



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN Y EFECTO MICROBICIDA DE  
COMPUESTOS FENÓLICOS Y FLAVONOIDES  
OBTENIDOS DE *Citrus limetta* Y *Citrus reticulata***

**TESIS**

**presentada por:**

**M.C. ANDRÉS ALEJANDRO DAMIÁN REYNA 9806264H**

**A la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería  
Química como requisito parcial para obtener el grado de:**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**EN**

**INGENIERÍA QUÍMICA**

**Asesora: Dra. Ma. Del Carmen Chávez Parga**

**Co-Asesor: Dr. Juan Carlos González Hernández**

**Morelia, Mich.**

**Enero 2017**

## I. RESUMEN

En éste estudio se determinaron los contenidos de fenoles totales (TPC), flavonoides totales (TFC), hesperidina y ácido ascórbico en bagazo, jugo y semilla de lima dulce (*Citrus limetta*) y mandarina (*Citrus reticulata*) producidas en México, en dos estados de maduración (IM). También se determinaron sus capacidades bactericidas. Los bagazos mostraron los niveles más altos de TPC, TFC, hesperidina y ácido ascórbico, mientras que las semillas registraron los valores más bajos. Los extractos de *C. limetta* y *C. reticulata* mostraron actividad bactericida en el rango de 4–40 mg mL<sup>-1</sup>, en los microorganismos de prueba *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona aureginosa*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*. Se observó que los contenidos de TPC, TFC, hesperidina y ácido ascórbico, así como el efecto bactericida de los extractos, se incrementaron en el nivel de mayor madurez tanto para *C. limetta* como para *C. reticulata*.

**Palabras clave:** Flavonoides, fenoles, hesperidina, ácido ascórbico, cítricos, bactericida, madurez.

## ABSTRACT

In this study, total phenolics content (TPC), total flavonoids content (TFC), hesperidin and ascorbic acid contents were measured for bagasses, juice and seeds of sweet lime (*Citrus limetta*) and tangerine (*Citrus reticulata*) produced in México, at two index of maturity (IM). Also, their bactericidal capacity was measured. Bagasses showed the highest contents of TPC, TFC, hesperidin and ascorbic acid, whereas seeds showed the lowest contents. *C. limetta* and *C. reticulata* extracts showed bactericidal activity at 4–40 mg mL<sup>-1</sup>, for the tests microorganisms *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomona aureginosa*, *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus*. TPC, TFC, hesperidin and ascorbic acid contents, as well as bactericidal effect of the extracts, were found to arise within the highest tested IM both for *C. limetta* and *C. reticulata*.

**Keywords:** Flavonoids, phenolics, hesperidin, ascorbic acid, citrus, bactericidal, maturity.

INDICE	PAG
I. RESUMEN	2
II. JUSTIFICACIÓN	6
III. HIPÓTESIS	7
IV. OBJETIVOS	8
4.1 Objetivo General.....	8
4.2 Objetivos Particulares.....	8
V. MARCO TEÓRICO	9
5.1 Cítricos .....	9
5.1.1 Mandarina ( <i>Citrus reticulata</i> )	12
5.1.2 Lima ( <i>Citrus limetta</i> )	13
5.2 Polifenoles, Flavonoides y Ácidos Orgánicos en Cítricos .....	13
5.2.1 Localización, función y cambios con la maduración	13
5.3 Obtención y Purificación de Extractos Cítricos .....	19
5.4 Caracterización de Extractos Cítricos .....	26
5.5 Efecto Microbicida de los Cítricos .....	36
5.5.1 Organismos patógenos .....	36
5.5.1.1 Bacterias coliformes	36
5.5.1.2 <i>Salmonella</i>	37
5.5.1.3 <i>Staphylococcus</i>	38
5.5.1.4 <i>Listeria</i>	38
5.5.1.5 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	39
5.5.2 Mecanismo de acción antimicrobiana	39
VI. METODOLOGÍA	47
6.1 Acondicionamiento de materia prima .....	47
6.2 Obtención de extractos.....	48
6.3 Análisis de los extractos .....	49
6.3.1 Contenido de fenoles totales (TPC)	49
6.3.2 Contenidos de flavonoides totales (TFC)	49
6.3.3 Contenido de hesperidina y ácido ascórbico	50
6.4 Evaluación bactericida .....	50

6.4.1	Efecto de la concentración y madurez.	50
6.4.2	Determinación de MIC y MBC	50
6.4.3	Organismos de Prueba	51
6.5	Análisis estadístico .....	51
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
7.1	Fruta utilizada.....	53
7.2	Efecto de la madurez en TPC, TFC, hesperidina y ácido ascórbico .....	53
7.3	Inhibición bacteriana .....	58
7.3.1	MIC y MBC	59
7.3.2	Influencia de la madurez en la actividad antibacteriana	60
VIII.	CONCLUSIONES.....	64
IX.	REFERENCIAS.	65

### Índice de Figuras

Figura 1.	Principales municipios productores de cítricos en Michoacán. ....	10
Figura 2.	Estructura General de los flavonoides. ....	16
Figura 3.	Clasificación estructural de los flavonoides. ....	17
Figura 4.	Metodología de las pruebas microbicidas en placa. ....	40
Figura 6.	Secciones de un fruto cítrico. D <sub>1</sub> : diámetro polo a polo total; D <sub>2</sub> : diámetro ecuatorial total; D <sub>3</sub> : diámetro polar del endocarpo; D <sub>4</sub> : diámetro ecuatorial del endocarpo. ....	47
Figura 7.	TPC en <i>C. limetta</i> y <i>C. reticulata</i> .....	55
Figura 8.	TFC en <i>C. limetta</i> y <i>C. reticulata</i> .....	56
Figura 9.	Contenido de hesperidina en <i>C. limetta</i> y <i>C. reticulata</i> .....	57
Figura 10.	Contenido de ácido ascórbico en <i>C. limetta</i> and <i>C. reticulata</i> . ....	58
Figura 11.	Efecto bactericida de <i>C. limetta</i> en <i>E. coli</i> .....	61
Figura 12.	Efecto bactericida de <i>C. limetta</i> en <i>S. aureus</i> .....	61
Figura 13.	Efecto bactericida de <i>C. reticulata</i> en <i>E. coli</i> . ....	62
Figura 14.	Efecto bactericida de <i>C. reticulata</i> en <i>S. aureus</i> . ....	63

