el espacio de cabeza. La hidrofobicidad se mide normalmente como un logaritmo del coeficiente de reparto del compuesto entre dos solventes inmiscibles, octanol y agua, y se expresa como logP. Para el limoneno se ha establecido un logP de 4.83 (Guichard,(2002), que indica su carácter hidrofóbico, por lo que puede predecirse que la concentración de limoneno en el espacio de cabeza será fuertemente dependiente de la concentración de lípidos en el producto. El contenido de lípidos se analizó en pulpa y suero. Para las muestras de OJ con contenidos de pulpa de 5, 10, 15 y 20 g/100 g, el contenido de lípidos totales se calculó a partir dichos valores, resultando 0.09, 0.18, 0.27 y 0.37 g/100 g, respectivamente.

### *Concentración de limoneno*

La concentración de limoneno, fue determinada por cromatografía de gases con detección de ionización de llama, realizándose previamente una extracción líquido-líquido (Jella y col., 1998).

Las concentraciones de limoneno en el suero y en la pulpa fueron  $40.7 \pm 2.5 \mu\text{g/g}$  y  $2609 \pm 1033 \mu\text{g/g}$ , respectivamente. Esto indica, que en una muestra de OJ con un contenido en pulpa de 10 g/100 g, el 88% del limoneno correspondería a la fracción de pulpa y el 12% al suero. Radford y col. (1974) mostraron previamente que la eliminación de pulpa del zumo fresco disminuía significativamente la concentración de terpenos y que, un 2% del limoneno procedía del suero, mientras que un 98% era procedente de la pulpa. Otros estudios en OJ (cv. Navelina) hallaron concentraciones de limoneno en pulpa y suero de  $1630 \mu\text{g/g}$  y  $4.6 \mu\text{g/g}$ , respectivamente (Brat y col., 2003) lo que supondría, en un OJ con un contenido en pulpa de 10 g/100 g, una contribución al contenido total de limoneno del 0.3% por parte del suero y 99.7% de la pulpa.

Debido a que la pulpa contiene más limoneno, cabría esperar que la adición de ésta al suero aumentaría la concentración final de limoneno en el producto, consecuentemente la disponibilidad de este compuesto volátil en el espacio de cabeza, y análogamente la percepción sensorial.

#### *Distribución del tamaño de partícula*

La distribución de tamaño de la pulpa se determinó usando un analizador del tamaño de partículas con técnica de difracción láser (LS 13 320, Beckman Coulter, High Wycombe, UK).

La pulpa se encontraba en forma de estructuras bien definidas que formaban agregados más grandes conforme aumentaba la concentración de pulpa. En general, el 90% de las partículas de pulpa tuvieron un tamaño superior a  $50 \mu\text{m}$  y la distribución del tamaño de partícula fue mono-modal. Las partículas del suero, de las cuales el 90% eran menores de  $50 \mu\text{m}$ , presentaban una distribución de tamaño tri-modal, lo que sugiere que pequeñas estructuras y gotitas de aceite emulsionadas están presentes en el suero. Además, las estructuras se ilustraron mediante microscopía óptica con un microscopio Leitz Diaplan (Wild Leitz, Heerbrugg, Switzerland) (Iwanaga y col., 2007).

### *Liberación de aroma desde el suero con varias concentraciones de pulpa*

Para analizar el espacio de cabeza de los OJs se utilizó un espectrofotómetro de masas (Platform LCZ) con una interfase MS Nose, (Micromass, Manchester, U.K.), siguiendo la metodología propuesta por Linforth y Taylor (1999).

### *APCI-MS análisis del espacio de cabeza estático*

Como era de esperar en base a los resultados expuestos anteriormente, la concentración de limoneno en el espacio de cabeza aumentó con el incremento del contenido de pulpa. Así, la concentración de limoneno se duplicó con la adición de 10 g pulpa en 100 g de suero, lo que es especialmente significativo considerando el aumento en la concentración de lípidos que conlleva dicha adición. De la misma forma, Jordán y col. (2001) concluyeron que, en general, todos los terpenos estaban fuertemente asociados a la pulpa, y que, un aumento en la concentración de la misma en el OJ suponía un aumento significativo del limoneno en el espacio de cabeza. Brat y col. (2003) también mostraron este efecto en el OJ.

Como ya se ha comentado previamente, la adición de pulpa aumenta no sólo la concentración de limoneno, sino también la concentración de lípidos en el sistema, por ello el aumento de la concentración de limoneno no fue lineal, observándose una disminución en el incremento, como consecuencia de la adición de lípidos. Así, si consideramos las muestras con un contenido de pulpa de 5 g/100 g y 20 g/100 g el incremento de limoneno debería ser de un 328% si la fracción lipídica no tuviera ningún efecto. Sin embargo, el contenido de lípidos disminuye la disponibilidad de limoneno en el espacio de cabeza obteniéndose un aumento real en la concentración del 236%.

### *APCI-MS análisis del espacio de cabeza dinámico*

El análisis del espacio de cabeza dinámico sobre las distintas muestras se utilizó para demostrar la capacidad de la matriz para contribuir a la persistencia del limoneno en el espacio de cabeza. En todos los casos, con la adición de pulpa se mejoró la capacidad del suero para reponer el limoneno en el espacio

de cabeza, sin embargo, entre muestras con diferentes concentraciones de pulpa (5 - 20 g/100 g) no hubo diferencias significativas.

La capacidad para mejorar la persistencia en un espacio de cabeza dinámico tiene normalmente dos explicaciones posibles. Por un lado la concentración en el espacio de cabeza en el equilibrio puede ser baja, y por lo tanto, la transferencia de masa requerida para alcanzar el equilibrio sería baja también (Linthorpe y Taylor, 2010); o puede haber un depósito de compuestos disponibles para pasar al espacio de cabeza rápidamente. En este caso, se cree que son la combinación de gotas de aceite liberadas de la pulpa y el depósito presente en la misma, los que afectan conjuntamente de una forma positiva a la liberación de limoneno. La emulsión lleva una fracción relativamente pequeña de limoneno, y esto puede permitir una rápida reposición en el espacio de cabeza, al que se libera nuevamente limoneno desde el reservorio de la pulpa. Aunque muchos autores han documentado previamente los diferentes reservorios de compuestos hidrófobos en otros productos, no se han encontrado evidencias de que la cinética de la liberación haya sido explicada por este fenómeno.

#### *APCI in-vivo*

En última instancia, son los consumidores los que beberán el OJ, por lo que las tasas de aroma en las regiones cercanas al punto de percepción, es decir, en la nariz, son las más importantes a tener en cuenta. Por ello, las muestras con diferentes concentraciones de pulpa (suero, 10 g/100 g, y 20 g/100 g) se analizaron por *APCI in vivo* para estudiar la liberación del limoneno en las condiciones reales de consumo.

En todos los panelistas, el aumento en la fracción de pulpa produjo un aumento en la concentración de limoneno en el aire espirado. Éste se calibró frente a una curva generada por cada panelista al consumir una serie de muestras con diferentes concentraciones de limoneno en agua. Cabe destacar que las curvas de calibración no fueron lineales y que no hubo una diferencia significativa entre las muestras con concentraciones de pulpa de 10 g/100 g y 20 g/100 g. Esto sugiere claramente que la adición de 10 g/100 g de pulpa

mejora significativamente la liberación de limoneno a la cavidad nasal pero mayores adiciones de pulpa no dan lugar a un aumento significativo del limoneno.

#### *Comparación entre APCI-MS estático y APCI in-vivo*

Al comparar los resultados de APCI-MS estático e *in vivo* se comprueba que la adición de pulpa produce una liberación de limoneno más eficiente desde el alimento a la cavidad nasal que en una situación de equilibrio estático. Esto se debe, presumiblemente, a la combinación de procesos orales que producen la desestabilización de la emulsión por la acción de las proteínas salivares (Vingerhoeds y col., 2005), de los lípidos que recubren la cavidad bucal, y por la interacción de los lípidos y los compuestos lipofílicos en el alimento con las superficies hidrófobas de la mucosa (Dresselhuis y col., 2008). La combinación de todos estos elementos podría aumentar el área superficial, mejorando significativamente la liberación del limoneno.

#### *Análisis sensorial*

Se evaluaron las diferencias en la percepción del aroma y el flavor a naranja, entre OJs con distinto contenido de pulpa y suero, mediante una prueba específica de comparación por parejas (ISO 5495, 2005). Se realizaron dos pruebas distintas comparando muestras con un contenido de pulpa de 0 g/100 g versus 10 g/100 g, y 0 g/100 g versus 20 g/100 g y los resultados no ofrecieron evidencias suficientes para concluir la existencia de diferencias significativas entre ninguna de las pruebas evaluadas.

La pulpa aumenta significativamente la liberación de limoneno *in vivo* e *in vitro* cuando se analizan instrumentalmente, sin embargo, este aumento no se vio reflejado en un incremento del aroma o el flavor a naranja percibidos por los panelistas. Este resultado puede deberse al hecho de que el limoneno, aunque sea uno de los componentes de impacto presentes en el OJ, no es necesariamente el más importante cuando se evalúa la calidad del flavor del zumo (Jia y col., 1998). Además, Radford y col. (1974), concluyeron que bajas concentraciones de algunos compuestos aromáticos jugaban un papel muy significativo en el flavor del OJ.

La limitación principal de este estudio está en que sólo se analiza un compuesto volátil (limoneno) de la gran cantidad que está presente en el OJ, por lo que futuras investigaciones en este campo usando una serie de compuestos conocidos en un sistema modelo añadirían un valor significativo en esta área.

## CONCLUSIONES

- La adición de pulpa aumenta significativamente la concentración de limoneno en el espacio de cabeza estático así como la persistencia del mismo en el espacio de cabeza dinámico.
- La adición de pulpa aumenta la liberación del limoneno al aire exhalado después del consumo de OJ, pero adiciones mayores a un 10% de pulpa no llevan a un incremento significativo en la liberación del limoneno medida por APCI *in-vivo*.
- A pesar de ello, este incremento no se vio reflejado en un aumento de la percepción del aroma o el flavor a naranja por parte de los panelistas.
- Estas investigaciones demuestran la relevancia a nivel comercial de la adición de pulpa y ponen de manifiesto la necesidad de profundizar en su estudio para evaluar más detalladamente el impacto de la tensión superficial y la matriz en la cinética de la liberación del aroma del OJ.







## Headspace delivery of limonene from the serum and non-serum fractions of orange juice *in-vitro* and *in-vivo*

Rocío Fernández-Vázquez<sup>a,1</sup>, Robert Linforth<sup>b</sup>, Joanne Hort<sup>b</sup>, Louise Hewson<sup>b</sup>, Dolores Hernanz Vila<sup>c</sup>, F.J. Heredia Mira<sup>a,1</sup>, Isabel M. Vicario<sup>a,1</sup>, Ian Fisk<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Food Colour & Quality Laboratory, Department Nutrition & Food Science, Universidad de Sevilla Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain

<sup>b</sup> Division of Food Sciences, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, Leicestershire LE12 5RD, UK

<sup>c</sup> Department Analytical Chemistry, Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 21 June 2012

Received in revised form

9 October 2012

Accepted 23 October 2012

#### Keywords:

Aroma chemistry

In-nose delivery

Orange juice

Limonene

### ABSTRACT

The impact of orange juice pulp on the physical release of limonene to the headspace of freshly prepared orange juice was evaluated both *in-vitro* and *in-vivo*. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry was used to analyse the impact of the matrix on the dynamic release of the volatile aroma compound, limonene, in orange juice. Pulp and aqueous serum was isolated (by centrifugation and filtration) from freshly prepared orange juice and subsequently reconstituted at varying pulp addition levels in serum (0g/100 g–20 g/100 g, wwb). The addition of pulp significantly enhanced the static headspace concentration of limonene with a 210 fold increase with 10 g/100 g pulp addition. In addition, pulp enhanced the ability of the orange juice serum to replenish limonene in the headspace after dynamic headspace dilution. The release of limonene was studied under realistic consumer consumption conditions (In-nose delivery) by atmospheric pressure chemical ionisation-mass spectrometry; pulp significantly enhanced the amount of limonene exhaled in the nasal airflow (retronasal delivery). Surprisingly, given the variations in limonene concentration, naïve consumers did not perceive samples as significantly different on consumption. This is presumably due to the wide range of other aroma compounds not evaluated in this study that contribute to the perceived aroma.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The aroma of orange juice is one of the most characteristic attributes of all citrus juices (Jordan, Tillman, Mucci, & Laencina, 2001) and fresh orange juice aroma is considered a reference against which all juices are judged (Brat, Rega, Alter, Reynes, & Brillouet, 2003). Orange juice aroma consists of a number of volatile aroma compounds with a variety of physicochemical properties, located in a range of physical structures within the orange juice.

Fresh, hand squeezed orange juice is a heterogeneous multi-phase system consisting of serum, a clear aqueous phase containing small oil droplets (cloud), soluble compounds and pulp, a water insoluble phase (Brat et al., 2003). Orange pulp consists of both coarse particles (>2 µm) that tend to settle upon storage and fine particles (<2 µm) (Mizrahi & Berk, 1970), which under favourable conditions remain suspended in the serum (Baker & Bruemmer,

1969). Both the pulp suspension and cloud emulsion enhance the colour, flavour, aroma, and mouthfeel of the orange juice, and are present in many commercial juices (Brat et al., 2003).

Some classes of volatile aroma compounds are distributed unevenly across the matrix with regions of elevated concentration in the pulp or the serum. For example, in citrus fruits monoterpenes and sesquiterpene were shown by Radford, Kawashima, Friedel, Pope, and Gianturco (1974) to be primarily associated with the pulp. Brat et al. (2003) studied the distribution of volatile compounds in the pulp, cloud, and serum and showed that monoterpenes and sesquiterpenes are primarily found in the pulp and cloud; esters and monoterpene alcohols were concentrated in the serum; and long chain aliphatic aldehydes were found to the greatest extent in the pulp. The serum is normally described as a pale yellow liquid that generally has little perceivable juice aroma on its own but acts as the carrier solvent for the distributed cloud emulsion and the macroscopic fragments of pulp (Baker & Cameron, 1999).

The effect of insoluble solids on the composition of aroma of orange juice was studied by Jordan et al. (2001), who showed that a reduction in insoluble solids corresponded to a reduction in the quantities of many volatile components in the headspace. For

\* Corresponding author. Tel.: +44 0 115 9516037; fax: +44 0 115 9516142.

E-mail address: [ian.fisk@nottingham.ac.uk](mailto:ian.fisk@nottingham.ac.uk) (I. Fisk).

<sup>1</sup> [www.color.us.es](http://www.color.us.es).

example, they reported that orange juice (containing serum and 3 g/100 g pulp) contained limonene at a concentration of 57 mg/kg, but when pulp was included at 10 g/100 g, the limonene concentration increased to 536 mg/kg (headspace solid phase micro-extraction gas chromatography mass spectrometry). It still remains unclear as to whether aroma compounds are associated with solid cell structures by adsorption of oil droplets onto the particles, physical entrapment inside the cell wall carbohydrate network (Mizrahi & Berk, 1970), or through chemical interactions between volatile compounds and polysaccharides (Dufour & Bayonove, 1999) or glycopeptides (Langourieux & Crouzet, 1997) in the pulp.

Different analytical methods, such as solid-phase micro-extraction (SPME) (Jordan et al., 2001) and liquid–liquid extraction with different organic phases like pentane–diethyl ether (Jella, Rouseff, Goodner, & Widmer, 1998), have been developed to determine the concentration of flavour components in fruit juices. However, to the best of the authors' knowledge, atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS) has not been used to evaluate the *in-vivo* delivery of volatiles aroma compounds from orange juice as a consequence of pulp fraction. APCI-MS is commonly used for the real time analysis of gas-phases above food samples and in the gas phase within the nasal cavity during consumption (Linthorpe & Taylor, 2000; Rabe, Linthorpe, Krings, Taylor, & Berger, 2004; Tsachaki, Linthorpe, & Taylor, 2005).

Volatile compounds are perceived by consumers in a number of different ways. Prior to consumption, a combination of physico-chemical parameters (such as the partition coefficient (Fisk, Kettle, Hoffmeister, Virdie, & Silanes Kenny, 2012) and the mass transfer coefficient (Fisk, Boyer, & Linthorpe, 2012)), along with dynamic factors (such as mixing of the phases and airflow), determines the relative distribution of the volatile compounds between the food and its headspace (Marin, Baek, & Taylor, 1999). During consumption the availability of aroma molecules for perception is driven by a volatile's hydrophobicity, volatility, the surface tension of the system and various other interfacial matrix effects.

So far, it is not well known if pulp has any influence on the temporal delivery profile of odour compounds in orange juice even though it is a phase which is well characterised as containing and contributing volatile aroma compounds to the final product.

The objective of this study was to measure the limonene content of pulp and serum fractions of orange juice and to study the effect of pulp on the delivery of limonene to the headspace by APCI-MS in three different situations: equilibrium conditions (static headspace), disturbed headspace conditions (dynamic headspace) and during consumption (In-nose headspace).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All chemicals were of analytical grade; chloroform, methanol, n-pentane, and diethyl ether were purchased from Panreac (Barcelona, Spain), and limonene and propyl benzene were purchased from Sigma Aldrich (Poole, United Kingdom). *Citrus sinensis* (L.) Navelina oranges (unwaxed, 50–90 mm diameter, no defects) were purchased locally in a supermarket (Nottingham, United Kingdom). Oranges were stored at 4 °C for no more than 24 h before analysis.

### 2.2. Sample preparation

Orange juice was obtained using a domestic kitchen juicer. Isolated orange juice was then centrifuged (15 min × 2700 × g) using a CR3i multifunction centrifuge (Gormley, Canada) to separate the dense pulp and more buoyant supernatant. The isolated supernatant was filtered with filter paper to separate aqueous

clouds and serum phase and then reconstituted with different amounts of pulp (0, 5, 10, 15, and 20 g/100 g, wet weight basis). Exact percentages were chosen to be comparable to previous studies and to commercial applications (Stinco et al., 2012).

### 2.3. Characterization of pulp and serum

#### 2.3.1. Lipid content

Lipid content was analysed by the methodology, as described by Brat et al. (2003). 2 mL of distilled water and 6 mL of chloroform:methanol mixture (2:1) were added to the isolated pulp (5 g). Samples were mixed by vertical shaking for 30 s in a separating funnel and allowed to phase separate for 30 min. The lower organic phase was recovered while the upper phase was extracted a further three times with 6 mL of chloroform:methanol (2:1). Collected organic phase were pooled and dehydrated over anhydrous sodium sulphate and evaporated to dryness in a vacuum rotary evaporator. All extractions were carried out in triplicate, the extracts weighed and lipid content calculated by gravimetric difference, average results were expressed as g/100 g ww ± standard deviation.

#### 2.3.2. Water content

Water content of samples was analysed as per Fisk, Linthorpe, Taylor, and Gray (2011) by drying within a Vacuum oven (Gallenkamp, Fisons, Loughborough, United Kingdom) for 48 h until constant weight.

#### 2.3.3. Limonene content

Limonene was extracted according to the method described by Jella et al. (1998). Briefly, 4 mL of pentane–diethyl ether mixture (1:1) was added to 20 mL serum and 10 g pulp, and mixed on a roller mixer for 12 h. 25 µL of propyl benzene (50 mg/L) was added to the samples prior to extraction as an internal standard. The resulting emulsion was broken by centrifugation (5 min × 7500 RCF). The upper layer was carefully removed, dried and finally concentrated to a final volume of 500 µL. The extractions were carried out in triplicate, and each sample was injected three times, with an injection volume of 1 µL.

The isolated sample was chromatographically separated on a capillary column DB-Wax (60 m × 0.25 mm × 0.25 µm) from Varian (Walnut Creek, CA, USA) using an Agilent Technology 6890N GC-FID system (Palo Alto, CA, USA). The following conditions were used: injector temperature, 250 °C; detector temperature, 250 °C; carrier gas flow (He), 1 mL/min. The injections were made in split mode (split ratio 1:25) and the oven temperature was maintained at 40 °C for 3 min, then increased from 40 to 200 °C at 6 °C/min and eventually held for 6 min. Quantification of the limonene was carried out by the internal standard method (propyl benzene).

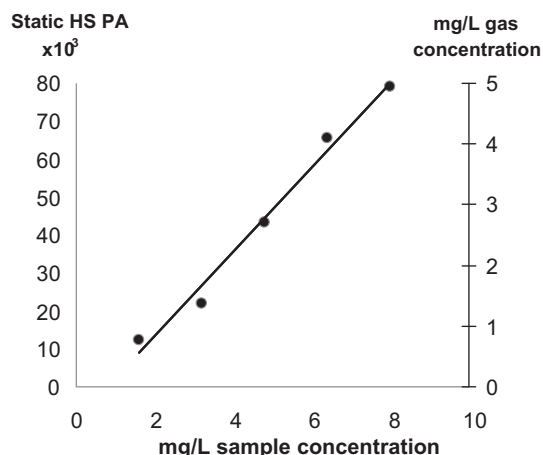
Linearity of responses was acceptable ( $r^2 > 0.998$ ) across a standard concentration range that exceeded that of the samples (10–2500 µg/g).

#### 2.3.4. Particle size

The particle size of the suspended pulp in the orange juice was analysed using a laser diffraction particle size analyser (LS 13 320, Beckman Coulter, High Wycombe, UK), capable of measuring particle diameters in the range 0.4 µm–2000 µm. Samples (1 mL) were introduced into the universal liquid module, and obscuration was maintained at 5% by dilution with deionised water (White, Fisk, Makkhoun, & Gray, 2009).

#### 2.3.5. Microscopy

Orange juices with pulp concentrations (0, 10, 20, and 100 g/100 g) were observed at the optical microscope Leitz Diaplan Microscope, (Wild Leitz, Heerbrugg, Switzerland) (×10) (Iwanaga et al., 2007).



**Fig. 1.** APCI static headspace analysis calibration curve showing aqueous standard concentration (mg/L) against headspace peak area (HS PA) and predicted gas phase concentration (mg/L), predicted gas phase concentration is calculated from the literature air–water partition coefficient of limonene.

Images analysis was performed using Pixelink Software 2004 (Ottawa, Canada).

## 2.4. Headspace delivery of limonene

### 2.4.1. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS)

A Micromass LCZ mass spectrometer was used, fitted with an MS Nose interface (Micromass, Manchester, U.K.) to sample the headspace above the solutions (Linforth & Taylor, 1999). Selected ion monitoring (SIM) analysis was used for all experiments. Cone voltage and ion monitored was 15 V and 137 *m/z*, respectively. MassLynx software (Micromass, Manchester, UK) was used for all data extraction.

**2.4.1.1. Static headspace analysis.** Orange juice (30 mL) samples (OJ) were placed in Duran graduated laboratory bottles (nominal size = 100 mL, real volume = 123 mL) (Sigma–Aldrich, Poole, U.K.) fitted with a one port lid that allowed headspace sampling. Samples were equilibrated at room temperature and the headspace was sampled through the port into the APCI-MS via a heated transfer line (120 °C), with a gas flow rate of 2.5 mL/min. Each sample was measured in triplicate following a fully randomised design.

Resultant detector responses (mV) were converted to Aqueous Standard Equivalents (ASE) by comparing the headspace to that of

limonene control samples as analysed by static headspace (APCI-MS). Solutions with different concentration of limonene were measured and coefficient of determination was calculated ( $r^2 = 0.985$ ). The air–water partition coefficient of limonene has previously been documented by Falk, Gullstrand, Löf and Wigaeus-Hjelm (1990) as 0.556 therefore simple calculations of limonene gas concentration can be completed and gas calibration curves can be constructed (mg/L in gas phase) (Fig. 1).

**2.4.1.2. Dynamic headspace analysis.** Sample headspace was measured by APCI-MS during 5 min of dynamic headspace dilution. 100 mL OJ samples were placed in Duran graduated laboratory bottles (nominal size = 100 mL, real volume = 123 mL) (Sigma–Aldrich, Poole, U.K.) fitted with a two port lid. After equilibration, N<sub>2</sub> was introduced through one port (70 mL/min) to dilute the headspace. Steady flow was achieved prior to analysis. As the gas flowed out of the second port, the exit gas flow was sampled by the APCI-MS (10 mL/min) over a 5 min period (Tsachaki et al., 2005). Each sample was measured in triplicate following a fully randomised design. The profiles were normalized (100%) to the signal intensity at the start of the time course (Fisk et al., 2011).

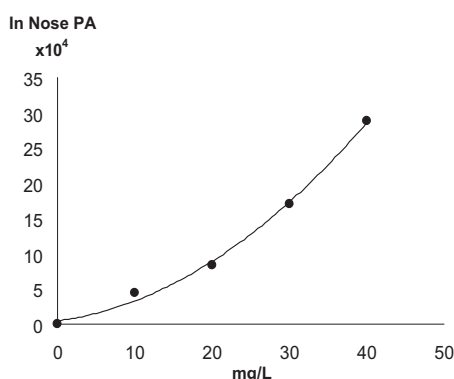
**2.4.1.3. APCI In-nose.** Each sample was consumed in triplicate by two panellists using a randomised block design. Each panellist was placed into a separate block to account for individual differences in aroma release caused by differences in physiology and flow rates between panellists. Panellists consumed 10 mL of each sample directly from the sample vial. A small plastic tube, leading to the MS, was immediately inserted into the left nostril. Once in place, the sample was swallowed and the panellist was instructed to breathe normally through the nose, keeping the mouth closed for the duration of the sampling period. Breath was sampled from the panellist (30 mL/min) over a 1 min period after swallowing (dwell time 0.02 s).

All in nose data is calculated relative to the In-nose headspace calibration curve formed through the consumption of a range of limonene calibration samples. Fig. 2 illustrates the response by panellists ( $r = 0.996$ ). Where absolute detector responses (mV), as measured during the consumption of the samples, were converted to Aqueous Standard Equivalents (ASE) by comparing to the absolute detector responses (mV), as measured during the consumption of aqueous standards containing known amounts of limonene.

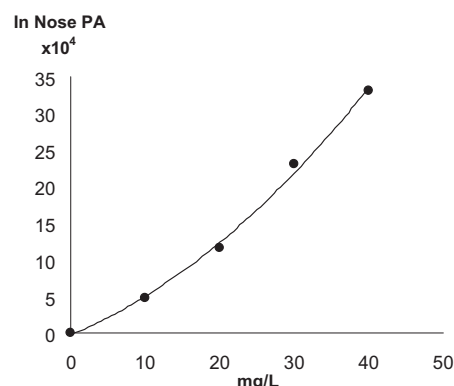
## 2.5. Paired comparison analysis

Evaluation of the perceived differences in limonene as defined by orange aroma and consumption flavour by the panellists was

### Panellist 1



### Panellist 2



**Fig. 2.** APCI In-nose analysis calibration curve showing aqueous standard concentration (mg/L) against maximal peak area (PA) for two panellists.

completed by attribute specific difference tests (Paired comparison, ISO 5495, 2005). 30 untrained assessors were recruited from staff and students of University of Nottingham to take part in the study.

Two paired comparison tests were performed; 0 g/100 g versus 10 g/100 g pulp and 0 g/100 g versus 20 g/100 g pulp. For each test, assessors were presented with 2 samples and asked to first smell the sample and determine which one had the strongest orange aroma. Then, they were asked to taste the samples and determine which sample had the strongest orange flavour.

Samples (15 mL) were presented in dark amber glass bottles, labelled with random 3 digit codes, in a randomised order across the panel and under red light conditions to ensure no visual cues were available to panellists. Mineral water (Evian, France) and unsalted crackers (Matzo, U.K.) were provided for palate cleansing and all testing was performed in temperature controlled, individual test booths. Data was collected using Fizz software (Biosystemes, France)

## 2.6. Data analyses

Analysis of variance, followed, where appropriate by Tukey's post hoc testing, was used to evaluate significant differences within

the APCI-MS datasets (Statistica 8 for Windows, StatSoft 2007). Paired comparison tests were analysed as two-tailed tests using Fizz software (Biosystemes, Couternon, France).

## 2.7. Experimental approach

To further understand the whole study, a flow chart summarizing the complete process is shown in Fig. 3

## 3. Results and discussion

Our findings show that the delivery of the lipophilic cyclic terpene aroma compound, limonene, is significantly impacted by the pulp and lipid fraction of orange juice, both *in-vivo* and *in-vitro*.

### 3.1. Pulp and serum characterization

#### 3.1.1. Lipid concentration

As lipids play a major role in the association of volatiles by pulp, the lipid content of isolated pulp fractions was measured. Total lipids were extracted from wet pulp (pulp water content was

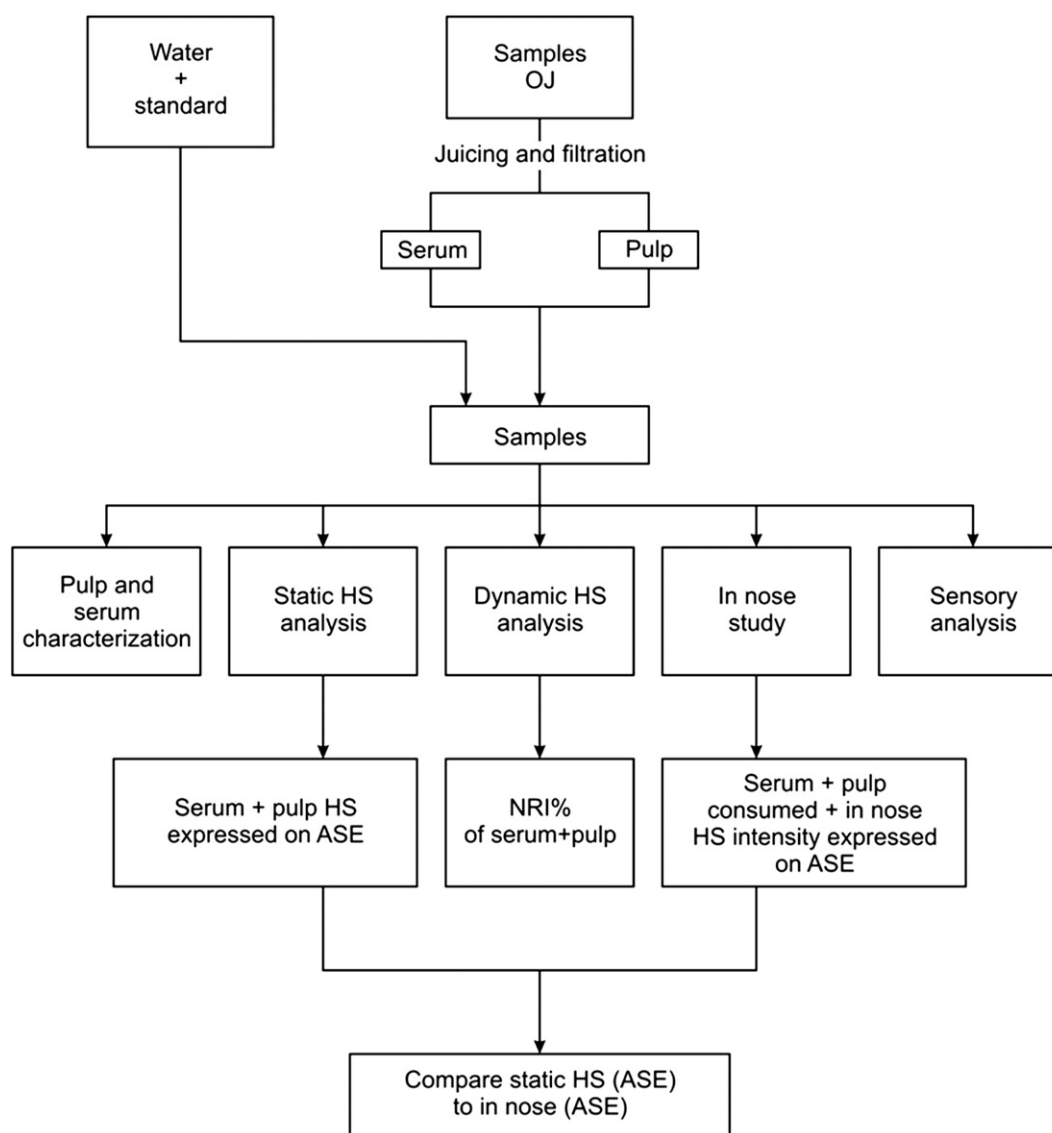


Fig. 3. Schematic flow chart of the experimental process, illustrating the formation of standards and samples, and the analysis series applied to the samples once prepared. (Orange juice, OJ; Headspace, HS; Aqueous standard equivalent, ASE).

86.6 g/100 g) by direct solvent extraction and the total lipid content was 1.8 g/100 g  $\pm$  0.125 g/100 g. This is in agreement with Brat et al. (2003), who also reported 1.8 g/100 g lipid content in wet pulp. The implication of lipid on aroma release from aqueous emulsions and colloidal food matrices is widely known both in equilibrium and in disturbed headspace conditions (Hatchwell, 1996). Generally, lipophilic aroma compounds partition into the lipid phase and are therefore present in a lower concentration in the headspace. Hydrophobicity is normally measured as the logarithm of the equilibrium partitioning ratio between two immiscible solvents, octanol and water, and expressed as logP. Guichard states that limonene has a logP of 4.83 (Guichard, 2002), which is hydrophobic, and therefore it can be predicted that the headspace concentration of limonene will be strongly dependent on the concentration of lipid in the product. The lipid and limonene content of the samples containing pulp at 5, 10, 15 and 20 g/100 g were calculated from measured fractions of serum and pulp samples at 0.09, 0.18, 0.27, 0.37 g/100 g and 169, 298, 426, 554  $\mu$ g/g respectively. Limonene concentrations were at all levels higher than the population odour threshold in an orange juice matrix of 13.7  $\mu$ g/g (Plotto, Margaria, Goodner, Goodrich, & Baldwin, 2004).

### 3.1.2. Limonene concentration

The isolated serum contained 40.7  $\pm$  2.5  $\mu$ g/g limonene and the pulp contained 2609  $\pm$  1033  $\mu$ g/g (Fig. 1), this means that in a standard 10 g/100 g pulp orange juice 88% of the limonene will originate from the pulp fraction and 12% will originate from the serum phase. Radford et al. (1974) previously showed that the elimination of pulp from fresh orange juice resulted in a significant reduction in terpene concentration and that 2% of limonene was present in the serum and 98% is present in the pulp fraction. Other studies in fresh hand-squeezed orange juice (cv. Naveline) reported concentrations of limonene in pulp and serum of 1630  $\mu$ g/g and 4.6  $\mu$ g/g, respectively (Brat et al., 2003) which at a 10 g/100 g add back level would correlate to 0.3% contribution from the serum and 99.7% contribution from the pulp fraction. It is therefore believed that the serum fraction may contain small particulate fractions of cell structures re-suspended from the pulp that contain some limonene, and this therefore has been taken into account in discussions hereinafter.

As the major contributor of limonene, it could be suggested that pulp add back would increase the concentration of limonene in the product and therefore potentially impact the headspace availability of limonene.

### 3.1.3. Particle size distribution

Pulp consists of particulate cellular structures that are dislodged during the juicing process. They are rich in carbohydrates and lipids and form a colloidal dispersion, the size distribution of the colloidal pulp is shown in Fig. 4. Pulp was in the form of clearly defined cell structures which formed larger aggregates as the concentration of pulp increased, in general 90% of the pulp particles were larger than 50  $\mu$ m and the particle size distribution was mono-modal. Serum contained particles of which 90% were smaller than 50  $\mu$ m and had a tri-modal particle size distribution; this suggests small cell structures and droplets of emulsified oil are present in the serum phase. The structures are further illustrated by microscopy in Fig. 5.

## 3.2. Aroma delivery from serum with varying pulp concentrations

### 3.2.1. APCI-MS static headspace analysis

The headspace concentration of limonene increased with increased pulp concentration; this is illustrated in Fig. 6. The limonene headspace concentration doubled with the addition of 10 g/100 g pulp to the serum fraction, this is especially significant

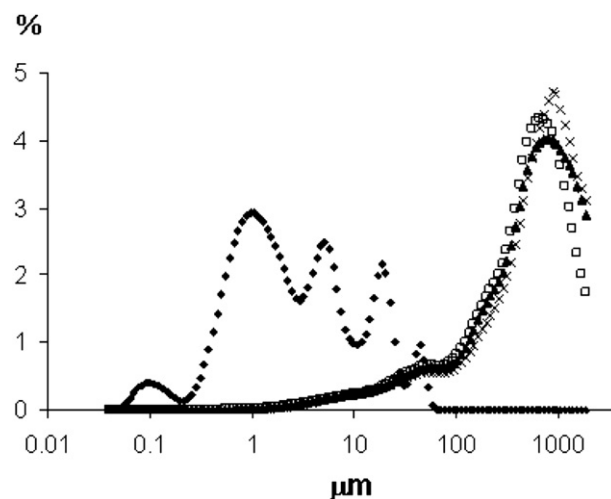


Fig. 4. Particle size distribution of orange juice samples containing 0 g/100 g, 10 g/100 g, 20 g/100 g, and 100 g/100 g pulp (data is represented as a filled diamond, empty square, filled triangle, open cross respectively), particle size is shown on a % volume basis.

considering the additional lipid added to the system from the pulp fraction.