### Índice de Tablas

Tabla 1.	Especies cítricas utilizadas en la investigación de flavonoides.....	11
Tabla 2.	Sustitución en la estructura general para los principales flavonoides cítricos .....	18
Tabla 3.	Solventes utilizados para la extracción de flavonoides en cítricos.....	21
Tabla 4.	TPC y TFC registrados en <i>C. limetta</i> y <i>C. reticulata</i> . ....	26
Tabla 5	Configuraciones del HPLC para flavonoides en cítricos. ....	29

---

Tabla 6. Flavonoides encontrados en jugos de especies cítricas, ordenados por su aparición en cromatografía líquida (Dugo, et al., 2005). .....	32
Tabla 7 Contenido de hesperidina, naringina y ácido ascórbico en <i>C. limetta</i> y <i>C. reticulata</i> .....	33
Tabla 8. Frutas utilizadas en éste estudio. ....	53
Tabla 9. Contenidos de TPC, TFC, hesperidina y ácido ascórbico.....	53
Tabla 10. MIC y MBC de los extractos, mg/mL .....	59
Tabla 11. Coeficientes de regresión para la inhibición de crecimiento bacteriano. ....	64

## II. JUSTIFICACIÓN

Los antimicrobianos tradicionales pueden afectar las propiedades organolépticas de los materiales a desinfectar.

De acuerdo con la normatividad mexicana (NOM-120-SSA1-1994), las buenas prácticas de higiene y sanidad que deben observarse en el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas, incluyen: Llevar a cabo una limpieza eficaz y regular de los establecimientos, equipos y vehículos para eliminar residuos de los productos y suciedades que contengan microorganismos. Después de este proceso de limpieza, se debe efectuar la desinfección, cuando sea necesario, para reducir el número de microorganismos que hayan quedado, a un nivel tal que no contaminen los productos.

Actualmente, el estado de Michoacán se encuentra entre los primeros lugares a nivel nacional en la producción de cítricos, lo que provoca que en el estado también se generen grandes cantidades de frutos que por diferentes motivos no se puede comercializar, derivando en un desperdicio, desde el punto de vista de ingeniería química, de los componentes presentes en éste tipo de productos primarios. De aquí es que surge la necesidad de generar aplicaciones alternativas a este material, que actualmente se considera como merma o desecho.

Asimismo, la investigación relacionada con la obtención de compuestos a partir de cítricos se centra principalmente en las especies más comunes, *C. aurantifolia*, *C. sinensis*, y *C. paradisi*, dejando de lado hasta el momento, el estudio de las especies de menor cultivo *C. limetta* y *C. reticulata*, las cuales también presentan compuestos con potencial efecto microbicida (Barreca, Bellocco, Caristi, Leuzzi, & Gattuso, 2011).

### **III. HIPÓTESIS**

Es posible obtener compuestos fenólicos y flavonoides con efecto microbiciida y antioxidante a partir de los cítricos *C. reticulata* y *C. limetta*, definiendo una metodología para la extracción de los compuestos de importancia microbiciida y antioxidantes obtenidos a partir de éstos cítricos, debido a la presencia de los compuestos fenólicos y flavonoides, y probando el posible efecto sinérgico de los compuestos encontrados en los cítricos de estudio.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Caracterizar los compuestos fenólicos y flavonoides extraídos de *C. reticulata* y *C. limetta* y evaluar su efecto microbicida y antioxidante.

### **4.2 Objetivos Particulares**

- Caracterizar morfológicamente los cítricos que serán sometidos a extracción.
- Establecer una metodología para obtener extractos cítricos de importancia microbicida y antioxidante.
- Caracterizar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en bagazo, semilla y jugo de las frutas cítricas a utilizar.
- Evaluar el efecto microbicida de los extractos in vitro.
- Evaluar el posible efecto antioxidante in vitro de los extractos.

## V. MARCO TEÓRICO

### 5.1 Cítricos

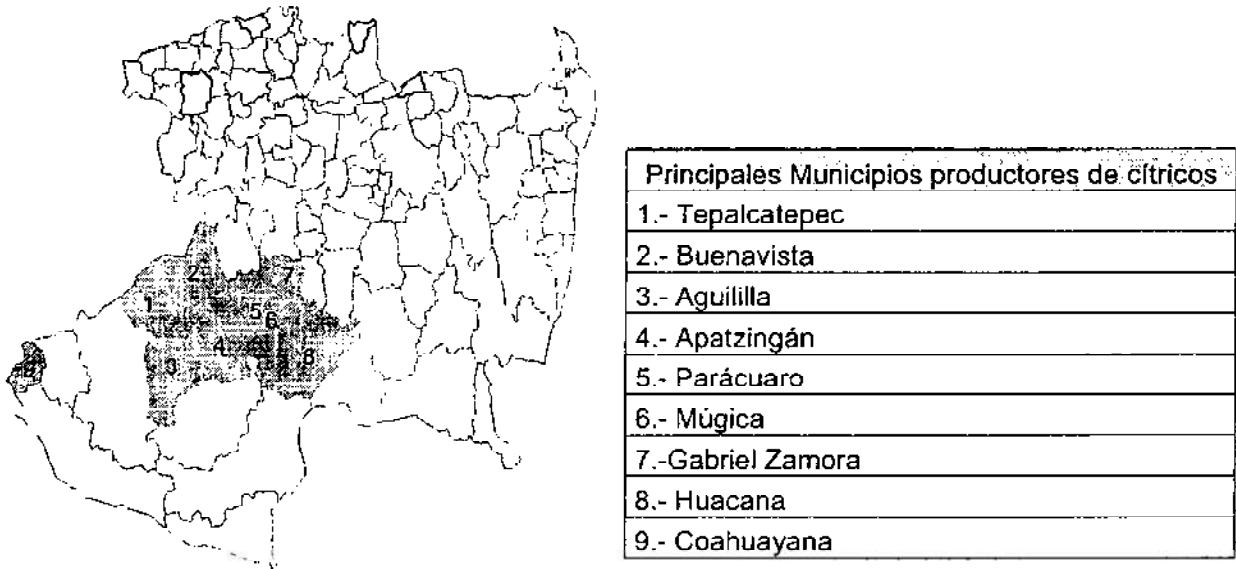
Los cítricos están representados por un grupo de especies vegetales, cuyos frutos se caracterizan por la presencia de ácido cítrico, málico y ascórbico (Kelebek, Selli, Canbas, & Cabaroglu, 2009) y forman un grupo de especies y variedades pertenecientes a un mismo género: *Citrus*. Este pertenece a la familia de las Rutáceas (Rutaceae). Estos frutos amargos y ácidos en su origen evolucionaron para dar lugar a las especies comestibles actuales: naranja, limón, toronja, mandarina, y otras. Los cítricos son originarios de climas tropicales y semitropicales, se desarrollan mejor en climas frescos y libre de heladas, las precipitaciones deben ser por lo menos de 1200 - 1550 mm distribuidas uniformemente durante el año o bien suplementadas mediante riego.