Jordan et al. (2001) concluded that an increase of pulp concentration in orange juice resulted in a significant increase in headspace limonene, and that in general all terpenic compounds were closely associated with the pulp. Brat et al. (2003) has also produced comparable data showing the enhancement of headspace limonene with additional pulp add back.

As has been proposed, the add back of pulp not only increases the concentration of limonene, but also increases the concentration of lipid in the system. Fig. 6 shows that headspace limonene increases with additional pulp, but if non-linear regression is applied, suppression as a consequence of the additional lipid can be seen. When considering the two samples, 5 g/100 g, and 20 g/100 g pulp, the increase in limonene which would lead to an equivalent increase in headspace limonene, if the lipid fraction did not change, would be 328%. In reality the lipid content suppressed the increase in headspace availability and the true change in headspace concentration was 236%.

### 3.2.2. APCI dynamic headspace analysis

Dynamic dilution of the headspace above the orange juice was used to demonstrate the ability of the matrix to replenish the headspace (headspace persistence). In all cases the addition of pulp enhanced the ability of serum to replenish the headspace. This is illustrated in Fig. 7 and is represented as percentage normalised headspace intensity (% NRI). However it should be noted that among serum samples containing different percentages of pulp (5 g/100 g, 10 g/100 g, 15 g/100 g and 20 g/100 g) there were no significant differences at any time points.

The enhanced ability to replenish a diluting headspace is normally attributed to one of two things, either the equilibrium headspace concentration is low, therefore the mass transfer required to achieve equilibrium is low (Linforth & Taylor, 2010), or there is a reservoir of compounds that are available to partition to the headspace rapidly. In this case it is believed that it is a combination of free oil droplets released from the pulp and the reservoir present in the pulp that together enhances delivery. As the emulsion carries only a relatively small fraction of the limonene, it may allow a rapid replenishment of the headspace and itself be subsequently replenished by the pulp reservoir. Although many authors previously have documented the different reservoirs of hydrophobic compounds in other product, no evidence can be



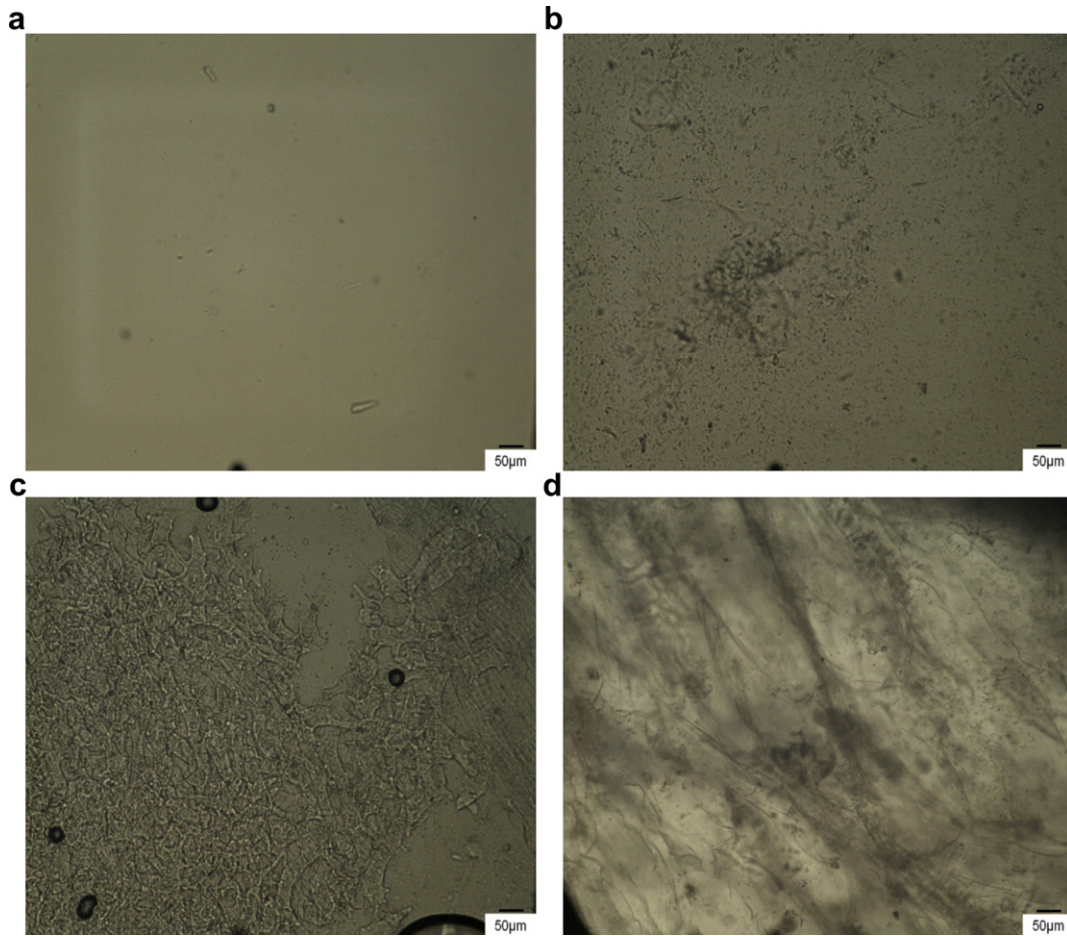


Fig. 5. Optical microscope images of serum containing 0 g/100 g (a), 10 g/100 g (b), 20 g/100 g (c), and 100 g/100 g (d) pulp (magnification  $\times 10$ ), images are characteristic of the samples and are chosen from multiple datasets ( $n = 20$ ).

found that the rate release kinetics have been explained by such a phenomenon.

### 3.2.3. APCI In-nose

Ultimately consumers will drink orange juice, therefore the delivery rates of aroma to regions close to the point of perception,

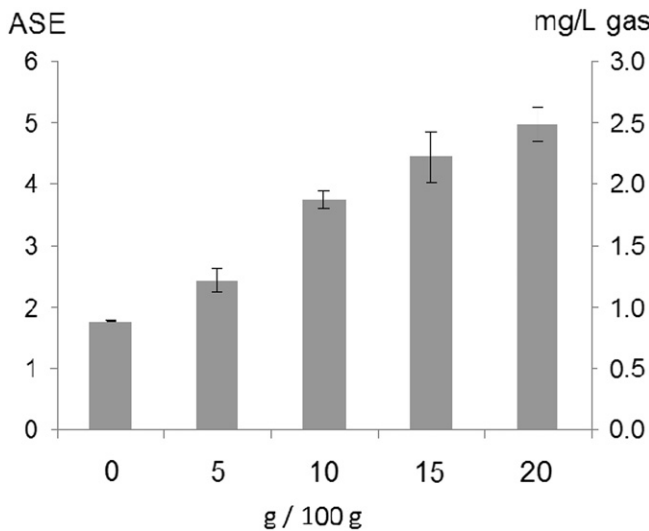


Fig. 6. APCI static headspace analysis. Limonene concentration for each sample in aqueous standard equivalents (ASE) and gas phase concentration (mg/L).

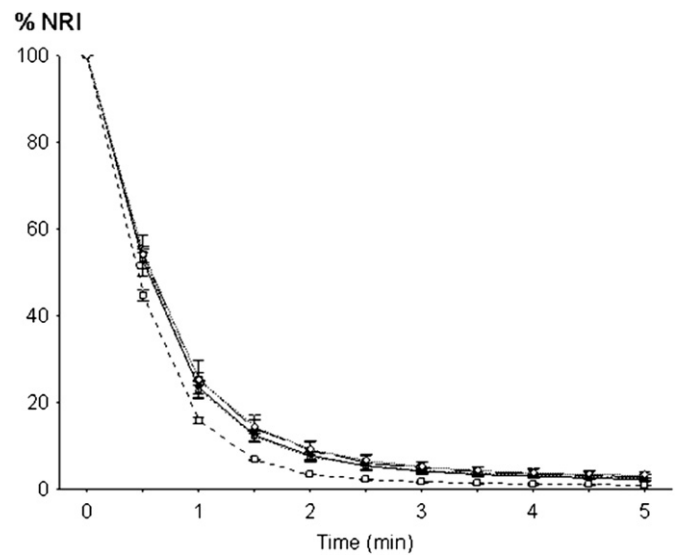


Fig. 7. Average dynamic headspace profiles (Normalized relative intensity, NRI) of limonene in OJs (0 g/100 g, 5 g/100 g, 10 g/100 g, 15 g/100 g, and 20 g/100 g pulp). Data is represented as an open square, filled circle, open triangle, filled square and open diamond respectively, and each point is the mean of three replicates with error bars showing standard deviation.

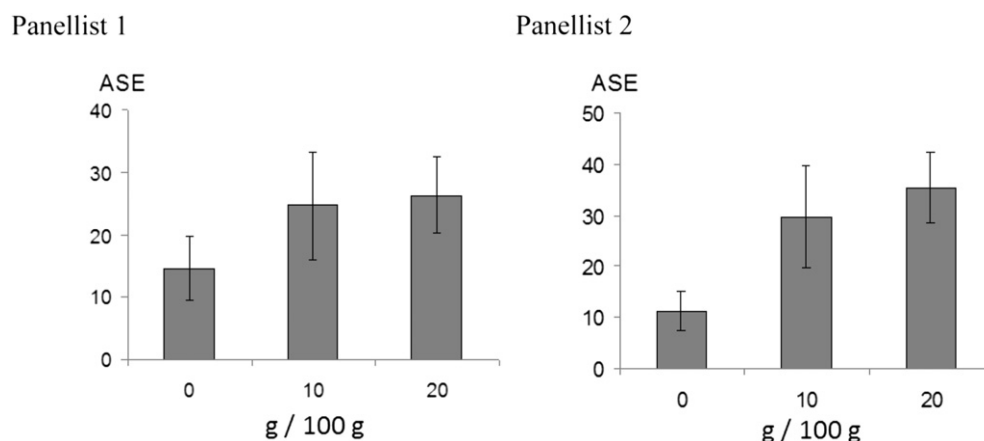


Fig. 8. Delivery of limonene to exhaled breath by APCI-In nose analysis and represented as ASE. Data is illustrated for two separate panellists ( $n = 3$ ).

i.e. in the nose, are the most important to consider. Samples with different pulp concentrations (serum, 10 g/100 g, and 20 g/100 g) were therefore analysed by APCI In-nose to study the release of limonene under realistic consumer consumption conditions.

In all panellists, an increase in the pulp fraction resulted in an increase in the limonene concentration (Fig. 8) in the exhaled air; exhaled air was calibrated against a standard curve generated by each panellist consuming a series of standards of limonene in water. Interestingly the calibration curve was not linear (Fig. 2) and there was no significant difference between the 10 g/100 g and 20 g/100 g samples.

This clearly suggests that addition of 10 g/100 g pulp significantly enhances the delivery of limonene to the nasal cavity. Further additions did not result in significantly enhanced delivery of limonene to the nasal cavity.

### 3.2.4. Comparison of APCI static headspace analysis and APCI In-nose

In order to compare results from the APCI-MS static headspace analysis and that of the APCI-MS In-nose analysis, the ASE for both datasets are represented in Fig. 9. The addition of pulp facilitates a more efficient delivery of limonene from the food to the nasal cavity than when in a static state. This is presumably due to the

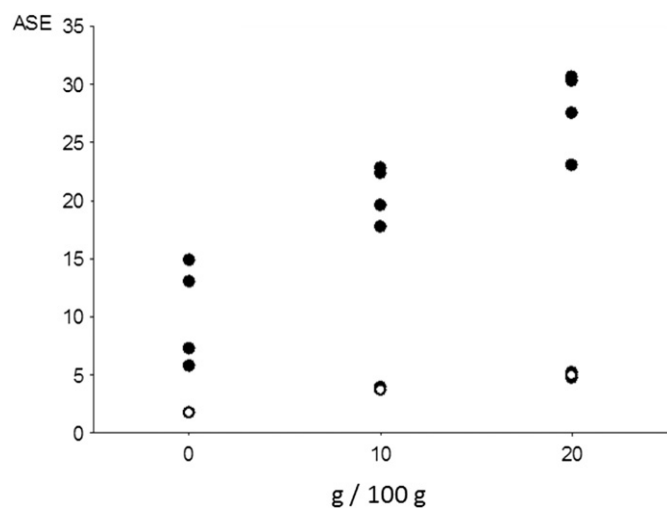


Fig. 9. Concentration of limonene (ASE) analysed by APCI static (empty circle) versus APCI In nose (filled circle) of varying pulp concentrations (0 g/100 g, 10 g/100 g, 20 g/100 g).

combination of oral processing, destabilisation of the colloidal emulsion by salivary proteins (Vingerhoeds, Blijdenstein, Zoet, & van Aken, 2005), lipid coating of the buccal cavity and interaction of the lipophilic compounds and lipids within the food with the hydrophobic surfaces of the mucosal cavity (Dresselhuys, de Hoog, Cohen Stuart, & van Aken, 2008) which combined would increase surface area, enhance mass transfer kinetics and In-nose delivery significantly.

### 3.3. Sensory evaluation

Results from paired comparison testing did not provide sufficient evidence to conclude a significant difference existed between either the serum sample and the sample containing 10 g/100 g pulp ( $P > 0.05$ ), or between the serum samples and the sample containing 20 g/100 g pulp when orange aroma and flavour ( $P = 0.05$ ) was evaluated. Pulp clearly increased the delivery of limonene both in an *in-vivo* and an *in-vitro* situation when analysed instrumentally, but this increase was not reflected by an increase in orange aroma or orange flavour on consumption when assessed by panellists. This may be due to the fact that limonene is one of many key aroma compounds present within an orange juice but is not necessarily the most important or overriding compound when evaluating flavour quality (Jia, Zhang, & Min, 1998). Moreover Radford et al. (1974) found that low concentrations of aroma compounds in the serum played a significant role in the flavour of orange juice, this may further explain why panellists did not identify significant differences between the samples when asked to differentiate by paired comparison analysis.

The main limitation of this study is that it addressed only one aroma compound of the larger number which are present within the real food system, orange juice. Future research in this area using a series of known aroma compounds in a model system would significantly add value in this area.

## 4. Conclusion

In conclusion, we systematically evaluated the impact of pulp addition on the delivery of orange juice limonene to the headspace during headspace equilibrium, during disturbed headspace conditions and further investigated the impact on delivery of limonene in the exhaled breath (In-nose) by APCI-MS. Pulp addition significantly increased the equilibrium headspace concentration and increased the persistence of limonene to headspace disturbance, which is proposed to be due to the addition of the lipid fraction of the pulp. Addition of pulp enhanced limonene delivery to the nasal



exhaled air, but further additions of pulp to serum above 10 g/100 g pulp did not result in further increases in APCI In-nose delivery. This finding addresses the commercial impact of pulp addition and identifies the need for further research in this area to detail the impact of other aroma compounds, surface tension, cloud emulsions and other matrix effects on the release kinetics of aroma from orange juice.

### Acknowledgements

This work was supported by funding from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía by the project P08-AGR-03784. RFV holds a grant from the Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

### References

- Baker, R. A., & Bruemmer, J. H. (1969). Cloud stability in the absence of various orange juice soluble components. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 82, 215–220.
- Baker, R. A., & Cameron, R. G. (1999). Clouds of citrus juices and juice drinks. *Food Technology*, 53, 64–69.
- Brat, P., Rega, B., Alter, P., Reynes, M., & Brillouet, J. M. (2003). Distribution of volatile compounds in the pulp, cloud, and serum of freshly squeezed orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3442–3447.
- Dresselhuis, D. M., de Hoog, E. H. A., Cohen Stuart, M. A., & van Aken, G. A. (2008). Application of oral tissue in tribological measurements in an emulsion perception context. *Food Hydrocolloids*, 22, 323–335.
- Dufour, C., & Bayonove, C. L. (1999). Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 671–677.
- Falk, A., Gullstrand, E., Löf, A., & Wigaeus-Hjelm, E. (1990). Liquid/air partition coefficients of four terpenes. *British Journal of Industrial Medicine*, 47, 62–64.
- Fisk, I. D., Boyer, M., & Linforth, R. (2012). Impact of protein, lipid and carbohydrate on the headspace delivery of volatile compounds from hydrating powders. *European Food Research and Technology*, 235, 517–525.
- Fisk, I. D., Kettle, A., Hoffmeister, S., Virdie, A., & Silanes Kenny, J. (2012). Discrimination of roast and ground coffee aroma. *Flavour*, 14.
- Fisk, I., Linforth, R., Taylor, A., & Gray, D. (2011). Aroma encapsulation and aroma delivery by oil body suspensions derived from sunflower seeds (*Helianthus annuus*). *European Food Research and Technology*, 232, 905–910.
- Guichard, E. (2002). Interactions between flavor compounds and food ingredients and their influence on flavor perception. *Food Reviews International*, 18, 49–70.
- Hatchwell, L. C. (1996). *Flavor–food interactions* (633 ed.). American Chemical Society.
- ISO 5495. (2005). *Sensory analysis. Methodology. Paired comparison test*. International Organization for Standardization.
- Iwanaga, D., Gray, D. A., Fisk, I. D., Decker, E. A., Weiss, J., & McClements, D. J. (2007). Extraction and characterization of oil bodies from soy beans: a natural source of pre-emulsified soybean oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 8711–8716.
- Jella, P., Rouseff, R., Goodner, K., & Widmer, W. (1998). Determination of key flavor components in methylene chloride extracts from processed grapefruit juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 242–247.
- Jia, M., Zhang, Q. H., & Min, D. B. (1998). Optimization of solid-phase microextraction analysis for headspace flavor compounds of orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2744–2747.
- Jordan, M. J., Tillman, T. N., Mucci, B., & Laencina, J. (2001). Using HS-SPME to determine the effects of reducing insoluble solids on aromatic composition of orange juice. *LWT - Food Science and Technology*, 34, 244–250.
- Langourieux, S., & Crouzet, J. C. (1997). Study of interactions between aroma compounds and glycopeptides by a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1873–1877.
- Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (1999). Apparatus and methods for the analysis of trace constituents of gases. 5,869,334. US. 1999.
- Linforth, R., & Taylor, A. J. (2000). Persistence of volatile compounds in the breath after their consumption in aqueous solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5419–5423.
- Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2010). Expression of multidisciplinary flavour science. Flavour delivery from the oral cavity to the nose. In I. Blank, M. Wust, & C. Yeretzyan (Eds.), *Expression of multidisciplinary flavour science* (pp. 101–104).
- Marin, M., Baek, I., & Taylor, A. J. (1999). Volatile release from aqueous solutions under dynamic headspace dilution conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4750–4755.
- Mizrahi, S., & Berk, Z. (1970). Physico-chemical characteristics of orange juice cloud. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21, 250–253.
- Plotto, A., Margaria, C. A., Goodner, K. L., Goodrich, R., & Baldwin, E. A. (2004). Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: terpenes and aldehydes. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 491–498.
- Rabe, S., Linforth, R. S. T., Krings, U., Taylor, A. J., & Berger, R. G. (2004). Volatile release from liquids: a comparison of *in-vivo* APCI-MS, *in-mouth* headspace trapping and *in vitro* mouth model data. *Chemical Senses*, 29, 163–173.
- Radford, T., Kawashima, K., Friedel, P. K., Pope, L. E., & Gianturco, M. A. (1974). Distribution of volatile compounds between the pulp and serum of some fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 1066–1070.
- Stinco, C., Fernández-Vázquez, R., Escudero-Gilete, M. L., Heredia, F. J., Melendez-Martinez, A. J., & Vicario, I. M. (2012). Effect of orange juice's processing on the color, particle size, and bioaccessibility of carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 1447–1455.
- Tsachaki, M., Linforth, R. S. T., & Taylor, A. J. (2005). Dynamic headspace analysis of the release of volatile organic compounds from ethanolic systems by direct APCI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8328–8333.
- Vingerhoeds, M. H., Blijdenstein, T. B. J., Zoet, F. D., & van Aken, G. A. (2005). Emulsion flocculation induced by saliva and mucin. *Food Hydrocolloids*, 19, 915–922.
- White, D. A., Fisk, I. D., Makkhun, S., & Gray, D. A. (2009). *In vitro* assessment of the bioaccessibility of tocopherol and fatty acids from sunflower seed oil bodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5720–5726.

## *Conclusiones generales*





## CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones más importantes que se deducen de los resultados obtenidos son las siguientes:

PRIMERA. En la medida del color del zumo por análisis de imagen influyen factores como el fondo, el entorno y el espesor. Un entorno gris ( $L^* = 50$ ) y fondo blanco se proponen como las condiciones más adecuadas para la realización de las medidas colorimétricas por esta técnica. El espesor de la muestra también debe ser tenido en cuenta y fijado para conseguir una medida fiable y reproducible del color de los zumos a partir del análisis de imagen. Un espesor de 29 mm ha resultado óptimo para la realización de estas medidas.

SEGUNDA. Tanto la espectrorradiometría como el análisis de imagen permiten caracterizar el color del zumo de naranja de una manera rápida y eficaz. En las correlaciones entre estas dos técnicas se obtienen elevados coeficientes significativos ( $p < 0.05$ ) para todos los parámetros colorimétricos.

TERCERA. En la relación entre la evaluación visual y el análisis instrumental se establece que: la medida visual del tono tiene una mejor correlación con la medida espectrorradiométrica, mientras que la claridad la tiene con su correspondiente en el análisis de imagen. No hay buena correlación entre la medida instrumental y visual para el croma.

CUARTA. En el test de consumidores, se observa una preferencia mayoritaria de color en el zumo de naranja hacia tonalidades anaranjadas ( $h_{ab} = 73.30-75.55$ ). Sin embargo, el análisis cluster indica que hay grupos de población que prefieren tonos más rojizos ( $h_{ab} = 66.43-67.06$ ) y otros más amarillentos ( $h_{ab} = 79.14-81.99$ ).

QUINTA. Se propone el término intensidad de color como un atributo sensorial adecuado para evaluar conjuntamente la percepción de la claridad y el croma en el zumo de naranja. En todos los casos se obtuvieron

correlaciones significativas ( $p < 0.05$ ) con los parámetros medidos instrumentalmente.

**SEXTA.** Se proponen los umbrales de discriminación del color específicos para el zumo de naranja, estableciendo valores de 1.5 unidades CIELAB para un observador entrenado y 2.8 unidades CIELAB para un observador no entrenado.

**SÉPTIMA.** Pequeñas variaciones en el color de los zumos afectan a la percepción del sabor de los mismos. Así, variaciones hacia tonos más verdosos ( $h_{ab} = 97.28$ ) aumentan la percepción de la acidez. La percepción del dulzor y el flavor no se ven afectadas por las variaciones de color (hacia tonos rojizos o verdosos). La evaluación hedónica esperada (antes de probar el zumo) y real (después de probarlo) de los consumidores también se ve afectada por ligeras variaciones del color en los zumos de naranja ( $h_{ab} = 84.70 - 97.28$ ).

**OCTAVA.** El proceso industrial de desamargado afecta a los parámetros colorimétricos, la concentración de compuestos volátiles, y el contenido de fenoles del zumo de naranja. Estas modificaciones en el color, aroma y sabor son percibidas en la evaluación sensorial del zumo por jueces no entrenados. Los panelistas muestran preferencia por el aroma de los zumos frescos, antes del proceso de desamargado, sin embargo respecto al gusto y al color, no existen preferencias significativas por los zumos, antes o después de este proceso.

**NOVENA.** La adición de pulpa aumenta significativamente la concentración de limoneno en el espacio de cabeza estático, así como la persistencia del mismo en el espacio de cabeza dinámico. Además, la pulpa aumenta la liberación del limoneno al aire exhalado después del consumo del zumo de naranja, pero adiciones mayores de un 10% no llevan a un incremento significativo en la liberación del limoneno medida *in-vivo*. La percepción sensorial del aroma y el flavor a naranja, por parte de los jueces, no se modifica como consecuencia de la adición de pulpa.

## GENERAL CONCLUSIONS

The following main conclusions are drawn from the studies carried out.

FIRST. In orange juice colour measurement by digital image analysis factors like the background, the surrounding and the thickness have an influence. Grey surrounding ( $L^* = 50$ ) and white background are suggested as the most recommended conditions for colorimetric measurements by image analysis. Thickness of the sample must be also taken into account and set to achieve a reliable and reproducible measurement of orange juices colour by digital image analysis. A thickness of 29 mm has been optimal to these measurements.

SECOND. Both methods, spectroradiometry and digital image analysis, allow a quick and effective orange juice colour characterization. Significant ( $p < 0.05$ ) high correlations between both techniques were found for all the colorimetric parameters.

THIRD. In relation to the visual and instrumental evaluation it is set up that: visual hue evaluation correlates better with spectroradiometry measurements, while lightness does it to its corresponding in image analysis. Measurements of visual and instrumental evaluation of chroma do not correlate.

FOURTH. In the consumer test, it is observed majority preference for orangish hues ( $h_{ab} = 73.30-75.55$ ) in orange juice colour. However, cluster analysis shows that there are groups of population who prefer more reddish hues ( $h_{ab} = 66.43-67.06$ ) while others more yellowish ( $h_{ab} = 79.14-81.99$ ).

FIFTH. Intensity is proposed as a new and suitable sensory attribute to jointly evaluate chroma and lightness parameters in orange juice. In all the cases, significant correlations ( $p < 0.05$ ) with instrumental colour parameters were found.

SIXTH. Specific colour-difference threshold for orange juice are proposed, setting values of 1.5 CIELAB units for a trained observer and 2.8 CIELAB units for an untrained observer.

SEVENTH. Small variations in orange juice colour affect taste perception. Thus, variation towards more greenish hues ( $h_{ab} = 97.28$ ) was found to increase the sourness perception. However, sweetness and flavour perceptions were not affected by colour variation (towards more greenish or reddish hues). Finally, expected liking (before tasting the orange juice) and actual liking (after tasting it) are affected by slight variations in orange juice colour ( $h_{ab} = 84.70 - 97.28$ ).

EIGHTH. The debittering process affects colour parameters, total phenolic compounds, and volatile compounds in orange juice. All these changes in colour, aroma and taste can be perceived by untrained judges. Panellists show a preference for orange juice aroma before debittering process but, in the case of taste and colour, no significant preference for orange juice before or after debittering was found.

NINTH. Pulp addition increases significantly the equilibrium headspace concentration and the persistence of limonene to headspace disturbance. Moreover, addition of pulp enhanced limonene delivery to the nasal exhaled air, but further additions of pulp to serum above 10% pulp did not result in further increases of limonene *in vivo* delivery. Sensory perception of aroma and orange flavour by judges is not modified by pulp addition.

## *Referencias*







**REFERENCIAS**

- Ackerman, D. (2011). *A Natural History of the Senses*. Knopf Doubleday Publishing Group.
- Ahmed, E.M.; Dennison, R.A.; Dougherty, R.H.; Shaw, P.E. (1978a). Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26(1)**; **187-191**.
- Ahmed, E.M.; Dennison, R.A.; Shaw, P.E. (1978b). Effect of selected oil and essence volatile components on flavor quality of pumpout orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **26(2)**; **368-372**.
- Alberola, J.; Izquierdo, L.J. (1978). The volatile fraction of orange juice. Method for extraction and study of composition. In *Flavor of foods and beverages; en Chemistry and Technology* (Goerge Charalambous; Gerorge E.Inglett, ed.). Academic Press New York.
- Antonelli, A.; Cocchi, M.; Fava, P.; Foca, G.; Franchini, G.C.; Manzini, D.; Ulrici, A. (2004). Automated evaluation of food colour by means of multivariate image analysis coupled to a wavelet-based classification algorithm. *Analytica Chimica Acta* **515(1)**; **3-13**.
- Anzaldúa Morales, A. (1994). *La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y en la práctica*. Acribia.
- Arena, E.; Fallico, B.; Maccarone, E. (2000). Influence of Carotenoids and Pulps on the Color Modification of Blood Orange Juice. *Journal of Food Science*. **65(3)**; **458-460**.
- Asociación Española de Normalización (1994). *UNE 87-001-94: análisis sensoria: vocabulario*. AENOR.
- Attridge, G.G.; Pointer, M.R. (2000). Some aspects of the visual scaling of large colour differences-II. *Color Research & Application*. **25(2)**; **116-122**.
- Averbeck, M.; Schieberle, P. (2011). Influence of different storage conditions on changes in the key aroma compounds of orange juice reconstituted from concentrate. *European Food Research and Technology* **232(1)**; **129-142**.
- Averbeck, M.; Schieberle, P. (2009). Characterisation of the key aroma compounds in a freshly reconstituted orange juice from concentrate. . *European Food Research and Technology* **229(4)**; **611-622**.
- Ávila, I.M.L.B.; Silva, C.L.M. (1999). Modelling kinetics of thermal degradation of colour in peach puree. *Journal of Food Engineering* **39(2)**; **161-166**.
- Aznar, M.; Tsachaki, M.; Linfoth, R.S.T.; Ferreira, V.; Taylor, A.J. (2004). Headspace analysis of volatile organic compounds from ethanolic systems by direct APCI-MS. *International Journal of Mass Spectrometry* **239(1)**; **17-25**.

- Baek, I.; Linforth, R.S.T.; Blake, A.; Taylor, A.J. (1999). Sensory Perception is Related to the Rate of Change of Volatile Concentration In-nose during Eating of Model Gels. *Chemical Senses* **24(2)**; 155-160.
- Banfield, G.F.; Harries, J.M. (1975). A technique for comparing judges' performance in sensory tests. *International Journal of Food Science & Technology* **10(1)**; 1-10.
- Baxter, I.A.; Easton, K.; Schneebeli, K.; Whitfield, F.B. (2005). High pressure processing of Australian navel orange juices: Sensory analysis and volatile flavor profiling. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **6(4)**; 372-387.
- Bayarri, S.; Calvo, C.; Costell, E.; Durán, L. (2001). Influence of Color on Perception of Sweetness and Fruit Flavor of Fruit Drinks. *Food Science and Technology International* **7(5)**; 399-404.
- Bazemore, R.; Goodner, K.; Rouseff, R. (1999). Volatiles from Unpasteurized and Excessively Heated Orange Juice Analyzed with Solid Phase Microextraction and GC-Olfactometry. *Journal of Food Science*. **64(5)**; 800-803.
- Berlardi, R.P.; Pawliszyn, J.B. (1989). The application of chemically modified silica fibres in extraction of organics from matrix water samples, and their rapid transfer to capillary column. *Water Pollution Research Journal of Canada*. **24**; 179-181.
- Berns, R.S.; Alman, D.H.; Reniff, L.; Snyder, G.D.; Balonon-Rosen, M.R. (1991). Visual determination of suprathreshold color-difference tolerances using probit analysis. *Color Research of Application*. **16(5)**; 297-316.
- Bettini, M.; Shaw, P.; Lancas, P. (1998). Sensory and analytical evaluations of brazilian orange juices and aromas. *Fruit processing* **8(7)**; 283-287.
- Bianchi, M.; Fletcher, D.L. (2002). Effects of broiler breast meat thickness and background on color measurements. *Poultry Science* **81(11)**; 1766-1769.
- Britton G (1992). *Carotenoids*; en *Natural Food Colorants* (Anon.)Blackie, Glasgow, 141-182.
- Calvo, C. (1989). Atlas de color. Fundamentos y aplicaciones. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos* **29**; 15-29.
- Calvo, C.; Salvador, A.; Fiszman, S. (2001). Influence of colour intensity on the perception of colour and sweetness in various fruit-flavoured yoghurts. *Eur. Food Research and Technoogy*. **213(2)**; 99-103.
- Canadean (2011). Informe para la European Fruit Juice Association (AIJN).
- Cardello, H.M.A.B.; Cardello, L. (2013). Teor de vitamina C, actividade de ascorbato oxidase e perfil sensorial de manga (Mangífera índica l.) Var. Haden, durante o amadurecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **20(1)**; 32-36.
- Casas, A.; Mallent, D. (1988). El color de los frutos cítricos. I. Generalidades. II. Factores que influyen en el color. Influencia de la especie, de la variedad y de la temperatura. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* **28**; 184-202.

- Cerdán-Calero, M.; Izquierdo, L.; Sentandreu, E. (2013). Valencia Late orange juice preserved by pulp reduction and high pressure homogenization: Sensory quality and gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatiles. *LWT - Food Science and Technology* **51(2)**; 476-483.
- CIE (1932). *CIE Proceedings 1931*. Cambridge University Press, Cambridge.
- CIE (1986). *Colorimetry, 2nd edn. Publication CIE No. 15.2*. CIE Central Bureau, Vienna.
- CIE (1995). Industrial color-difference evaluation. *Commission Internationale de L'Eclariage, Technical Report Publication 116-1995*; I-V.
- CIE (2001). Improvement to industrial colour-difference evaluation. *Commission Internationale de L'Eclariage, Technical Report Publication 142-2001*.
- Civille, G.V.; Szczesniak, A.S. (1973). Guideline to training a texture profile panel. *Journal of Texture Studies* **4(2)**; 204-223.
- Consejo de la Unión Europea (2002). Directiva relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2001/112/CE (2002)*.
- Costell, E. (2002). A comparison of sensory methods in quality control. *Food Quality and Preference* **13(6)**; 341-353.
- Cruz, A.G.; Cadena, R.S.; Walter, E.H.M.; Mortazavian, A.M.; Granato, D.; Faria, J.A.F.; Bolini, H.M.A. (2010). Sensory Analysis: Relevance for Prebiotic, Probiotic, and Synbiotic Product Development. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **9(4)**; 358-373.
- Damasio, M.H.; Costell, E. (1991). Analisis sensorial descriptivo: Generacion de descriptores y seleccion de catadores. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos* **31(2)**; 165-178.
- 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 and Food and Agriculture*. **82(8)**; 790-796.
- de Penna, E.W. (1982). *Evaluación sensorial: una metodología actual para tecnología de alimentos*. Facultad de Ciencias Básicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.
- Directiva 2001/112/CE (2001). Consejo, de 20 de diciembre de 2001, relativa a los zumos de frutas y otros productos similares destinados a la alimentación humana.
- Eagerman, B.A. (1978). Orange juice color measurement using general purpose tristimulus colorimeters. *Journal of Food Science*. **43**; 428-430.
- Endrizzi, I.; Pirretti, G.; Caló, D.G.; Gasperi, F. (2009). A consumer study of fresh juices containing berry fruits. *Journal of the Science and Food and Agriculture*. **89(7)**; 1227-1235.

- Espinosa, J.M. (2007). *Evaluación sensorial de los alimentos*.
- Fernández, K.; Aspe, E.; Roeckel, M. (2009). Shelf-life extension on fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. *Food Control* **20(11)**; 1036-1042.
- Fisk, I.; Boyer, M.; Linforth, R. (2012). Impact of protein, lipid and carbohydrate on the headspace delivery of volatile compounds from hydrating powders. *European Food Research and Technology* **235(3)**; 517-525.
- Francis, F.J.; Clydesdale, F.M. (1975). *Food colorimetry: theory and applications*. AVI Publ. Co.: Westport.
- Frata, M.; Valim, M.F.; Monteiro, M. (2006). Preference mapping of commercial orange juices. *Fruit processing* **2**; 116-121.
- Friel, E.N.; Wang, M.; Taylor, A.J.; MacRae, E.A. (2007). In Vitro and in Vivo Release of Aroma Compounds from Yellow-Fleshed Kiwifruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(16)**; 6664-6673.
- Gambaro, A.D.R.I.; Giménez, A.; Burgueño, J. (2001). Sensory and instrumental evaluation of strawberry yogurt color. *Journal of Sensory Studies* **16(1)**; 11-22.
- Gatti, A. (2003). Sensory analysis and consumer science: the point approach [orange juice]. *Ingredienti Alimentari* **2(8)**; 26-29.
- Gay, J.; Hirschler, R. (2002). Determination of industrial color tolerance limits: case studies in the textile industry.; **646-649**.
- Gierczynski, I.; Labouré, H.; Sémon, E.; Guichard, E. (2007). Impact of Hardness of Model Fresh Cheese on Aroma Release: In Vivo and in Vitro Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(8)**; 3066-3073.
- Grosch, W. (1994). Determination of Potent Odourants in Foods by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) and Calculation of Odour Activity Values (OAVs). *Flavour Fragr. J.* **9(4)**; 147-158.
- Grosch, W. (2001). Evaluation of the Key Odorants of Foods by Dilution Experiments, Aroma Models and Omission. *Chemical Senses* **26(5)**; 533-545.
- Guàrdia, M.D.; Aguiar, A.P.S.; Claret, A.; Arnau, J.; Guerrero, L. (2010). Sensory characterization of dry-cured ham using free-choice profiling. *Food Quality and Preference* **21(1)**; 148-155.
- Guinard, J.; Souchard, A.; Picot, M.; Rogeaux, M.S.J.M. (1998). Determinants of the Thirst-quenching Character of Beer. *Appetite* **31(1)**; 101-115.
- Harrison, S.; Elder, L.W. (1950). Some applications of statistics to laboratory taste testing. *Food Technology*. **4**; 434-439.
- Henriques, A.S.; King, S.C.; Meiselman, H.L. (2009). Consumer segmentation based on food neophobia and its application to product development. *Food Quality and Preference* **20(2)**; 83-91.