Actualmente, los cítricos son cultivados principalmente en longitudes entre 40 N y 40 S a través de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En éstas regiones, las temperaturas de invierno son adecuadas para la supervivencia de los árboles y existe suficiente agua y suelo adecuado para propiciar el crecimiento del árbol y la producción de fruta. Las principales áreas productoras de cítricos están localizadas en Sur y Norteamérica (principalmente Brasil, USA, México y Argentina), a lo largo de la costa del Mediterráneo (España, Italia, Egipto, Turquía y Marruecos), en el sur y este de Asia (China, India y Japón) y en Australia. Aparte de la importancia de los cítricos como una fuente rica vitamina C, fibra, y polifenoles benéficos para la salud humana, los cítricos tienen importancia cultural, social y económica debida al desarrollo de su industria de procesamiento y al beneficio derivado del comercio y exportación de la fruta fresca (Tadeo, et al., 2008).

Los cítricos son el cultivo más abundante de árboles frutales en el mundo, con una producción anual de aproximadamente 115.5 millones de toneladas, de las cuales las más importantes son naranjas (70.6 millones de toneladas), mandarinas (25.5 millones de toneladas), limones y limas (12.9 millones de toneladas) y toronja (6.4 millones de toneladas) (FAO, 2012). Estas frutas tienen un alto valor comercial tanto en el mercado de fruta fresca como en la industria de alimentos.

En el estado de Michoacán se ubican dos áreas productoras de cítricos; la principal en el valle de Apatzingán y la segunda en la Región Costa. La entidad cuenta con una

superficie plantada de 41,456.22 hectáreas de cítricos, de éstas 36,431.55 (88%) están sembradas con limón mexicano y 5,024.67 (12%) con cítricos dulces. La superficie de traspatio y silvestre se estima en 5,000 hectáreas; los principales municipios productores se indican en la Figura 1 (SENECICA, 2011).



**Figura 1. Principales municipios productores de cítricos en Michoacán.**

Actualmente, sólo 40,606.52 hectáreas se encuentran en cosecha del total de la superficie plantada en la entidad; el rendimiento en promedio es de 11.75 toneladas por hectárea, el rendimiento según la especie de cítrico va desde 4.75 (lima) hasta 14.21 toneladas por hectárea (toronja). Se cuenta con un volumen de producción anual de cítricos de 479,197.80 toneladas, con un valor promedio de \$1,236,224,060.00 pesos (\$2580 por tonelada aproximadamente) (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP, 2009). El destino de la producción cítrica en Michoacán es para consumo nacional y para exportación; el limón mexicano se exporta en un 2% a Estados Unidos y el resto de la producción es para consumo nacional, siendo los principales mercados las ciudades de México, Guadalajara, Toluca y Monterrey; mientras que la toronja se exporta a los países de Europa.

La industria del procesamiento de cítricos se ha centrado por varios años en la producción de jugos y aceites esenciales, se estima que el 33% de la cosecha mundial de

cítricos se utiliza en la producción de jugos. Las cáscaras representan entre un 50 y 60% del peso total de la fruta y se mantiene como el principal desecho resultando en una gran cantidad de cáscara como fuente de contaminación (Chinapongtitiwat, Jongaroontaprangsee, Chiewchan, & Devahastin, 2013; Mandalari, et al., 2007). Este residuo sólido, llamado residuo cítrico, se estima en 15 millones de toneladas por año en el mundo. Por ésta razón, el manejo adecuado de éste residuo representa un problema permanente para la industria de los cítricos. Para prevenir los serios problemas de contaminación de un producto secundario que aún tiene beneficios económicos potenciales, numerosos estudios han sido desarrollados en torno a la determinación de la composición química y conversión de los componentes identificados en productos útiles con valor agregado (Ledesma & Luque, 2014; Rojas, Perea, & Stashenko, 2009; Marín, Soler, Benavente, Castillo, & Pérez, 2007).

A pesar de que los cítricos son cultivados en todo el mundo, algunas especies se adaptan más fácilmente que otras, dependiendo de las condiciones climáticas, y su disponibilidad varía de un país a otro o incluso entre regiones del mismo país (Zhang, Nan, Wang, Jiang, & Li, 2014). Esto influye en la investigación de ciertas especies (Tabla 1), por lo que los principales países productores han realizado un estudio más amplio, explorando incluso algunas variedades silvestres autóctonas (Hamdan, et al., 2011). Esto ha propiciado que la investigación de flavonoides y compuestos fenólicos se haya realizado principalmente en naranja (*C. sinensis*), limón (*C. limon*), y toronja (*C. paradisi*).

**Tabla 1. Especies cítricas utilizadas en la investigación de flavonoides.**

Cítrico	País	Referencia	Cítrico	País	Referencia
<i>C. aurantifolia</i>	Italia	(Costa, et al., 2014)	<i>C. medica</i>	Italia	(Menichini, et al., 2011)
<i>C. aurantium</i>	Algeria	(Lagha & Madani, 2013)	<i>C. meyeri</i>	Mauricio	(Ramful, Bahorun, Bourdon, Tarnus, & Aruoma, 2010)
<i>C. bergamia</i>	Italia	(DiDonna, et al., 2011)	<i>C. microcarpa</i>	Singapur	(Cheong, et al., 2012)
<i>C. clementina</i>	China	(Xi, Zhang, Sun, Shen, & Zhou, 2014)	<i>C. mitis</i>	Taiwan	(Yu, Lou, Chiu, & Ho, 2013)
<i>C.</i>	Mauricio	(Ramful, Bahorun, Bourdon,	<i>C. myrtifolia</i>	Italia	(Protti, Valle, Poli, Raggi, &

---

<i>daoxianensis</i>		Tarnus, & Aruoma, 2010)			Mercolini, 2015)
<i>C. erythroa</i>	China	(Ye, et al., 2011)	<i>C. paradisi</i>	China	(Xi, Fang, Zhao, Jiao, & Zhou, 2014)
<i>C. grandis</i>	China	(Duan, Guo, Dou, Yu, & Li, 2014)	<i>C. poonensis</i>	China	(Xi, Zhang, Sun, Shen, & Zhou, 2014)
<i>C. jambhiri</i>	Egipto	(Hamdan, et al., 2011)	<i>C. reticulata</i>	China	(Xi, Zhang, Sun, Shen, & Zhou, 2014)
<i>C. junos</i>	Corea	(Yoo, Hwang, Park, & Moon, 2009)	<i>C. sinensis</i>	España	(Abad-García, et al., 2014)
<i>C. latifolia</i>	Colombia	(Londoño, et al., 2010)	<i>C. succosa</i>	China	(Ye, et al., 2011)
<i>C. limetta</i>	México	(Rodríguez, Lugo, Winterhalter, & Jerz, 2014)	<i>C. suavissima</i>	China	(Ye, et al., 2011)
<i>C. limon</i>	España	(Abad-García, et al., 2014)	<i>C. tardiferax</i>	China	(Ye, et al., 2011)
<i>C. maxima</i>	Mauricio	(Ramful, Bahorun, Bourdon, Tarnus, & Aruoma, 2010)	<i>C. unshiu</i>	China	(Xi, Zhang, Sun, Shen, & Zhou, 2014)

---

### 5.1.1 Mandarina (*Citrus reticulata*)

En el cultivo de Mandarina, la temperatura es el factor climático limitante que afecta el período comprendido entre la floración y la cosecha, la calidad del fruto y la adaptación de cada una de las variedades. La mandarina en regiones donde la humedad relativa es alta tiende a tener cáscara delgada y suave, mayor cantidad de jugo y de mejor calidad. La baja humedad favorece una mejor coloración de la fruta. El rango adecuado de humedad relativa puede considerarse entre 60 y 70 %. La Mandarina es de forma esférica más deprimida por los polos, de olor intenso, sabor agradable, con cáscara delgada y con gajos que se separan con facilidad. Tiene un valor nutritivo muy similar al de la naranja, pero es un fruto más frágil y más expuesto a sufrir daños durante la manipulación. La cosecha se efectúa en los meses que comprenden octubre, noviembre y diciembre siendo éstos la mejor época para rendimiento y calidad para el consumo en fresco. Sirve para realzar sabores de platillos de carne, pescado y marisco; para preparar bebidas frías y calientes; como base de pasteles y postres, y hasta para usos deodorizantes en el refrigerador y los utensilios de cocina. La cáscara seca de la mandarina se utiliza mucho en preparados de la comida china (SIAP, 2012).

### **5.1.2 Lima (*Citrus limetta*)**

La lima es la especie de los cítricos más sensible al frío, ya que es la más tropical y presenta floración casi continua, por lo que requiere para vegetar climas de tipo semitropical. En los climas tropicales, la lima crece y fructifica con normalidad, sin embargo, los frutos que produce no tienen buena calidad comercial, al ser demasiado gruesos y tener poca acidez. El fruto es pequeño, de forma entre oval y esférica, con corteza o exocarpo delgada, de color amarillo verdoso, mesocarpo blanco delgado y endocarpo carnoso, ácido, jugoso, de color entre amarillo y verde. El principal uso es el consumo en fresco, tanto para la elaboración casera de zumos y refrescos, como condimento para multitud de platos regionales. En los últimos años se ha incrementado el uso industrial para la obtención de zumos naturales y concentrados, aceite esencial, pulpas, etc. y la producción de ácido cítrico natural con destino a la confección de conservas naturales (SIAP, 2012).

## **5.2 Polifenoles, Flavonoides y Ácidos Orgánicos en Cítricos**

### **5.2.1 Localización, función y cambios con la maduración**

Los flavonoides son un grupo de polifenoles que se encuentran en frutas, vegetales, nueces, semillas, tallos y flores (Duan, Guo, Dou, Yu, & Li, 2014; Quirós, et al., 2014), así como en el té, vino, propóleo y miel, algunos de ellos son responsables de la coloración de las frutas (Gorinstein, et al., 1993). Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas (Lagha & Madani, 2013), apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por debajo de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercitina 4'-D-glucósidos. Su contenido puede variar también con las condiciones ambientales de desarrollo de la planta (Djoukeng, Arbona, Argamasilla, & Gomez, 2008; Hours, et al., 2005).

El vino tiene un alto contenido en compuestos polifenólicos, aproximadamente se conocen unos 500, la mayoría de los cuales provienen de la uva y del proceso fermentativo (Casassa & Harbertson, 2014). En la uva estas moléculas se localizan en la piel, especialmente en las células epidérmicas, y en las pepitas. Su cantidad y tipo depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo.

La cerveza también contiene importantes cantidades de flavonoides entre los que destacan los polihidroflavanos (catequina y epicatequina), los antocianógenos (leucocianidina o leucopelargonidina) y los flavonoles (grupo de quercitinas: kaempferol o mirecitina).

Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como ginkgo biloba, cardo mariano o crataegus, soya, rábano, brócoli, girasol (Pająk, Socha, Gałkowska, & Rożnowski, 2014). Desempeñan un papel importante en la biología vegetal; así, responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre (Harborne & Williams, 2000). Se han identificado más de 5.000 flavonoides, entre los que se pueden destacar:

1. Citroflavonoides: quercitina, hesperidina, rutina, naringina y limoneno. La quercitina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócolis, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos de las naranjas y limones. La naringina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.

2. Flavonoides de la soja o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soja tales como porotos, tofu, tempeh, leche, proteína vegetal texturizada, harina, miso. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeina.

3. Proantocianidinas se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.

4. Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.

5. Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.

6. Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.

7. Kaempferol: aparece en puerros, brócoles, rábano, endibias y remolacha roja.

Son utilizados como indicadores de la calidad de las especies cítricas y sus jugos (Lorente, et al., 2014; Euterpio, Pagano, Piccinelli, Rastrelli, & Crescenzi, 2013; Abad, et al., 2012; Rapisarda, Bellomo, Fabroni, & Russo, 2008; Alvarez, Jorrat, & Genta, 2005).