- Hougaard, A.B.; Vestergaard, J.S.; Varming, C.A.M.I.; Bredie, W.L.P.; Ipsen, R.H. (2011). Composition of volatile compounds in bovine milk heat treated by instant infusion pasteurisation and their correlation to sensory analysis. *International Journal of Dairy Technology* **64(1)**; 34-44.
- Huggart, R.L.; Wenzel, F.W. (1954). Measurement and control of color of orange concentrate. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*. **67(210)**; 216.
- Huggart, R.L.; Wenzel, F.W. (1955). Color differences of citrus juices and concentrates using the Hunter color difference meter. *Food Technology*. **9**; 27-29.
- Hutchings, J.B. (2011). *Food Colour and Appearance*. Ashpen Publisher, Inc., Blackie, Glasgow.
- Ibáñez Moya, F.C.; Barcina Angulo, Y. (2001). *Análisis Sensorial de Alimentos: Métodos y Aplicaciones*. Springer-Verlag Ibérica.
- ISO 5492:1992 Standard 5492: terms relating to sensory analysis. International Organization for Standardization
- ISO 8587:2006. Sensory analysis. Methodology. Ranking test. International Organization for Standardization.
- Jella, P.; Rouseff, R.; Goodner, K.; Widmer, W. (1998). Determination of Key Flavor Components in Methylene Chloride Extracts from Processed Grapefruit Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46(1)**; 242-247.
- Jia, M.; Zhang, Q.H.; Min, D.B. (1998). Optimization of Solid-Phase Microextraction Analysis for Headspace Flavor Compounds of Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **46(7)**; 2744-2747.
- Johnson, J.; Clydesdale, F.M. (1982). Perceived Sweetness and Redness in Colored Sucrose Solutions. *Journal of Food Science*. **47(3)**; 747-752.
- Jordan, M.J. (1999). Constituyentes aromáticos del zumo de naranja. Efecto del procesado industrial.
- Jordan, M.J.; Tillman, T.N.; Mucci, B.; Laencina, J. (2001). Using HS-SPME to Determine the Effects of Reducing Insoluble Solids on Aromatic Composition of Orange Juice. *LWT - Food Science and Technology* **34(4)**; 244-250.
- Jordan, M.J.; Goodner, K.L.; Laencina, J. (2003). Deaeration and pasteurization effects on the orange juice aromatic fraction. *LWT - Food Science and Technology* **36(4)**; 391-396.
- Kealey, K.S.; Kinsella, J.E.; Nagy, S. (1979). Orange juice quality with an emphasis on flavor components. *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **11(1)**; 1-40.
- Kelebek, H.; Selli, S. (2011). Determination of volatile, phenolic, organic acid and sugar components in a Turkish cv. Dortyol (Citrus sinensis L. Osbeck) orange juice. *Journal of the Science and Food and Agriculture* **91(10)**; 1855-1862.

- Kemp, S.; Hollowood, T.; Hort, J. (2009). *Sensory Evaluation: A Practical Handbook*. Wiley.
- Kirca, A.; Cemeroglu, B. (2003). Degradation kinetics of anthocyanins in blood orange juice and concentrate. *Food Chemistry* **81(4)**; 583-587.
- Klim, M.; Nagy, S. (1992). Analysis of orange juice volatiles: comparison of extraction with freon 113 and ethyl acetate. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* **105**; 110-112.
- Koch, C.; Koch, E. (2003). Preconceptions of taste based on color. *Journal of Psychology: Interdisciplinary Applied* **137**; 233-242.
- Larmond, E. (1985). *Laboratory Methods for Sensory Evaluation of Food*.
- Lavin, J.G.; Lawless, H.T. (1998). Effects of color and odor on judgments of sweetness among children and adults. *Food Quality and Preference* **9(4)**; 283-289.
- Lee, H.B.; Yang, H.J.; Min, S.C. (2010). Absorption of d-Limonene in Orange Juice into a Laminated Food Package Studied with a Solid Phase Micro-extraction Method. *Food Engineering Progress* **14(4)**; 354-358.
- Lee, H.S. (2001). Characterization of Carotenoids in Juice of Red Navel Orange (Cara Cara). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49(5)**; 2563-2568.
- Lee, H.S. (2002). Characterization of Major Anthocyanins and the Color of Red-Fleshed Budd Blood Orange (*Citrus sinensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50(5)**; 1243-1246.
- Lee, H.S.; Coates, G.A. (2003). Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* **36(1)**; 153-156.
- Leizeron, S.; Shimoni, E. (2005). Effect of Ultrahigh-Temperature Continuous Ohmic Heating Treatment on Fresh Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(9)**; 3519-3524.
- Lin, J.C.C.; Nagy, S.; Klim, M. (1993). Application of pattern recognition techniques to sensory and gas chromatographic flavor profiles of natural orange aroma. *Food Chemistry* **47(3)**; 235-245.
- Linforth, R.S.T.; Baek, I.; Taylor, A.J. (1999). Simultaneous instrumental and sensory analysis of volatile release from gelatine and pectin/gelatine gels. *Food Chemistry* **65(1)**; 77-83.
- Linforth, R.S.T.; Taylor, A.J. (1999). Apparatus and methods for the analysis of trace constituents of gases. **5,869,334**; -.
- Liu, H.X.; Chen, Y.D.; un Long Hao; hen, N.N.; Jiao Ao (2011). The Evaluation of Lightness and Chroma Difference for Images According to Color Difference Formulae. *Applied Mechanics and Materials* **3036**; 130-134.

- Lizotte, P.A.; Shaw, P.E. (1992). Flavor volatiles in Valencia orange and their quantitative changes caused by vacuum infiltration of butanal. *Food Science and Technology* **25(1)**; 80-82.
- Lotong, V.; Chambers, D.H.; Dus C.; Chambers, E.; Civille, G.V. (2002). Matching results of two independent highly trained panels using different descriptive analysis methods. *Journal of Sensory Studies* **17(5)**; 429-444.
- Lotong, V.; Chambers, E.; Chambers, D.H. (2003). Categorization of Commercial Orange Juices Based on Flavor Characteristics. *Journal of Food Science* **68(2)**; 722-725.
- Lozano, P.R.; Miracle, E.R.; Krause, A.J.; Drake, M.; Cadwallader, K.R. (2007). Effect of Cold Storage and Packaging Material on the Major Aroma Components of Sweet Cream Butter. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(19)**; 7840-7846.
- Luckow, T.; Delahunty, C. (2004). Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. *Food Research International* **37(8)**; 805-814.
- Luckow, T.; Sheehan, V.; Fitzgerald, G.; Delahunty, C. (2006). Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. *Appetite* **47(3)**; 315-323.
- Luning, P.A.; de Rijk, T.; Wichers, H.J.; Roozen, J.P. (1994). Gas Chromatography, Mass Spectrometry, and Sniffing Port Analyses of Volatile Compounds of Fresh Bell Peppers (*Capsicum annum*) at Different Ripening Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **42(4)**; 977-983.
- Luo, M.R.; Cui, C.G.; Li, C. (2001a). Entitled apparatus and method for measuring colour (DigiEye System). *British Patent*.
- Luo, M.R.; Cui, G.; Rigg, B. (2001b). The development of the CIE 2000 colour-difference formula: CIEDE2000. *Color Research & Application* **26(5)**; 340-350.
- Luo, M.R. (2002). Development of colour-difference formulae. *Review of Progress in Coloration and Related Topics* **32(1)**; 28-39.
- Maarse, H. (1991). *Volatile Compounds in Foods and Beverages*. Marcel Dekker.
- Mabesa, L.B.; Lim, M.R. (1991). Evaluation of factors affecting consumers' acceptance of orange juice drink. *Philippine Agriculturist* **74(1)**; 95-102.
- MacDougall, D.B. (2002). *Color in Food: Improving Quality*. Woodhead Pub Limited.
- MacFie, H.J.H.; Thomson, D.M.H. (1994). *Measurement of Food Preferences*. Springer.
- Majou, D.; Association de Coordination Technique pour Industrie Agro-Alimentaire (2001). *Sensory evaluation: guide of good practice*. Association de coordination technique pour l'industrie agro-alimentaire (ACTIA).



- Marin, A.B.; Acree, T.E.; Hotchkiss, J.H.; Nagy, S. (1992). Gas chromatography-olfactometry of orange juice to assess the effects of plastic polymers on aroma character. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40(4)**; 650-654.
- Marsili, R. (1997). *Techniques for Analyzing Food Aroma*. Marcel Dekker.
- Martínez, J.A.; Melgosa, M.; Pérez, M.M.; Hita, E.; Negueruela, A.I. (2001). Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines. *Food Science and Technology International* **7(5)**; 439-444.
- Meilgaard, M.; Civille, G.V.; Carr, B.T. (2007). *Sensory Evaluation Techniques*. Taylor & Francis.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2003). A Routine High-Performance Liquid Chromatography Method for Carotenoid Determination In Ultrafrozen Orange Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51(15)**; 4219-4224.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2005). Instrumental measurement of orange juice colour: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **85(6)**; 894-901.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Britton, G.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2005a). Color and carotenoid profile of Spanish Valencia late ultrafrozen orange juices. *Food Research International* **38(8-9)**; 931-936.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2005b). Correlation between visual and instrumental colour measurements of orange juice dilutions: effect of the background. *Food Quality and Preference* **16(5)**; 471-478.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2005c). Instrumental measurement of orange juice colour: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **85(6)**; 894-901.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Britton, G.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2005d). Identification of Isolutein (Lutein Epoxide) as cis-Antheraxanthin in Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(24)**; 9369-9373.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Britton, G.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2005e). Identification of Zeinoxanthin in Orange Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(16)**; 6362-6367.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2007). Rapid Assessment of Vitamin A Activity through Objective Color Measurements for the Quality Control of Orange Juices with Diverse Carotenoid Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(8)**; 2808-2815.
- Meléndez-Martínez, A.J.; Britton, G.; Vicario, I.M.; Heredia, F.J. (2008). Does the carotenoid neoxanthin occur in orange juice? *Food Chemistry* **107(1)**; 49-54.
- Melgosa, M.; Hita, E.; Poza, A.J.; Alman, D.H.; Berns, R.S. (1997). Suprathreshold color-difference ellipsoids for surface colors. *Color Research & Application* **22(3)**; 148-155.

- Melgosa, M.; Gómez-Robledo, L.; Huertas, R.; Capitán-Vallvey, L.F.; Moyano, M.J.; Heredia, F.J. (2009). Color Measurements in Blue-Tinted Cups for Virgin-Olive-Oil Tasting. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **86(7)**; 627-636.
- Mizutani, N.; Okamoto, M.; Yamaguchi, Y.; Kusakabe, Y.; Dan, I.; Yamanaka, T. (2010). Package images modulate flavor perception for orange juice. *Food Quality and Preference* **21(7)**; 867-872.
- Moshonas, M.G.; Shaw, P.E. (1989). Changes in composition of volatile components in aseptically packaged orange juice during storage. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **37(1)**; 157-161.
- Moshonas, M.G.; Shaw, P.E. (1992). Comparison of static and dynamic headspace gas chromatography for quantitative determination of volatile orange juice constituents. *Food Science and Technology* **25(3)**; 236-239.
- Mouly, P.P.; Gaydou, E.M.; Corsetti, J. (1999a). Determination of the geographical origin of valencia orange juice using carotenoid liquid chromatographic profiles. *Journal of Chromatography* **844(12)**; 149-159.
- Mouly, P.P.; Gaydou, E.M.; Lapierre, L.; Corsetti, J. (1999b). Differentiation of Several Geographical Origins in Single-Strength Valencia Orange Juices Using Quantitative Comparison of Carotenoid Profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47(10)**; 4038-4045.
- Muir, D.D. (2011). Sensory Analysis for Food and Beverage Quality Control - A Practical Guide. *International Journal of Dairy Technology* **64(3)**; 458-458.
- Nikdel, S.; Chen, C.S.; Parish, M.E.; MacKellar, D.G.; Friedrich, L.M. (1993). Pasteurization of citrus juice with microwave energy in a continuous-flow unit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41(11)**; 2116-2119.
- Nisperos-Carriedo, M.O.; Shaw, P.E. (1990). Comparison of volatile flavor components in fresh and processed orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **38(4)**; 1048-1052.
- Núñez, A.J.; Bemelmans, J.M.H.; Maarse, H. (1984). Isolation methods for the volatile components of grapefruit juice. Distillation and solvent extraction methods. *Chromatographia* **18(3)**; 153-158.
- O'Mahony, M. (1979). Psychophysical Aspects of Sensory Analysis of Dairy Product: A Critique. *Journal of Dairy Science* **62(12)**; 1954-1962.
- Pagliarini, E.; Lembo, P.; Bertuccioli, M. (1991). Recent advancements in sensory analysis of cheese. *Italian journal of food science*. **3(2)**; 85-99.
- Pangborn, R.M. (1960). Influence of Color on the Discrimination of Sweetness. *The American Journal of Psychology* **73(2)**; 229-238.
- Pao, S.F.P.J.B.G.E.C.M.W. (1996). Formulation and sensory evaluation of fresh-squeezed, unpasteurized citrus juice blends. *Fruit processing* **6**; 268-271.
- Parliment, T.H. (1986). A new technique for GLC sample preparation using a novel extraction device. *Perfumer & Flavorist* **11(1)**; 3-6-.

- Patton, S.T.U.A.; Josephson, D.V. (1957). A method of determining significance of volatile flavor compounds in foods. *Journal of Food Science* **22(3)**; 316-318.
- Pérez Aparicio, J.; Ángeles Toledano Medina, M.; Lafuente Rosales, V. (2007). Descriptive sensory analysis in different classes of orange juice by a robust free-choice profile method. *Analytica Chimica Acta* **595(12)**; 238-247.
- Perez-Cacho, P.R.; Galan-Soldevilla, H.; Mahattanatawee, K.; Elston, A.; Rouseff, R.L. (2008). Sensory Lexicon for Fresh Squeezed and Processed Orange Juices. *Food Science and Technology International* **14(5 suppl)**; 131-141.
- Perez-Cacho, P.R.; Rouseff, R. (2008). Processing and Storage Effects on Orange Juice Aroma: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56(21)**; 9785-9796.
- Pérez-López, A.J.; Beltran, F.; Serrano-Megías, M.; Saura López, D.; Carbonell-Barrachina, Á.A. (2006). Changes in orange juice color by addition of mandarin juice. *European Food Research and Technology* **222**; 516-520.
- Peryam, D.R.; Swartz, V.W. (1950). Measurement of sensory differences. *Food Technology*. **4(390)**; 395-.
- Petersen, M.A.; Tonder, D.; Poll, L. (1998). Comparison of normal and accelerated storage of commercial orange juice - Changes in flavour and content of volatile compounds. *Food Quality and Preference* **9(12)**; 43-51.
- Pieper, G.A.B.R.; Borguidd, L.A.R.S.; Ackermann, P.A.U.L.; Fellers, P.A.U.L. (1992). Absorption of Aroma Volatiles of Orange Juice into Laminated Carton Packages Did Not Affect Sensory Quality. *Journal of Food Science* **57(6)**; 1408-1411.
- Plotto, A.; Baldwin, E.; McCollum, G.; Manthey, J.; Narciso, J.; Irey, M. (2010). Effect of Liberibacter Infection (Huanglongbing or "Greening" Disease) of Citrus on Orange Juice Flavor Quality by Sensory Evaluation. *Journal of Food Science* **75(4)**; S220-S230.
- Poelman, A.A.M.; Delahunty, C.M. (2011). The effect of preparation method and typicality of colour on children's acceptance for vegetables. *Food Quality and Preference* **22(4)**; 355-364.
- Porcherot, C.; Delplanque, S.; Gaudreau, N.; Cayeux, I. (2013). Seeing, smelling, feeling! Is there an influence of color on subjective affective responses to perfumed fabric softeners? *Food Quality and Preference* **27(2)**; 161-169.
- Pouplard, N.; Qannari, E.M.; Simon, S. (1997). Use of ridits to analyse categorical data in preference studies. *Food Quality and Preference* **8(56)**; 419-422.
- Rabe, S.; Linforth, R.S.T.; Krings, U.; Taylor, A.J.; Berger, R.G. (2004). Volatile Release from Liquids: A Comparison of In Vivo APCI-MS, In-mouth Headspace Trapping and In vitro Mouth Model Data. *Chemical Senses* **29(2)**; 163-173.
- Raffaelli, A. (1997). Atmospheric Pressure Ionization (ESI and APCI); en *Selected Topics in Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences* (Caprioli, R.; Malorni, A.; Sindona, G., ed.). Springer Netherlands, 17-31.