En un principio, fueron consideradas sustancias sin acción beneficiosa para la salud humana, pero más tarde se demostraron múltiples efectos positivos debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (Soto, Gutierrez, Losso, Xu, & Finley, 2012; Moreno, Belén, Sánchez, Vilorio, & García, 2004; Cano & Arnao, 2004), proponiendo así una alternativa para el desarrollo de aplicaciones en alimentos funcionales (Grace, et al., 2013; Pernice, et al., 2009; Fernández, et al., 2004), y en las industrias de pigmentos, cosméticos y farmacéuticas (Ochoa & Ayala, 2004).

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, conocidos por sus colores azul, rojo y morado (Winkel, 2001) y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, y las sustancias químicas presentes en los alimentos (González, Domínguez, Moreno, & García, 2010; Yoo, Hwang, Park, & Moon, 2009). En la fruta, se concentran principalmente en la cáscara y después en la pulpa (Codoñer & Valls, 2010; Gorinstein, et al., 2001).

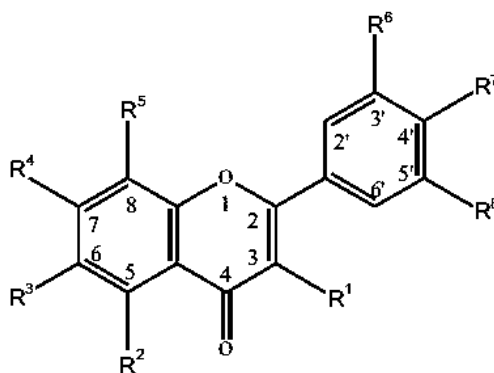
Estos compuestos fueron descubiertos en 1930, al ser aislada de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C<sub>2</sub> (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950.

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos (Franke, Cooney, Henning, & Custer, 2005; Forkmann & Martens, 2001). Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (Gil, et al., 2013; Scordino, Sabatino, Belligno, & Gagliano, 2011; Erlund, 2004).

Aunque diversos estudios indican que algunos flavonoides poseen acciones prooxidantes, éstas se producen sólo a dosis altas, constatándose en la mayor parte de las investigaciones la existencia de efectos antiinflamatorios (Menichini, et al., 2011; Amaro, et al., 2009), cicatrizantes (Neves, Chinali, & Sala, 2010; Yilmaz, Tacyildiz, Keles, Gedik, & Kilinc, 2005), antivirales o antialérgicos, y su papel protector frente a enfermedades cardiovasculares (DiDonna, et al., 2011; Benavente & Castillo, 2008), obesidad (Jung,

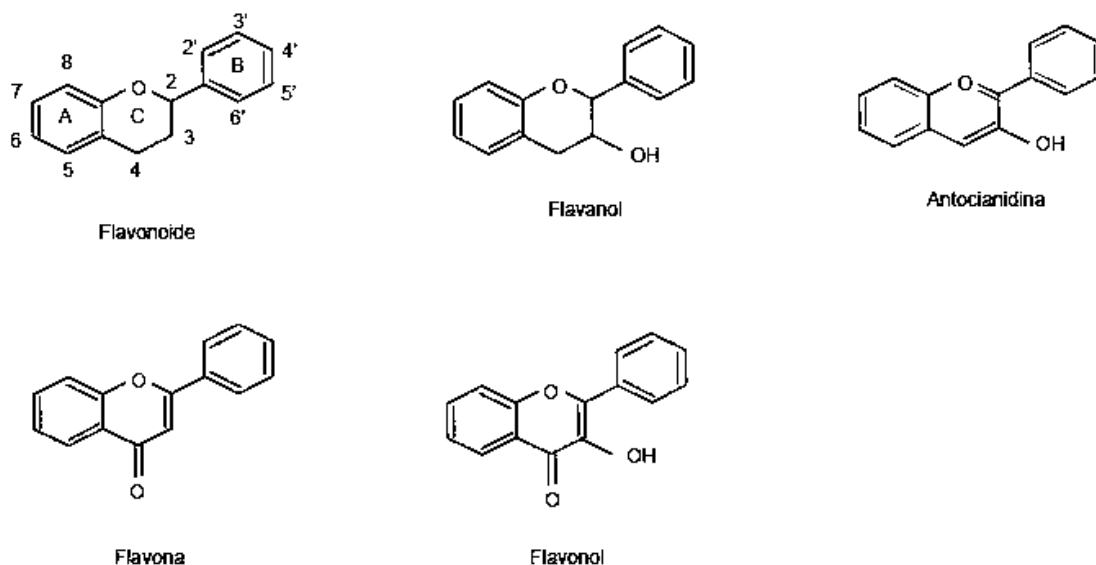
Jeong, Park, Park, & Hong, 2011), diabetes (Menichini, et al., 2011), cáncer (Karimi, Oskoueian, Hendra, Armin Oskoueian, & Jaafar, 2012; Natarajan, Thamaraiselvan, Lingaiah, Srinivasan, & Periyasamy, 2011; Patil, Murthy, Jayaprakasha, Chetti, & Patil, 2009) y diversas patologías (Zang, Shimada, Kawajiri, Tanaka, & Nishimura, 2014; Mäkynen, et al., 2013; Srinivasan & Pari, 2013; Kim, et al., 2013; Ramirez, Mendoza, Arreola, & Ordaz, 2010). Debido a la amplia variedad de actividades farmacológicas en los organismos mamíferos, los flavonoides pueden clasificarse como nutraceuticos (Tapas, Sakarkar, & Kakde, 2008).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos ( $C_6 - C_3 - C_6$ ), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Figura 2).



**Figura 2. Estructura General de los flavonoides.**

Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C (Figura 3).



**Figura 3. Clasificación estructural de los flavonoides.**

En función de sus características estructurales (Sandhar, et al., 2011) se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo-OH en posición 3 del anillo C.
2. Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo-OH en posición 3 del anillo C.
3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

A los flavonoles y las flavonas se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos (Roowi & Crozier, 2011), siendo la D-glucosa el residuo de azúcar más frecuente. Otros residuos de azúcares son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa, así como el ácido D-glucurónico. La parte sin azúcares de la molécula flavonoide se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su aglicona o flavonoide respectivo. Las propiedades ácido-base muestran que los radicales flavonoides son neutros en un medio y con una carga negativa a pH 7.

Siendo especialmente abundante en las frutas, existe un grupo de flavonoides, cómo la hesperidina y naringina (Costa, et al., 2014), que pueden ser encontrados casi en todas los frutos cítricos, los cuales forman el grupo de los flavonoides cítricos (Tabla 2). Su concentración es más alta en la cascara que en el jugo y son responsables de la coloración de la fruta.