- 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.
- Rega, B.; Fournier, N.; Guichard, E. (2003). Solid Phase Microextraction (SPME) of Orange Juice Flavor: Odor Representativeness by Direct Gas Chromatography Olfactometry (D-GC-O). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51(24)**; **7092-7099**.
- Rega, B.; Fournier, N.; Nicklaus, S.; Guichard, E. (2004). Role of Pulp in Flavor Release and Sensory Perception in Orange Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52(13)**; **4204-4212**.
- Rodriguez-Amaya, D.B.; United States.Agency for International Development; OMNI, P. (1997). *Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed and Stored Foods*. John Snow Incorporated/OMNI Project.
- Rodríguez-Pulido, F.J.; Gómez-Robledo, L.; Melgosa, M.; Gordillo, B.; González-Miret, M.L.; Heredia, F.J. (2012). Ripeness estimation of grape berries and seeds by image analysis. *Computers and Electronics in Agriculture* **82(0)**; **128-133**.
- Rouseff, R.L.; Ruiz Perez-Cacho, P.; Jabalpurwala, F. (2009). Historical Review of Citrus Flavor Research during the Past 100 Years. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57(18)**; **8115-8124**.
- Ruiz Perez-Cacho, P.; Mahattanatawee, K.; Smoot, J.M.; Rouseff, R. (2007). Identification of Sulfur Volatiles in Canned Orange Juices Lacking Orange Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55(14)**; **5761-5767**.
- Ruiz Perez-Cacho, P.; Rouseff, R. (2008). Fresh Squeezed Orange Juice Odor: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **48(7)**; **681-695**.
- Sauri, E.; Nadal, I.; Alberola, J.; Sendra, J.M.; Izquierdo, L. (1980). Study on the aromatic fraction of orange juice. II. Comparison among vacuum distillation techniques for the isolation of volatiles. *Revista de agroquímica y tecnología de alimentos* **20(2)**; **220-230**.
- Schreier, P.; Drawert, F.; Junker, A.; Mick, W. (1977). The quantitative composition of natural and technologically changed aromas of plants. II. Aroma compounds in oranges and their changes during juice processing. *Z Lebensm Unters Forsch*. **164(3)**; **188-193**.
- Schutz, HG. (1954). Colour in relation to food preference.; en *Colour in foods, a symposium (p. 186, see pp. 16-21)*. Washington ,DC: Natl.Acad.Sci.,Natl.Research Council.; K.T. (Farrel, J.R.W.M.S.P.G.M.M.E., ed.). 16-21.
- Schultz, T.H.; Teranishi, R.O.Y.; Mcfadden, W.H.; Kilpatrick, P.W.; Corse, J.O.S.E. (1964). Volatiles from Oranges. II. Constituents of the Juice Identified by Mass Spectra. *Journal of Food Science* **29(6)**; **790-795**.

- Schultz, T.H.; Flath, R.A.; Mon, T.R. (1971). Analysis of orange volatiles with vapor sampling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **19(6)**; **1060-1065**.
- Selli, S.; Kelebek, H. (2011). Aromatic profile and odour-activity value of blood orange juices obtained from Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Industrial Crops and Products* **33(3)**; **727-733**.
- Serrem, C.A.; de Kock, H.L.; Taylor, J.R.N. (2011). Nutritional quality, sensory quality and consumer acceptability of sorghum and bread wheat biscuits fortified with defatted soy flour. *International Journal of Food Science & Technology* **46(1)**; **74-83**.
- Shaw, P.E.; Ahmed, E.M.; Denninson, R.A. (1977). Orange juice flavor: contribution of certain volatile components as evaluated by sensory panels.
- Shaw, P.E.; Buslig, B.S.; Moshonas, M.G. (1993). Classification of commercial orange juice types by pattern recognition involving volatile constituents quantified by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41(5)**; **809-813**.
- Shaw, P.E.; Moshonas; M.G., B.B.S.; Barros, S.; Widmer, W.W. (1999). Discriminant and principal component analyses to classify commercial orange juices based on relative amounts of volatile juice constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **79**; **1949-1953**.
- Sheung, K.S.M.; Min, S.; Sastry, S.K. (2004). Dynamic Head Space Analyses of Orange Juice Flavor Compounds and Their Absorption into Packaging Materials. *Journal of Food Science* **69(7)**; **549-556**.
- Siegmund, B.; Derler, K.; Pfannhauser, W. (2004). Chemical and sensory effects of glass and laminated carton packages on fruit juice products - Still a controversial topic. *LWT - Food Science and Technology* **37(4)**; **481-488**.
- Singh, S. (2006). Impact of color on marketing. *Management Decision* **44(6)**; **783-789**.
- Sorenson, D.; Henchion, M.; Marcos, B.; Ward, P.; Mullen, A.M.; Allen, P. (2011). Consumer acceptance of high pressure processed beef-based chilled ready meals: The mediating role of food-related lifestyle factors. *Meat Science* **87(1)**; **81-87**.
- Spence, C.; Levitan, C.A.; Shankar, M.U.; Zampini, M. (2010). Does Food Color Influence Taste and Flavor Perception in Humans? *Chemosensory Perception* **3**; **68-84**.
- Spoto, M.H.F.; Domarco, R.E.; Walder, J.M.M.; Scarmínio, I.S.; Bruns, R.E. (1997). Sensory evaluation of orange juice concentrate as affected by irradiation and storage. *Journal of Food Processing and Preservation* **21(3)**; **179-191**.
- Stampanoni, C.R. (1993). Influence of acid and sugar content on sweetness, sourness and the flavour profile of beverages and sherbets. *Food Quality and Preference* **4(3)**; **169-176**.
- Stevens, S.S. (1951). Mathematics, measurement, and psychophysics.; en *Handbook of experimental psychology* (Anon.)New York., 1-49.

- Stewart, I. (1977). Provitamin A and carotenoid content of citrus juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **25(5)**; 1132-1137.
- Stinco C.M.; Fernández-Vázquez R.; Heredia, F.J.; Meléndez-Martínez, A.J.; Vicario I.M (2010). Influence of the industrial processing on the colour and bioactive compounds of freshly processed orange juice. 6th International Congress. Pigment in Food.
- Stinco C; Fernández-Vázquez R.; Escudero-Gilete, M.L.; Heredia, F.J.; Melendez-Martinez, A.J.; Vicario, I.M. (2012). Effect of Orange Juice's Processing on the Color, Particle Size, and Bioaccessibility of Carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60(6)**; 1447-1455.
- Stone, H.; Sidel, J.L. (1995). Strategic applications for the sensory evaluation in the global market. *Food Technology* **48(2)**; 80.
- Stone, H.; Sidel, J.L. (2004). *Sensory Evaluation Practices*. Academic Press.
- Stone, H.; Sidel, J.L.; Bloomquist, J. (2004). Quantitative Descriptive Analysis; en *Descriptive Sensory Analysis in Practice* (Anon.) Food & Nutrition Press, Inc., 53-69.
- Szczesniak, A.S. (1998). Sensory texture profiling. Historical and scientific perspective. *Food Technoogy*. **52(8)**; 54-57.
- Tamura, H.; Fukuda, Y.; Padrayuttawat, A. (1996). Characterization of Citrus Aroma Quality by Odor Threshold Values; en *Biotechnology for Improved Foods and Flavors* (Anon.) American Chemical Society, 282-294.
- Taylor, A.J.; Linforth, R.S.T.; Harvey, B.A.; Blake, A. (2000). Atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for in vivo analysis of volatile flavour release. *Food Chemistry* **71(3)**; 327-338.
- Tepper, B.J. (1993). Effects of a slight color variation on consumer acceptance of orange juice. *Journal of Sensory Studies* **8(2)**; 145-154.
- Teranishi, R.; Wick, E.L.; Hornstein, I. (1999). *Flavor Chemistry: Thirty Years of Progress*. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Terwogt, M.M.; Hoeksma, J.B. (1995). Colors and Emotions: Preferences and Combinations. *The Journal of General Psychology* **122(1)**; 5-17.
- Ting, S.V.; Rouseff, R.L.; Dougherty, M.H.; Attaway, J.A. (1979). Determination of some methoxylated flavones in citrus juices by high performance liquid chromatography. *Journal of Food Science* **44(1)**; 69-71.
- Tonder, D.; Petersen, M.A.; Poll, L.; Olsen, C.E. (1998). Discrimination between freshly made and stored reconstituted orange juice using GC Odour Profiling and aroma values. *Food Chemistry* **61(1GÇ62)**; 223-229.
- Torres Gama, J.J.; de Sylos, C.M. (2007). Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chemistry* **100(4)**; 1686-1690.

- Trelea, I.C.; Atlan, S.; Deleris, I.; Saint-Eve, A.; Marin, M.; Souchon, I. (2008). Mechanistic Mathematical Model for In Vivo Aroma Release during Eating of Semiliquid Foods. *Chemical Senses* **33(2)**; 181-192.
- Tsachaki, M.; Linfoth, R.S.T.; Taylor, A.J. (2005). Dynamic Headspace Analysis of the Release of Volatile Organic Compounds from Ethanolic Systems by Direct APCI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53(21)**; 8328-8333.
- Tsachaki, M.; Linfoth, R.S.T.; Taylor, A.J. (2009). Aroma Release from Wines under Dynamic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57(15)**; 6976-6981.
- Valim, M.F. (2001). Fruit processing: journal for the fruit processing and juice producing european and overseas industry. *Fruit processing* **11(3)**; 90-94.
- Valls, J.S.; Prieto, E.B.; De Castro Martín, J.J. (1999). *Introducción al análisis sensorial de los alimentos*. Universitat de Barcelona.
- Vallverdú-Queralt, A.; Bendini, A.; Tesini, F.; Valli, E.; Lamuela-Raventos, R.M.; Toschi, T.G. (2013). Chemical and Sensory Analysis of Commercial Tomato Juices Present on the Italian and Spanish Markets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61(5)**; 1044-1050.
- Watts, B.M.; International Development Research Centre (1989). *Basic sensory methods for food evaluation*. The Centre.
- Wei, S.-T.; Ou, L.-C.; Luo, M.R.; Hutchings, J.B. (2012). Optimisation of Food Expectations Using Product Colour and Appearance. *Food Quality and Preference* **23**; 49-62.
- Wolford, R.W.; Attaway, J.A.; Alberding, G.E.; Atkins, C.D. (1963). Analysis of the Flavour and Aroma Constituents of Florida Orange Juices by Gas Chromatography. *Journal of Food Science* **28(3)**; 320-328.
- Wyszecki, G.; Stiles, W.S. (1982). *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Zellner, D.A.; Durlach, P. (2003). Effect on color on expected and experienced refreshment, intensity, and liking of beverages. *The American Journal of Psychology* **116**; 633-647.
- Zheng, Y.L.; Zou, S.S.; Qi, Y.H.; Zhan Ling Ling (2012). Performance of CIE LAB-Based Color Difference Formulae under Different Viewing Conditions. *Advanced Materials Research* **457**; 1294-1298.

## *Anexo A*







## ANEXO A. COLRIMETRÍA

### Colorimetría Triestímulo

"El color es el aspecto de la percepción visual por el cual un observador puede distinguir diferencias entre dos campos de visión del mismo tamaño, forma y estructura, causadas por diferencias en la composición espectral de la energía radiante implicada en la observación"(Wyszecki, 1963). No es, por tanto, una propiedad intrínseca del objeto que refleja o transmite la radiación luminosa, pues basta con cambiar la fuente para modificar el estímulo producido. Depende de la distribución espectral de la radiación incidente, de la capacidad del objeto para transformarla y de la fisiología del observador.

El estímulo cromático está compuesto por tres sensaciones bien diferenciadas, que dan al color su carácter tridimensional; éstas son:

- El matiz o tono que es el atributo fundamental. Tradicionalmente definido como el que nos permite clasificar a los colores como rojizos, amarillentos, etc., o aquél que permite diferenciar un color respecto al gris del mismo brillo, denominado estímulo acromático. Está relacionado con las diferencias de absorbancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda ( $\lambda$ ). Es decir, es el atributo cualitativo del color.
- El brillo o luminosidad, característica por la que un color puede clasificarse, en términos generales, como claro u oscuro. Más exactamente se puede definir como el atributo en virtud del cual los colores pueden considerarse equivalentes a alguno de los miembros de la escala de grises, entre el negro y el blanco. Es una medida relativa de la luz reflejada frente a la absorbida.
- La saturación o pureza, que determina para cada matiz su grado de diferencia frente al gris del mismo brillo, y describe la reflexión o transmisión a una determinada longitud de onda.

Se considera que el matiz es la medida cualitativa de la cromaticidad y la saturación la cuantitativa. El brillo no se considera partícipe de la característica cromática.

En la actualidad, todas las teorías y sistemas de color son canalizados por la Comisión Internacional de Iluminación, C.I.E. ("Commission Internationale de l'Eclairage"), que tiene su origen en la "Commission Internationale de Photometrie" de principios de siglo. Este organismo es el encargado de recoger, evaluar y recomendar los diferentes avances realizados en Colorimetría.

La Colorimetría es la rama de la ciencia que estudia la especificación numérica del color de un estímulo visual definido físicamente de manera que:

- Estímulos con la misma especificación y bajo las mismas condiciones de observación aparecen iguales para un observador con visión normal de los colores; es decir, que existe una perfecta igualación ("color matching").
- Estímulos que aparecen iguales poseen la misma especificación.
- Los números que comprende la especificación son funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de energía radiante espectral del estímulo.

### Espacio Triestímulo

Las leyes que rigen la generalización tricromática se pueden expresar de forma geométrica, considerando un espacio vectorial de tres dimensiones denominado Espacio

Triestímulo, en el que cada estímulo de color (Q) viene representado por un vector, expresión de las cantidades proporcionales de cada uno de los estímulos primarios rojo (R), verde (G) y azul (B).

En la especificación completa de un estímulo de color es necesario conocer, además de la distribución espectral absoluta de energía radiante emitida por la superficie externa, otros factores que caracterizan la situación del estímulo, tales como el tamaño angular de dicha superficie. Sin embargo, en el desarrollo de las expresiones para la igualación de color estos factores suelen considerarse fijos, con lo cual, el estímulo solamente viene caracterizado por su distribución espectral de energía,  $\{P\lambda d\lambda\}$ . Así, se definen los estímulos primarios de valor unitario:

$\{\rho P\lambda d\lambda\}R$ , que define el estímulo primario ROJO

$\{\gamma P\lambda d\lambda\}G$ , que define el estímulo primario VERDE

$\{\beta P\lambda d\lambda\}B$ , que define el estímulo primario AZUL

$\{P\lambda d\lambda\}Q$  para un estímulo de color cualquiera, Q

$\rho, \gamma, \beta$  son factores constantes positivos que tienen utilidad sólo en determinadas aplicaciones. En general, se suelen escoger como cantidades unitarias de estímulos primarios aquellas que al mezclar aditivamente producen una igualación de color completa con un estímulo acromático especificado, es decir, caracterizado por un espectro de energía constante.

De acuerdo con esto, un estímulo dado Q podría expresarse como la mezcla aditiva de determinadas cantidades de los tres estímulos primarios fijados R, G, B:

$$Q \equiv R_Q R + G_Q G + B_Q B \quad [1]$$

Los factores escalares  $R_Q, G_Q, B_Q$  asignados a los estímulos primarios se denominan **valores triestímulos** (término abreviado de "Valores del Triple Estímulo Internacional") de Q. Los vectores unitarios **R, G, B**, que representan los estímulos primarios, definen el espacio, tienen un origen común y se sitúan en tres direcciones arbitrariamente elegidas. De esta manera, en el espacio triestímulo-(R,G,B) el estímulo coloreado Q se define como un vector triestímulo-( $R_Q, G_Q, B_Q$ ).

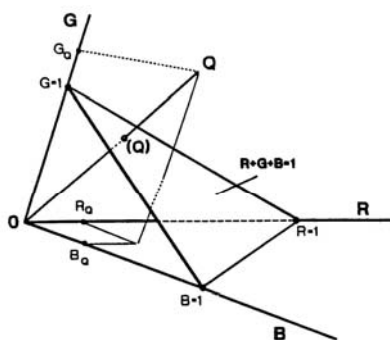


Figura 1. Espacio cromático

Una representación bidimensional útil es la que se obtiene por la proyección sobre el plano  $R+G+B=1$ , según muestra la Fig. 1. Cada vector triestímulo Q intersecciona con dicho plano en un punto Q. Es fácil entender que la localización de dicho punto Q determina la dirección del vector pero no su longitud, caracterizada por la intensidad del estímulo. En el plano unitario es conveniente elegir como ejes de coordenadas las líneas de intersección entre dicho plano y cada uno de los planos definidos por pares de vectores primarios. El triángulo formado por dichas líneas de intersección define el **diagrama de cromaticidad-(r,g)**. Las coordenadas de cromaticidad de Q están relacionadas con los valores triestímulos ( $R=R_Q, G=G_Q, B=B_Q$ ) y vienen definidas por las siguientes ecuaciones:

$$r = \frac{R}{R + G + B} \quad g = \frac{G}{R + G + B} \quad b = \frac{B}{R + G + B} \quad [2]$$

de donde se desprende que:  $r + g + b = 1$

La representación de dos de las coordenadas resulta suficiente para la definición práctica de cualquier color. El triángulo equilátero se conoce como *Triángulo de Color de Maxwell*. Más recientemente se prefiere la representación sobre un triángulo donde los dos ejes de coordenadas elegidos (r,g) sean perpendiculares entre sí. El triángulo rectángulo así definido se puede obtener mediante sencillas modificaciones sobre el espacio triestímulo que no alteran las ecuaciones colorimétricas básicas.

### Ecuaciones Colorimétricas Básicas

En un espacio vectorial, el vector resultante de la suma de otros puede expresarse como la resultante de las sumas parciales de las componentes de éstos. De la misma forma, un estímulo de color  $Q$ , con distribución de energía radiante  $\{P_\lambda d\lambda\}_Q$ , puede expresarse como la mezcla aditiva de una serie de estímulos  $Q_i$ , con distribuciones espectrales  $\{P_\lambda d\lambda\}_{Q_i}$ , asociados a  $n$  intervalos de longitud de onda de ancho  $(\Delta\lambda)_i$  (donde  $i=1$  a  $n$ ). Los  $n$  intervalos de longitud de onda, no necesariamente de anchura constante, subdividen completamente el espectro visible (380 a 770 nm).

Cada estímulo  $Q_i$  se define por la ecuación básica:

$$Q_i \equiv R_{Q_i} R + G_{Q_i} G + B_{Q_i} B \quad [3]$$

donde  $R_{Q_i}$ ,  $G_{Q_i}$ ,  $B_{Q_i}$  son los valores triestímulos de  $Q_i$ .

La mezcla aditiva de todos los estímulos  $Q_i$  igualará el estímulo original  $Q$  que, entonces, puede definirse como:

$$Q = \sum_{i=1}^n Q_i = \left( \sum_{i=1}^n R_{Q_i} \right) R + \left( \sum_{i=1}^n G_{Q_i} \right) G + \left( \sum_{i=1}^n B_{Q_i} \right) B \quad [4]$$

El número  $n$  de intervalos crece a medida que se reduce la anchura de los mismos. El caso límite genera la siguiente suma:

$$P = \lim_{|(\Delta\lambda)_{i=k}| \rightarrow 0} \sum_{i=1}^n P_{\lambda_i} (\Delta\lambda)_i \quad [5]$$

esto es, la integral definida de la concentración de energía radiante espectral  $P_\lambda$  en el espectro visible (entre  $\lambda_a$  y  $\lambda_b$ ),

$$\int_{\lambda_a}^{\lambda_b} P_\lambda d\lambda = \lim_{|(\Delta\lambda)_{i=k}| \rightarrow 0} \sum_{i=1}^n P_{\lambda_i} (\Delta\lambda)_i \quad [6]$$

Normalmente la subdivisión del espectro se realiza para intervalos constantes de longitud de onda, con lo que  $(\Delta\lambda)_i = \Delta\lambda$ , y así la ecuación definitiva es:

$$P = \int_{\lambda_a}^{\lambda_b} P_\lambda d\lambda = \lim_{\Delta\lambda \rightarrow 0} \sum_{i=1}^n P_{\lambda_i} \Delta\lambda \quad [7]$$

donde  $\lambda_i$  corresponde a la longitud de onda central del intervalo  $\Delta\lambda$ ;  $P_\lambda \Delta\lambda$  representa la energía radiante del intervalo  $d\lambda$ , y se denomina normalmente "estímulo monocromático de longitud de onda  $\lambda$ ,  $Q_\lambda$ ". Cada estímulo monocromático  $Q_\lambda$  puede expresarse

$$Q_\lambda \equiv R_\lambda R + G_\lambda G + B_\lambda B \quad [8]$$

donde  $R_\lambda, G_\lambda, B_\lambda$  se suelen denominar "valores triestímulos espectrales".

### Sistema Colorimétrico CIE

A partir del concepto original de espacio triestímulo y de las ecuaciones colorimétricas básicas, la C.I.E. propuso en 1931, aunque se publicaría un año más tarde (CIE, 1932), su sistema colorimétrico basado en unas "Especificaciones sobre observadores estándares en colorimetría" y unas "Recomendaciones sobre cuestiones relacionadas".

La dificultad en el cálculo de los valores triestímulos **R, G, B** según las ecuaciones básicas indujo a la C.I.E. a la adopción de otro sistema tricromático. Mediante una transformación matricial, a partir de los primarios **R, G, B** se definen los nuevos estímulos **X, Y, Z**. Asimismo, se definen las "funciones de igualación de color" como las propiedades del Observador Estándar CIE-1931 (u Observador de 2°), en el rango de longitudes de onda de la zona visible del espectro. Se representan por:

$$\bar{x}(\lambda) \quad y(\lambda) \quad \bar{z}(\lambda)$$

En 1964 se define un Observador Estándar Colorimétrico Suplementario (u Observador de 10°), completamente análogo al anterior, cuyas funciones de igualación de color son

$$\bar{x}_{10}(\lambda) \quad \bar{y}_{10}(\lambda) \quad \bar{z}_{10}(\lambda)$$

La C.I.E. define una serie de Distribuciones Espectrales de Energía Radiante a las que se las denomina "Iluminantes Estándares CIE" [Committee on Colorimetry (O.S.A.), 1944b], y que vienen simbolizadas por la expresión general:

$$\{ S(\lambda) d(\lambda) \}$$

donde  $S(\lambda)$ , o distribución espectral relativa del iluminante, representa la concentración espectral de energía radiante incidente (Judd y Wyszecki, 1975; Wyszecki y Stiles, 1982).

Entre los diferentes iluminantes propuestos están:

- **Iluminante A**, que representa la luz de un radiador total a la temperatura absoluta de 2856 K, según la Escala Internacional Práctica de Temperatura 1968.
- **Iluminante B**, que representa la luz solar directa y se relaciona con una temperatura de color aproximada de 4874 K.
- **Iluminante C**, que se asimila con la luz diurna media (tradicionalmente luz de cielo nublado), con temperatura de color de, aproximadamente, 6774 K. Es, todavía, el más utilizado como referencia en la evaluación de color de alimentos, aunque en 1971 (CIE, 1971) fue eliminado, junto con el iluminante B, de la lista de iluminantes recomendados por presentar serias deficiencias en la distribución espectral en la región UV, importante en el caso de materiales fluorescentes.
- **Iluminante D<sub>65</sub>**, se relaciona con una temperatura de color aproximada de 6504 K y representa una fase de la luz de día natural. Es el más utilizado actualmente y el que recomienda la CIE en la mayoría de los casos.
- **Iluminante D<sub>55</sub>**, relacionado con una temperatura de color de 5503 K.
- **Iluminante D<sub>75</sub>**, junto con el D<sub>55</sub> son la alternativa al D<sub>65</sub> recomendada por la CIE. Se

relaciona con una temperatura de color de 7504 K.

Sistemas CIE 1931-(x,y) y CIE 1964-(x<sub>10</sub>,y<sub>10</sub>) (CIEXYZ)

**Cálculo de valores triestímulo y coordenadas de cromaticidad**

Para la definición de los valores triestímulo y el cálculo de las coordenadas de cromaticidad, la CIE propone las siguientes ecuaciones generales, de acuerdo con los dos observadores patrón

<p style="text-align: center;">CIE 1931-(x,y)</p> $X = k \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{x}(\lambda) d(\lambda)$ $Y = k \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{y}(\lambda) d(\lambda)$ $Z = k \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{z}(\lambda) d(\lambda)$ $x = \frac{X}{X + Y + Z}$ $y = \frac{Y}{X + Y + Z}$ $z = \frac{Z}{X + Y + Z}$	[9]	<p style="text-align: center;">CIE 1964-(x<sub>10</sub>,y<sub>10</sub>)</p> $X_{10} = k_{10} \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{x}_{10}(\lambda) d(\lambda)$ $Y_{10} = k_{10} \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{y}_{10}(\lambda) d(\lambda)$ $Z_{10} = k_{10} \int_{\lambda} P_{\lambda} \bar{z}_{10}(\lambda) d(\lambda)$ $x_{10} = \frac{X_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$ $y_{10} = \frac{Y_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$ $z_{10} = \frac{Z_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$	[10]
--	-----	--	------

$x = \frac{X}{X + Y + Z}$ $y = \frac{Y}{X + Y + Z}$ $z = \frac{Z}{X + Y + Z}$	[11]	$x_{10} = \frac{X_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$ $y_{10} = \frac{Y_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$ $z_{10} = \frac{Z_{10}}{X_{10} + Y_{10} + Z_{10}}$	[12]
---	------	--	------

donde X, Y, Z y X<sub>10</sub>, Y<sub>10</sub>, Z<sub>10</sub> son los valores triestímulo respectivos; x, y, x<sub>10</sub>, y<sub>10</sub> son las coordenadas de cromaticidad de ambos sistemas coloreados. k y k<sub>10</sub> toman valores arbitrarios y son factores normalizantes. P<sub>λ</sub> corresponde al componente monocromático de longitud de onda λ, en el estímulo coloreado.  $\bar{x}(\lambda)$ ,  $\bar{y}(\lambda)$ ,  $\bar{z}(\lambda)$  y  $\bar{x}_{10}(\lambda)$ ,  $\bar{y}_{10}(\lambda)$ ,  $\bar{z}_{10}(\lambda)$  son las funciones de igualación de color del espectro visible.

Si en el espacio CIEXYZ se representan los valores triestímulo de los estímulos monocromáticos, E<sub>λ</sub>, a lo largo del espectro visible, se obtiene la línea curva que muestra la Fig. 2. Rotando la gráfica adecuadamente se tiene una imagen aproximada de una de las posibles proyecciones sobre el plano unitario o diagrama de cromaticidad (Fig. 3).

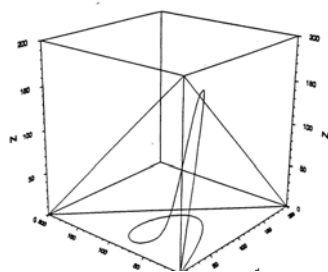


Figura 2. Espacio Triestímulo

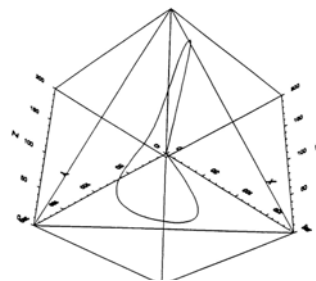


Figura 3. Rotación del Espacio

La proyección que se elige en colorimetría, a partir del origen de coordenadas, es oblicua y se realiza sobre un triángulo rectángulo produciendo el "spectrum locus" o perímetro del diagrama cromático (Fig. 4). La línea de púrpuras representa las diferentes mezclas entre los estímulos monocromáticos extremos azul y rojo (λ=400 nm y λ=770 nm, respectivamente) (Fig. 5).

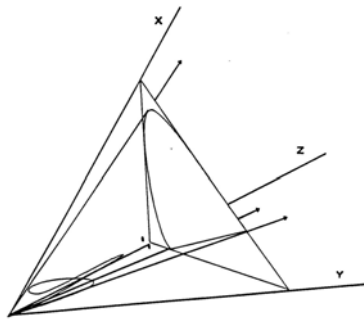


Figura 4. Proyección oblicua del

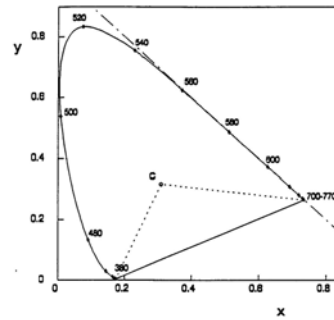


Figura 5. Diagrama cromático CIE 1931

Algunos trabajos han puesto de manifiesto la falta de uniformidad del Espacio Cromático CIE 1931, demostrando que existen variaciones de magnitud y orientación de las elipses cuando consideran observadores diferentes (Brown y MacAdam, 1949).

### Espacio CIELUV

Dos espacios cromáticos completan la serie de Recomendaciones de la C.I.E. (1978): El espacio de color CIE 1976  $L^*u^*v^*$  (CIELUV), y el espacio de color CIE 1976  $L^*a^*b^*$  (CIELAB).

El espacio CIELUV es una modificación del sistema CIE 1964 ( $U^*V^*W^*$ ) Wyszecki (1963). Este espacio coloreado incorpora una nueva Escala Uniforme de Color, CIE 1976 UCS (MacAdam, 1974; 1978; Nickerson, 1975), representada por el Diagrama de Cromaticidad ( $u',v'$ ) (Fig. 6)

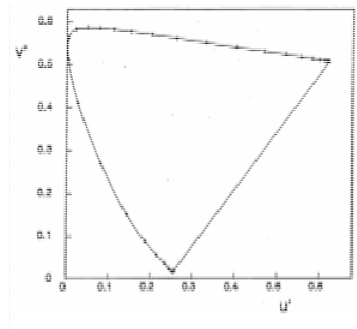


Figura 6. Escala de Cromaticidad Uniforme UCS 1976

$$u' = \frac{4X}{X + 15Y + 3Z} \quad v' = \frac{9X}{X + 15Y + 3Z} \quad [13]$$

El espacio CIELUV viene determinado por la respuesta tridimensional en coordenadas rectangulares de las cantidades de "Claridad Psicométrica",  $L^*$ , y cromaticidad  $u^*$ ,  $v^*$ . Se definen por las expresiones:

$$L^* = 116 \sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} - 16 \quad [14]$$

$$u^* = 13 L^* (u' - u_{n'}) \quad [15]$$

$$v^* = 13 L^* (v' - v_{n'}) \quad [16]$$

donde  $u', v'$  representan la cromaticidad de un estímulo coloreado;  $u'_n, v'_n$  la del estímulo blanco correspondiente al iluminante de referencia;  $Y, Y_n$  son los valores triestímulos CIE 1931, para el estímulo considerado y el estímulo blanco, respectivamente.

En el caso del Iluminante C y el Observador Estándar CIE 1931,  $u',n$  y  $v',n$  toman los valores

$$u'_n(C) = u_o(C) = 0,2009$$

$$v'_n(C) = 1,5 v_o(C) = 0,4610$$

En este sistema, la fórmula para diferencias de color propuesta es análoga a la anterior, y también considera conjuntamente la claridad y cromaticidad:

$$\Delta E_{uv}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta u^*)^2 + (\Delta v^*)^2} \quad [17]$$

**Espacio CIELAB**

El espacio de Color CIE 1976  $L^*a^*b^*$  (CIELAB), que procede de los sistemas de raíz cúbica (Glasser *et al.*, 1958) como el Sistema ANLAB (Glasser y Troy, 1952), queda definido, tal como muestra la Fig. 7, cuando se representan en coordenadas rectangulares las siguientes expresiones para claridad,  $L^*$ , y cromaticidad,  $a^*, b^*$ :

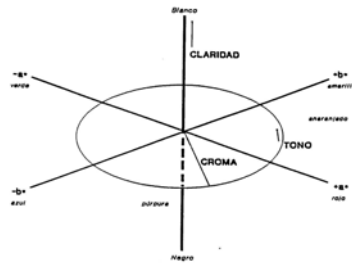


Figura 7. Coordenadas cartesianas y cilíndricas del espacio de color CIE 1976-( $L^*a^*b^*$ ) (CIELAB).

- **Claridad ( $L^*$ )**, que se define igual que en el sistema CIELUV y, análogamente, hay que considerar la modificación de Pauli (1976) para evitar la pérdida de uniformidad para valores de  $Y/Y_n < 0,008856$ .

$$L^* = 116 \sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} - 16 \quad \text{para } Y/Y_n > 0,008856 \quad [18]$$

$$L_m^* = 903,3 \left( \frac{Y}{Y_n} \right) \quad \text{para } Y/Y_n \leq 0,008856 \quad [19]$$

- **Cromaticidad ( $a^*, b^*$ )**:

$$a^* = 500 \left[ f\left(\frac{X}{X_n}\right) - f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) \right] \quad [20]$$

$$b^* = 200 \left[ f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) - f\left(\frac{Z}{Z_n}\right) \right] \quad [21]$$



siendo:

$$f\left(\frac{X}{X_n}\right) = \sqrt[3]{\frac{X}{X_n}} \quad \text{para } X/X_n > 0,008856 \quad [22]$$

$$f\left(\frac{X}{X_n}\right) = 7,787\left(\frac{X}{X_n}\right) + \frac{16}{116} \quad \text{para } X/X_n \leq 0,008856 \quad [23]$$

$$f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) = \sqrt[3]{\frac{Y}{Y_n}} \quad \text{para } Y/Y_n > 0,008856 \quad [24]$$

$$f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) = 7,787\left(\frac{Y}{Y_n}\right) + \frac{16}{116} \quad \text{para } Y/Y_n \leq 0,008856 \quad [25]$$

$$f\left(\frac{Z}{Z_n}\right) = \sqrt[3]{\frac{Z}{Z_n}} \quad \text{para } Z/Z_n > 0,008856 \quad [26]$$

$$f\left(\frac{Z}{Z_n}\right) = 7,787\left(\frac{Z}{Z_n}\right) + \frac{16}{116} \quad \text{para } Z/Z_n \leq 0,008856 \quad [27]$$

los valores  $X_n$ ,  $Y_n$ ,  $Z_n$  corresponden al estímulo considerado como blanco. Para el iluminante C y el Observador Estándar CIE 1931,

$$X_n = 98,041 \quad Y_n = 100 \quad Z_n = 118,103$$

La diferencia de color queda definida por:

$$\Delta E_{ab}^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad [28]$$

Al contrario de lo que sucede con los espacios coloreados CIE 1964 ( $U^*V^*W^*$ ) y CIELUV, el espacio CIELAB no está relacionado directamente con el espacio CIE 1931 ( $x,y$ ). Mientras que algunos autores (Lozano, 1977; 1979) ponen de manifiesto las diferencias existentes entre los sistemas CIELUV y CIELAB, asegurando que se dan indicios de la superioridad de los sistemas tipo raíz cúbica (ANLAB, CIELAB), otros estudios (McLaren, 1970; 1981) parecen demostrar fehacientemente que, en la práctica, estas diferencias no son significativas en orden a la caracterización cromática de los objetos.

Por otro lado, aunque el espacio CIELAB se recomienda en numerosas aplicaciones prácticas (Artigas *et al.*, 1985), en ocasiones puede presentar algunas limitaciones y anomalías que desaconsejen su uso, siendo conveniente en estos casos tomar como alternativa el sistema CIELUV (Felipe y Artigas, 1986). En este sentido, Hita *et al.* (1985) realizan un interesante estudio comparativo entre los cuatro sistemas de especificación del color, encontrando evoluciones similares entre CIEXYZ y CIELAB por un lado, y entre CIEUVW y CIELUV, por otro. Llegan a la conclusión de que todavía hay mucho por hacer en la consecución de un espacio verdaderamente uniforme.

#### Parámetros Psicométricos Uniformes

A partir de los índices de claridad-cromaticidad ( $L^*$ ,  $u^*$ ,  $v^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ) definidos por los espacios CIELUV y CIELAB, se recomiendan otros componentes del color, importantes en su especificación psicofísica. Así,

- **Croma** ( $C_{uv}^*$ ,  $C_{ab}^*$ ), función dependiente de las coordenadas de cromaticidad,

$$C_{uv}^* = \sqrt{(u^*)^2 + (v^*)^2}$$

[29]

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

[30]

- Saturación ( $s_{uv}^*$ ), explicitada en el sistema CIELUV por la expresión:

$$s_{uv}^* = 13 \sqrt{(u' - u_n')^2 + (v' - v_n')^2}$$

[31]

y que se puede calcular a partir del croma y la claridad,

$$s_{uv}^* = \frac{C_{uv}^*}{L^*} \quad [32]$$

En el sistema CIELAB no se aplica una correlación similar para la saturación.

- Tono ( $h_{uv}$ ,  $h_{ab}$ ), que es el ángulo, en grados sexagesimales, formado entre el vector que representa al punto en el diagrama y el eje de abscisas:

$$h_{uv} = \arctan \left( \frac{v^*}{u^*} \right) \quad [33]$$

$$h_{ab} = \arctan \left( \frac{b^*}{a^*} \right) \quad [34]$$

Según los valores que adopten las coordenadas cromáticas, este ángulo se sitúa en un determinado cuadrante,

- si  $u^* > 0$  y  $v^* > 0 \Rightarrow 0^\circ < h < 90^\circ$
- si  $u^* < 0$  y  $v^* > 0 \Rightarrow 90^\circ < h < 180^\circ$
- si  $u^* < 0$  y  $v^* < 0 \Rightarrow 180^\circ < h < 270^\circ$
- si  $u^* > 0$  y  $v^* < 0 \Rightarrow 270^\circ < h < 360^\circ$

En todas estas correlaciones psicométricas, de los conceptos de luminosidad, croma y matiz, con la percepción visual, hemos de tener en cuenta la influencia que pueden ejercer las condiciones de observación.