**Tabla 2. Sustitución en la estructura general para los principales flavonoides cítricos**

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	R <sup>8</sup>
<b>Flavanonas</b>								
Hesperidina	H	OH	H	O-rut	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Naringina	H	OH	H	O-nh	H	H	OH	H
Neohesperidina	H	OH	H	O-nh	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Narirutina	H	OH	H	O-rut	H	H	OH	H
<b>Flavonas</b>								
Hesperetina	H	OH	H	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>	H
Naringenina	H	OH	H	OH	H	H	OH	H
<b>Flavonas Agliconas</b>								
Luteolina	H	OH	H	OH	H	OH	OH	H
<b>Polimetoxiflavonas</b>								
Nobiletina	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
Tangeretina	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H

*rut: rutinosa; nh: neohesperidosa.*

Más de 60 diferentes flavonoides han sido identificados en los cítricos (Gattuso, Barreca, Gargiulli, Leuzzi, & Caristi, 2007), siendo la hesperidina el flavonoide principal en la mayoría de los cítricos. Se puede encontrar sinasetina, nobiletina, tangeretina, hesperidina y narirutina en *C. sinensis*, (Ye, et al., 2011; Ramful, Tamus, Aruoma, Bourdon, & Bahorun, 2011); la naringina, neoeriocitrina y eriocitrina en *C. aurantium*

(Tadeo, et al., 2008), *C. grandis* y *C. paradisi*, (Zhang, Duan, Zang, Huang, & Liu, 2011); quercitina y diosmina en *C. limon* (Wang, Chuang, & Ku, 2007); hesperidina y narirutina también se encuentran en *C. reticulata*, (Ye, et al., 2011); neohesperidina en *C. paradisi* y nobiletina y tengeretina en varios cítricos (Sun, et al., 2013).

Al madurar los cítricos se eleva su contenido de agua en la pulpa (85-90%) y varios constituyentes, incluyendo los carbohidratos, ácidos orgánicos, vitamina C, minerales y pequeñas cantidades de lípidos, proteínas y metabolitos secundarios como carotenoides, flavonoides y volátiles. Los sólidos solubles totales comprenden del 10-20% del peso fresco de la fruta, y consisten principalmente de carbohidratos (70-80%) y menos cantidades de los demás constituyentes. Durante la maduración se presenta un descenso de la acidez titulable (TA) principalmente debido al catabolismo del ácido cítrico y un incremento de azúcares, expresados como sólidos solubles totales (TSS). La relación TSS entre TA es conocida comúnmente como índice de madurez (IM) (Ibrahim, 2005).

Los ácidos orgánicos contribuyen significativamente a la calidad de los cítricos. El ácido cítrico es el principal constituyente, aunque también contienen malato (9-15%) y cantidades menores de succinato e isocitrato (Bartholomew & Sinclair, 1943). Durante la maduración, el citrato es metabolizado a glutamato, lo que explica la disminución del citrato y de la acidez citoplásmica durante el desarrollo y maduración de la fruta (Tadeo, et al., 2008).

La maduración también incrementa el contenido de carotenoides (hasta  $2.04 \pm 0.036$  mg/g DW) (Yoo & Moon, 2016) y de pectina de  $36.0 \pm 1.46$  a  $86.4 \pm 3.36$  mg/g DW. (Wang, Chuang, & Hsu, 2008).

### **5.3 Obtención y Purificación de Extractos Cítricos**

Las frutas cítricas que han sido estudiadas para la obtención de extractos se cosechan principalmente a finales de la temporada de invierno o a principios de primavera (Sandoval-Montemayor et al., 2012; Barreca et al., 2011a), aproximadamente 2 meses después de la temporada de floración (Barreca et al., 2011a; Chen et al., 2011; Yoo et al., 2009).

A pesar de que la mayoría de los compuestos se encuentran principalmente en la cáscara, también se han hecho estudios para obtener extractos ricos en flavonoides y

fenoles a partir del jugo y las semillas (Kelebek, 2010). Éstas partes pueden ser separados de la fruta ya sea a mano (Barreca et al., 2011b) o utilizando extractores comerciales (Alvarez et al., 2005).

La materia prima puede utilizarse fresca o deshidratada (Ye et al., 2011); al utilizar materiales frescos se puede genera una fase acuosa en el extracto, que en ocasiones necesitará de una separación posterior, cómo decantación o centrifugación.

El secado del material puede hacerse mediante liofilización o por secado en horno, siendo éste último el más utilizado. La liofilización permite conservar los flavonoides glicosados, mientras que el secado en horno favorece la formación de flavonoides aglicones probablemente como resultado de la degradación de las formas glicosadas debido a la temperatura de secado (de 50 a 100°C) (Chen et al., 2011). Así, el método de secado se puede elegir en función del tipo de compuesto que se quiere obtener en el extracto (Molina-Calle et al., 2015).

También se utiliza el secado por radiación infrarroja (IR), el cual presenta ventajas cómo una tasa de secado más rápida, un ahorro en energía, una distribución más uniforme de la temperatura y una mejor calidad de los productos deshidratados que los métodos convencionales. El secado IR, a temperaturas altas durante periodos cortos, puede preservar mejor el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides (Kammoun et al., 2011).

Los métodos para la extracción de los compuestos presentes en cítricos y plantas en general son variados y su uso puede depender de la naturaleza de las especies utilizadas y los compuestos a separar. La elección del método apropiado es muy importante para obtener mayor cantidad de compuestos con las características deseadas.

La maceración simple, que utiliza un solvente para extraer los compuestos por difusión desde la matriz (Yoo et al., 2009), es el principal método para la obtención de extractos a partir de cítricos. Cuando se utiliza material deshidratado, la maceración permite que las células se expandan de nuevo hacia su forma y tamaño original, facilitando la transferencia de los componentes a través de los tejidos de la fruta hacia el solvente (Molina-Calle et al., 2015). También se ha utilizado el calentamiento del material con microondas durante la maceración, lo que libera algunos compuestos fenólicos y flavonoides, dependiendo de la intensidad y tiempo del tratamiento (Hayat et al., 2010). Después de realizar un filtrado, la fase obtenida con el solvente orgánico estará enriquecida

de los compuestos que sean afines al solvente. Esta mezcla debe ponerse a ebullición para separar el solvente de los compuestos obtenidos. La filtración y centrifugación se utiliza para la obtención de extractos a partir de los jugos de cítricos (Rapisarda et al., 2003).

El rendimiento y la eficiencia del transporte de los compuestos desde la matriz sólida hacia el solvente durante la extracción están influenciados por parámetros tales como tamaño de partícula, temperatura y tiempo de extracción, relación de solvente y material, número de etapas de extracción y tipo de solvente (Makovsek et al., 2012; Tham and Liew, 2014).

La materia prima debe molerse finamente para, de esta forma, facilitar la extracción de los compuestos, los cuales se pueden extraer debido a la solubilidad que presentan en diferentes solventes orgánicos como: etanol, metanol, butanol, acetona, acetato de etilo (Mokbel & Hashinaga, 2006).

La temperatura del proceso de extracción, tiene influencia sobre la difusión, la viscosidad del extractante, la transferencia de masa dentro de las partículas de material, la transferencia de masa hacia la fase del solvente, la solubilidad y la relación de compuestos extraídos presentes en el extracto (Myasnikov et al., 2010).

Para la extracción, es necesario utilizar solventes afines a los compuestos fenólicos y flavonoides a separar, utilizándose principalmente metanol, etanol (Mandalari et al., 2006) y hexano (Sandoval-Montemayor et al., 2012), los cuales demuestran un buen desempeño en la extracción de los compuestos. La variedad de solventes utilizados para la extracción es muy amplia, siendo el metanol el más frecuentemente utilizado (Tabla 3).

**Tabla 3. Solventes utilizados para la extracción de flavonoides en cítricos.**

Cítrico	Técnica	Solvente	Referencias
<i>C. aurantifolia</i>			
Jugo	Centrifugado, filtrado y evaporado	EASSE	(Costa et al., 2014)
Cáscara	Liofilizado, disuelto en agua	Agua	(Guimarães et al., 2010)
	Liofilizado, macerado y filtrado	MOH	(Guimarães et al., 2010)
	Macerado, filtrado y evaporado	MWC	(Guimarães et al., 2010)
Pulpa	Maceración	MWH	(Loizzo et al., 2012)
	Macerado, filtrado y evaporado	MWC	(Brito et al., 2014)
<i>C. aurantium</i>			
Jugo	Centrifugado y filtrado	DMF	(Barreca et al., 2011c)
Cáscara	Macerado, centrifugado y filtrado	MAW	(Lagha-Benamrouche and Madani, 2013)

Semilla	Macerado, filtrado y evaporado	MOH	(Moulehi et al., 2012)
Entera	Secado, UB30, centrifugado	MDS	(Sun et al., 2013)
<i>C. limetta</i>			
Jugo	Centrifugado y filtrado	DMF	(Barreca et al., 2011a)
Cáscara	Macerado, filtrado y evaporado	MOH	(Rodríguez-Rivera et al., 2014)
<i>C. limon</i>			
Jugo	Liofilizado, centrifugado y filtrado	MWA	(Abad-García et al., 2014)
	Liofilizado, disuelto en agua	Agua	(Guimarães et al., 2010)
Cáscara	Liofilizado, macerado y filtrado	MOH	(Guimarães et al., 2010)
	Macerado, filtrado y evaporado	MWC	(Brito et al., 2014)
Pulpa	Macerado, filtrado y evaporado	MWC	(Brito et al., 2014)
Entera	Secado, UB30, centrifugado	MDS	(Sun et al., 2013)
<i>C. paradisi</i>			
Jugo	Centrifugado y filtrado	Ninguno	(Kelebek, 2010)
	Liofilizado, centrifugado y filtrado	MWA	(Abad-García et al., 2014)
	Liofilizado, disuelto en agua	Agua	(Guimarães et al., 2010)
	Macerado, disuelto	EAM	(Zhang et al., 2011)
Cáscara	Secado, UB30, centrifugado	MOH	(Xi et al., 2014a)
	Liofilizado, macerado y filtrado	MOH	(Guimarães et al., 2010)
Pulpa	Secado, UB30, centrifugado	MOH	(Xi et al., 2014a)
	Macerado, centrifugado, disuelto	MOH	(Zhang et al., 2014)
Entera	Secado, UB30, centrifugado	MDS	(Sun et al., 2013)
<i>C. reticulata</i>			
Jugo	Centrifugado y filtrado	DMF	(Barreca et al., 2013)
	Filtrado	Ninguno	(Kelebek and Selli, 2014)
	Liofilizado, centrifugado y filtrado	MWA	(Abad-García et al., 2014)
Cáscara	Macerado, filtrado y evaporado	WEA	(Makovsek et al., 2012)
	Secado, UB30, centrifugado	MOH	(Xi et al., 2014b)
	Secado, UB30, filtrado	Agua	(Londoño-Londoño et al., 2010)
	Liofilizado, macerado, centrifugado	MOH	(Zhang et al., 2012)
Pulpa	Secado, UB30, centrifugado	MOH	(Xi et al., 2014b)
	Liofilizado, macerado, centrifugado	MOH	(Ramful et al., 2011)
Semilla	Macerado, filtrado y evaporado	MOH	(Moulehi et al., 2012)
<i>C. sinensis</i>			
Jugo	Centrifugado y filtrado	DMF	(Barreca et al., 2014)
	Filtrado y diluido	Agua	(Andreu-Navarro et al., 2010)
	Liofilizado, centrifugado y filtrado	MWA	(Abad-García et al., 2014)
	Liofilizado, disuelto en agua	Agua	(Guimarães et al., 2010)
	Liofilizado, macerado, centrifugado	EAA	(Pan et al., 2014)
		MOH	(Ramful et al., 2011)
	Macerado, filtrado	MDS	(Chen et al., 2011)
	Secado, UB30	Agua	(Londoño-Londoño et al., 2010)
	Liofilizado, macerado y filtrado	MOH	(Guimarães et al., 2010)
	Macerado, centrifugado y filtrado	MAW	(Lagha-Benamrouche and Madani, 2013)
Entera	Secado, UB30, centrifugado	MDS	(Sun et al., 2013)

**DCF:** Diluido, centrifugado y filtrado; **DMSO:** Dimetilsulfóxido; **DMF:** N,N-dimetilformamida; **EAA:** Etanol y acetato de amonio; **EAM:** Etil acetato y metanol; **EASSE:** Etil acetato, sulfato de sodio y etanol; **EAW:** Etil acetato y agua; **EOH:** Etanol; **MAW:** Metanol, acetona y agua; **MDS:** Metanol y dimetilsulfóxido; **MFA:**

Metanol y ácido fórmico; **MOH**: Metanol; **MWE**: Extracción asistida por microondas; **MWA**: Metanol, agua y ácido acético; **MWC**: Metanol, agua y HCl; **MWH**: Metanol, agua y n-hexano; **MWPCE**: Metanol, agua, petróleo, cloroformo y acetato de etilo; **PMWD**: Petróleo, metanol, agua y diclorometano; **UB30**: Baño ultrasónico por 30 minutos; **WEA**: Agua, etanol y acetona.