Las diferencias de tono ( $\Delta H_{uv}^*$ ,  $\Delta H_{ab}^*$ ) entre dos estímulos coloreados aparecen como función de las diferencias de color, corregidas por la claridad y el croma,

$$\Delta H_{uv}^* = \sqrt{(\Delta E_{uv}^*)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C_{uv}^*)^2} \quad [35]$$

$$\Delta H_{ab}^* = \sqrt{(\Delta E_{ab}^*)^2 - (\Delta L^*)^2 - (\Delta C_{ab}^*)^2} \quad [36]$$

Cuando se trata de pequeñas diferencias entre pares de estímulos suficientemente alejados del estímulo acromático, se puede emplear,

$$\Delta H_{uv}^* = \frac{C_{uv}^* h_{uv} \pi}{180} \quad [37]$$

$$\Delta H_{ab}^* = \frac{C_{ab}^* h_{ab} \pi}{180} \quad [38]$$

donde la diferencia de matiz es el tono, expresado en radianes, corregido por el valor del croma.

### Diferencias de Color

Desde el punto de vista del uso industrial, quizás sea más importante que medir un color, el determinar las magnitudes de las diferencias respecto de un color de referencia o patrón. En otras palabras, puede ser más necesario evaluar la uniformidad de la producción de un color que conocer su real magnitud (Lozano, 1978).

En la Legislación española existe ya una recomendación sobre algunos de los sistemas cromáticos estudiados, y que se consideran en la Norma UNE 72-031-83 (UNE, 1983) sobre *Magnitudes colorimétricas*. Esta norma tiene por objeto "definir las magnitudes derivadas matemáticamente de los valores triestímulos, respuestas primarias de los detectores que definen los observadores colorimétricos UNE-3 y UNE-4 (según normas UNE 72-014 y UNE 72-015), y que pueden considerarse por tanto como respuestas de éstos a un estímulo luminoso. Tratando de imitar los observadores reales, estas respuestas se hacen depender del tipo de estímulo y del blanco de referencia".

La norma reproduce las definiciones de magnitudes y términos del Espacio coloreado CIE 1976 ( $L^*a^*b^*$ ) (CIELAB). En la norma se consideran las magnitudes, tomadas del espacio CIELAB: *coordenadas colorimétricas* ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ), *claridad* ( $L^*$ ), *croma* ( $C^*$ ), *tono* ( $H^*$ ),  *saturación* ( $S^*$ ). Además considera y define el parámetro *Luminosidad* ( $Q^*$ ) como una magnitud derivada de la claridad  $L^*$  y de la luminancia del blanco de referencia  $Y_N$ . Con el término *cromaticidad* designa la variable bidimensional que considera el conjunto de dos magnitudes que, junto con la claridad, pueden definir el color de un estímulo: ( $a^*$ ,  $b^*$ ) ó ( $C^*$ ,  $H^*$ ) ó ( $S^*$ ,  $H^*$ ).

### Bibliografía

- ARTIGAS, J.M.; GIL, J.C.; FELIPE, A. (1985). El espacio uniforme de color CIELAB. Utilización. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* 25(3), 316-320.
- BROWN, W.R.J.; MacADAM, D.L. (1949). Visual Sensitivities to Chromaticity and Luminance Differences. *J. Opt. Soc. Am.* 39(10), 808-834.
- C.I.E. (1932). *C.I.E. Proceedings 1931*. Cambridge University Press, Cambridge. p. 19.
- C.I.E. (1978). *Recommendations on Uniform Color Spaces, Color-Difference Equations, Psychometric Color Terms, CIE Publication No. 15 (E-1.3.1) 1971, Supplement 2*. Bureau Central de la CIE, Paris.
- COMMITTEE ON COLORIMETRY (O.S.A.) (1944). Quantitative Data and Methods for Colorimetry. *J. Opt. Soc. Am.* 34(11), 633-688.
- FELIPE, A.; ARTIGAS, J.M. (1986). Limitaciones, anomalías y particularidades del espacio uniforme de color CIELAB. *Optica Pura y Aplicada* 19(3), 173-178.
- GLASSER, L.G.; McKINNEY, C.D.; REILLY, C.D.; SCHNELLE, P.D. (1958). Cube-Root Color Coordinate System. *J. Opt. Soc. Am.* 48(10), 736-740.
- GLASSER, L.G.; TROY, D.J. (1952). A new high sensitivity differential colorimeter. *J. Opt. Soc. Am.* 42, 652.
- HITA, E.; ROMERO, J.; JIMENEZ DEL BARCO, L.; CARRILLO, A. (1985). Experimental study of color specification systems. *Optica Pura y Aplicada* 18(2), 123-133.
- JUDD, D.B.; WYSZECKI, G. (1975). *Color in business, science and industry, 3rd ed.* John Wiley & Sons, New York. p. 91-396.
- LOZANO, R.D. (1977). Evaluation of different color-difference formulae by means of an experiment on color scaling. Preliminary report. *Color Res. Appl.* 2(1), 13-18.
- LOZANO, R.D. (1978). *El color y su medición*. Ed. America Lee, Buenos Aires.
- LOZANO, R.D. (1979). Diferencias de color. *Investigación y Ciencia*, Diciembre, 8-14.
- MacADAM, D.L. (1974). Uniform color scales. *J. Opt. Soc. Am.* 64(12), 1691-1702.
- MacADAM, D.L. (1978). Colorimetric data for samples of OSA uniform color scales. *J. Opt. Soc. Am.* 68(1), 121-130.
- McLAREN, K. (1970). The precision of textile colour matchers in relation to colour difference

- measurements. *Proc. AIC-Color 69*, Estocolmo, p. 688-708.
- McLAREN, K. (1981). *Golden Jubilee of Colour in the CIE* (Society of Dyers and Colourists,ed). S.D.C., Bradford. p. 168.
- NICKERSON, D. (1975). Uniform color scales: Munsell conversion of OSA committee selection. *J. Opt. Soc. Am.* 65(2), 205-207.
- PAULI, H. (1976). Proposed extension of the CIE recommendation on uniform color spaces, color difference equations, and metric color terms. *J. Opt. Soc. Am.* 66, 866-867.
- U.N.E. (1983). *Norma UNE 72-031-83: Magnitudes colorimétricas*. Instituto Español de Normalización (IRANOR), Madrid. p. 1-4.
- WYSZECKI G. Proposal for a New Color-Difference Formula. *J Opt Soc Am* 1963; 53: 1318-1319.
- WYSZECKI, G. (1975). Uniform color scales: CIE 1964 U. *J. Opt. Soc. Am.* 65(4), 456-460.
- WYSZECKI, G.; STILES, W.S. (1982). *Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc, New York. p. 117-248.



## *Anexo B*





## ANEXO B. TABLAS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS ESTADÍSTICOS

**Tabla 1: Prueba de comparación por parejas. Ensayo unilateral (a) y bilateral (b).**

Número de respuestas n	Número mín. de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación		
	$\alpha \leq 0,05$	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,001$
7	7	7	-
8	7	8	-
9	8	9	-
10	9	10	10
11	9	10	11
12	10	11	12
13	10	12	13
14	11	12	13
15	12	13	14
16	12	14	15
17	13	14	16
18	13	15	16
19	14	15	17
20	15	16	18
21	15	17	18
22	16	17	19
23	16	18	20
24	17	19	20
25	18	19	21
26	18	20	22
27	19	20	22
28	19	21	23
29	20	22	24
30	20	22	24
31	21	23	25
32	22	24	26
33	22	24	26
34	23	25	27
35	23	25	27
36	24	26	28
37	24	27	29
38	25	27	29
39	26	28	30
40	26	28	31
41	27	29	31
42	27	29	32
43	28	30	32
44	28	31	33
45	29	31	34
46	30	32	34
47	30	32	35
48	31	33	36
49	31	34	36
50	32	34	37
60	37	40	43
70	43	46	49
80	48	51	55
90	54	57	61
100	59	63	66

(a)

Número de respuestas n	Número mín. de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación		
	$\alpha \leq 0,05$	$\alpha \leq 0,01$	$\alpha \leq 0,001$
7	7	-	-
8	8	-	-
9	8	9	-
10	9	10	-
11	10	11	11
12	10	11	12
13	11	12	13
14	12	13	14
15	12	13	14
16	13	14	15
17	13	15	16
18	14	15	17
19	15	16	17
20	15	17	18
21	16	17	19
22	17	18	19
23	17	19	20
24	18	19	21
25	18	20	21
26	19	20	22
27	20	21	23
28	20	22	23
29	21	22	24
30	21	23	25
31	22	24	25
32	23	24	26
33	23	25	27
34	24	25	27
35	24	26	28
36	25	27	29
37	25	27	29
38	26	28	30
39	27	28	31
40	27	29	31
41	28	30	32
42	28	30	32
43	29	31	33
44	29	31	34
45	30	32	34
46	31	33	35
47	31	33	36
48	32	34	36
49	32	34	37
50	33	35	37
60	39	41	44
70	44	47	50
80	50	52	56
90	55	58	61
100	61	64	67

(b)

**NOTAS**

- Estos valores se han calculado a partir de la fórmula exacta: ley binomial de parámetro  $p=0,50$  con  $n$  repeticiones (replicados).
- Cuando el número de respuestas es mayor que 100 ( $n > 100$ ) es preciso usar la fórmula siguiente que está basada en la aproximación de la ley binomial a la normal y que da el número mínimo de juicios efectivamente expresados que hay que obtener, con un error máximo de  $\pm 1$ .

Número mínimo de respuestas: Valor entero más próximo a  $\frac{n+1}{2} + k\sqrt{n}$

Modelo unilateral	
$\alpha \leq 0,05$	$k = 1,82$
$\alpha \leq 0,01$	$k = 1,16$
$\alpha \leq 0,001$	$k = 1,55$

Modelo bilateral	
$\alpha \leq 0,05$	$k = 0,98$
$\alpha \leq 0,01$	$k = 1,29$
$\alpha \leq 0,001$	$k = 1,65$



**Tabla 2: Niveles de significación de la prueba triangular.**

Número de respuestas	Número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación de			Número de respuestas	Número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación de			Número de respuestas	Número mínimo de respuestas necesarias para alcanzar un nivel de significación de		
	5%	1%	0,1%		5%	1%	0,1%		5%	1%	0,1%
5	4	5	–	37	18	20	22	69	31	33	36
6	5	6	–	38	19	21	23	70	31	34	37
7	5	6	7	39	19	21	23	71	31	34	37
8	6	7	8	40	19	21	24	72	32	34	38
9	6	7	8	41	20	22	24	73	32	35	38
10	7	8	9	42	20	22	25	74	32	35	39
11	7	8	10	43	20	23	25	75	33	36	39
12	8	9	10	44	21	23	26	76	33	36	39
13	8	9	11	45	21	24	26	77	34	36	40
14	9	10	11	46	22	24	27	78	34	37	40
15	9	10	12	47	22	24	27	79	34	37	41
16	9	11	12	48	22	25	27	80	35	38	41
17	10	11	13	49	23	25	28	81	35	38	41
18	10	12	13	50	23	26	28	82	35	38	42
19	11	12	14	51	24	26	29	83	36	39	42
20	11	13	14	52	24	26	29	84	36	39	43
21	12	13	15	53	24	27	30	85	37	40	43
22	12	14	15	54	25	27	30	86	37	40	44
23	12	14	16	55	25	28	30	87	37	40	44
24	13	15	16	56	26	28	31	88	38	41	44
25	13	15	17	57	26	28	31	89	38	41	45
26	14	15	17	58	26	29	32	90	38	42	45
27	14	16	18	59	27	29	32	91	39	42	46
28	15	16	18	60	27	30	33	92	39	42	46
29	15	17	19	61	27	30	33	93	40	43	46
30	15	17	19	62	28	30	33	94	40	43	47
31	16	18	20	63	28	31	34	95	40	44	47
32	16	18	20	64	29	31	34	96	41	44	48
33	17	18	21	65	29	32	35	97	41	44	48
34	17	19	21	66	29	32	35	98	41	45	48
35	17	19	22	67	30	33	36	99	42	45	49
36	18	20	22	68	30	33	36	100	42	46	49

## NOTAS

- Los valores dados en la tabla han sido calculados a partir de la fórmula exacta de la distribución binomial de parámetro  $p = 1/3$  con  $n$  respuestas.
- Cuando el número de respuestas es superior a 100 ( $n > 100$ ) es necesario utilizar la fórmula siguiente, basada en la aproximación de la distribución binomial a la normal y que proporciona el número real de juicios a obtener con un error como máximo de 1 unidad.

El número mínimo de respuestas ( $X$ ) es el valor entero más próximo a:

$$X = 0,4174z \cdot \sqrt{n} + \frac{(2n+3)}{6}$$

6

donde

$z = 1,64$ , para  $\alpha < 0,05$

$z = 2,33$ , para  $\alpha < 0,01$

$z = 3,10$ , para  $\alpha < 0,001$

**Tabla 3: Valores críticos aproximados para la prueba de Friedman (probabilidades 0.05 y 0.01).**

Número de jueces $J$	Número de muestras (o productos) $P$					
	3	4	5	3	4	5
	Nivel de significación $\alpha = 0,05$			Nivel de significación $\alpha = 0,01$		
2	–	6,00	7,60	–	–	8,00
3	6,00	7,00*	8,53	–	8,20*	10,13
4	6,50	7,50*	8,80	8,00	9,30*	11,00
5	6,40	7,80	8,96	8,40	9,96	11,52
6	6,33*	7,60	9,49**	9,00	10,20	13,28**
7	6,00*	7,62*	9,49**	8,85	10,37	13,28**
8	6,25	7,65	9,49**	9,00	10,35*	13,28**
9	6,22	7,81**	9,49**	8,66	11,34**	13,28**
10	6,20	7,81**	9,49**	8,60*	11,34**	13,28**
11	6,54	7,81**	9,49**	8,90*	11,34**	13,28**
12	6,16	7,81**	9,49**	8,66*	11,34**	13,28**
13	6,00	7,81**	9,49**	8,76*	11,34**	13,28**
14	6,14	7,81**	9,49**	9,00	11,34**	13,28**
15	6,40	7,81**	9,49**	8,93	11,34**	13,28**

## NOTAS

- 1 La prueba de Friedman podría tabularse para  $P = 2$ . Sin embargo, en este caso es suficiente aplicar la distribución binomial (o su aproximación normal) al número de veces que una de las dos muestras ocupa la misma posición en la ordenación. Este caso se considera como una prueba de comparación por parejas ("modelo bilateral" : véase Norma 87 005:1992).
- 2 El valor  $F$  puede tener únicamente valores discontinuos, siendo esta discontinuidad muy pronunciada para valores pequeños de  $J$  y de  $P$ . Por lo tanto, no es posible obtener valores críticos que correspondan exactamente a los niveles 0,05 y 0,01. Los valores marcados con un asterisco (\*) corresponden a niveles ligeramente superiores a 0,05 y a 0,01. Los valores no marcados corresponden a niveles reales inferiores a 0,05 y a 0,01.
- 3 Los valores marcados con un asterisco doble (\*\*) son valores críticos obtenidos por medio de aproximaciones utilizando la distribución  $\chi^2$ .

**Tabla 4: Valores críticos de distribución de  $\chi^2$  (niveles de 0.05 y 0.01).**

Número de muestras (o productos) $P$	Número de grados de libertad de $\chi^2$ ( $v = P - 1$ )	Nivel de significación $\alpha$	
		$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,01$
3	2	5,99	9,21
4	3	7,81	11,34
5	4	9,49	13,28
6	5	11,07	15,09
7	6	12,59	16,81
8	7	14,07	18,47
9	8	15,51	20,09
10	9	16,92	21,67
11	10	18,31	23,21
12	11	19,67	24,72
13	12	21,03	26,22
14	13	22,36	27,69
15	14	23,68	29,14
16	15	25,00	30,58
17	16	26,30	32,00
18	17	27,59	33,41
19	18	28,87	34,80
20	19	30,14	36,19
21	20	31,41	37,57
22	21	32,67	38,93
23	22	33,92	40,29
24	23	35,17	41,64
25	24	36,41	42,98
26	25	37,65	44,31
27	26	38,88	45,64
28	27	40,11	46,96
29	28	41,34	48,28
30	29	42,56	49,59
31	30	43,77	50,89

NOTA – Cuando en casos excepcionales  $P$  es mayor que 31, los valores críticos aproximados se obtienen utilizando las siguientes fórmulas:

– para  $\alpha = 0,05$ :  $P - 0,15 + 1,645 \sqrt{(2P - 3)}$

– para  $\alpha = 0,01$ :  $P + 1,20 + 2,326 \sqrt{(2P - 3)}$

**Tabla 5: Valores críticos de la prueba de Page (niveles de 0.05 y 0.01).**

Número de jueces $j$	Número de muestras (o productos) $p$											
	3	4	5	6	7	8	3	4	5	6	7	8
	Nivel de significación $\alpha=0,05$						Nivel de significación $\alpha=0,01$					
7	91	189	338	550	835	1204	93	193	346	563	855	1232
8	104	214	384	625	950	1371	106	220	393	640	972	1401
9	116	240	431	701	1065	1537	119	246	441	717	1088	1569
10	128	266	477	777	1080	1703	131	272	487	793	1205	1736
11	141	292	523	852	1295	1868	144	298	534	869	1321	1905
12	153	317	570	928	1410	2035	156	324	584	946	1437	2072
13	165	343	615*	1003*	1525*	2201*	169	350*	628*	1022*	1553*	2240
14	178	368	661*	1078*	1639*	2367*	181	376*	674*	1098*	1668*	2437
15	190	394	707*	1153*	1754*	2532*	194	402*	721*	1174*	1784*	2574*
16	202	420*	754*	1228*	1868*	2697*	206	427*	767*	1249*	1899*	2740*
17	215	445*	800*	1303*	1982	2862*	218	453*	814*	1325*	2014*	2907*
18	227	471*	846*	1378*	2097*	3028*	231	479*	860*	1401*	2130*	3073*
19	239	496*	891*	1453*	2217*	3193*	243	505*	906*	1476*	2245*	3240*
20	251	522*	937*	1528*	2325*	3358*	256	531*	953*	1552*	2360*	3406*

**Nota** valores marcados con un asterisco (\*) son valores críticos calculados por aproximación a la distribución normal.







**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**