El uso de fluidos supercríticos para la extracción de flavonoides es uno de los métodos más avanzados en el área. Se utiliza en particular para aquellos compuestos que tienen baja volatilidad o son susceptibles a la degradación térmica (Díaz, Moure, Domínguez, & Parajó, 2006). El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molidos, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un fluido en estado supercrítico (como el CO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> y R134a (Chiu, Cheng, Chen, Chang, & Yang, 2002), así las esencias son volatilizadas y arrastradas por el fluido supercríticos, que actúa como solvente extractor, se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y la temperatura ambiente y finalmente se obtiene una esencia cuyo grado de pureza depende de las condiciones de extracción. Éste método presenta varias ventajas como alto rendimiento; ecológicamente compatible, pues el solvente se elimina con facilidad e inclusive se recicla; y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes del extracto; sin embargo, el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a altas presiones y a los ácidos (Omar, Alonso, Garaikoetxea, & Etxebarria, 2013). También han sido evaluadas la purificación con fluido presurizado (PFE) y por sonorización, en las que influyen el uso de diferentes solventes, la temperatura a la que se realiza la extracción, así como el pH [Putzbach *et al.*, 2007]. Utilizando metanol como solvente, ofrece una alta recuperación con excelente reproducibilidad (Molnár & Füzfai, 2004).

Debido a que las técnicas de extracción en general tienen una selectividad muy baja, las mezclas obtenidas de la extracción son bastante complejas, y pueden contener compuestos de diferentes tejidos en la fruta. Es necesario realizar una purificación posterior de los extractos con el fin de separar y obtener concentraciones más altas de algunos compuestos. Ésta operación puede ofrecer oportunidades de negocios e incentivos económicos y ambientales a las industrias, si se utilizan tecnologías simples, selectivas, eficientes y ecológicamente amigables (Soto, Moure, Domínguez, & Parajo, 2011). Algunos de los métodos para llevar a cabo la purificación son por adsorción, por

cromatografía en columna, cromatografía a contracorriente de alta velocidad, centrifugación, mediante el uso de micelas y mediante destilación por arrastre de vapor, entre otros.

La purificación por medio de adsorción es versátil, simple y de bajo costo, lo que la hace atractiva para la recuperación selectiva de una variedad de polifenoles y compuestos fenólicos. Se basa en la afinidad de los compuestos presentes en la solución mediante un sustrato sólido, del cual pueden ser separados posteriormente con relativa facilidad. Para éste método, es necesario caracterizar las interacciones detalladas entre las resinas y los compuestos de estudio (Soto, Moure, Dominguez, & Parajo, 2011). Algunos polímeros utilizados son sintetizados a partir de la copolimerización de metilacrilato (MA) y etilen glicol dimetacrilato (EGDMA, por sus siglas en inglés). Éste tipo de materiales crea una interacción por puente de hidrógeno y favorece la selectividad hacia los flavonoides (Geng, et al., 2009). La purificación por adsorción permite también la separación de compuestos específicos a partir de una solución diluida. Comparado con otras tecnologías, la adsorción es más atractiva debido a su relativa simplicidad en el diseño, operación y escalamiento, a su alta selectividad, y a que el costo del sustrato es bajo y su regeneración sencilla. Adicionalmente, La purificación por medio de adsorción evita el uso de solventes tóxicos y minimiza la degradación de algunos de los compuestos a separar (Soto, Moure, Dominguez, & Parajo, 2011).

La purificación de los compuestos se puede realizar por medio de la cromatografía en columna, permitiendo obtener mezclas con un alto porcentaje de un solo compuesto (Levaj, Dragovic, Bursac, & Krasnici, 2009). Éste método separa efectivamente las diferentes clases de flavonoides en porciones ultrafiltradas, incluyendo flavonas polimetoxiladas, flavanonas-O-trisacaridas, flavanonas y flavanonas-O-disacaridas, y, finalmente, flavonas-C-glicosadas. En combinación con la adsorción puede facilitar aún más la selectividad en compuestos fenólicos y flavonoides de estructura específica (Manthey, 2004). Aún así, existe poca información para los procesos de purificación de los flavonoides contenidos en las frutas cítricas; se ha purificado hesperidina, naringina, y narirutina con una columna Zorbax C18 y una fase móvil de ácido cítrico y acetato de amonio en agua y metanol 60:40 (Levaj, Dragovic, Bursac, & Krasnici, 2009). También se utilizan fases móviles de gradientes lineales de acetonitrilo en agua. Las fracciones se

pueden reunir, secarse en un rotavapor y redisolverse para reproducir la concentración en la materia prima (Barreca, Bellocco, Caristi, Leuzzi, & Gattuso, 2011).

Uno de los métodos para la purificación de extractos es la cromatografía a contracorriente de alta velocidad (HSCCC, por sus siglas en inglés), basada en la partición continua líquido-líquido utilizando sistemas de solventes en dos fases, fluyendo simultáneamente en direcciones opuestas; éste método presenta también el aspecto importante de eliminar la adsorción irreversible al usar un soporte líquido, y es utilizado ampliamente en los campos de medicina tradicional, bioquímica, alimentos, química de los productos naturales, análisis ambiental y demás. Más aún, algunos compuestos pueden ser obtenidos en un solo paso desde el extracto crudo sin necesidad de un tratamiento previo a la muestra (Duo-Long, Yuan-Yuan, Xiao-Fen, Xin-Yi, & Shi-Lan, 2011). Presenta alta eficiencia, alta recuperación y la posibilidad de poder usarla en una amplia gama de compuestos. En años recientes, se ha aplicado ampliamente en la separación y purificación de flavonoides y compuestos fenólicos de plantas (Duo-Long, Yuan-Yuan, Xiao-Fen, Xin-Yi, & Shi-Lan, 2011).

Se ha utilizado la centrifugación de dos fases inmiscibles, una de ellas siendo más afín a los compuestos a separar, evitando la pérdida de muestra o la absorción irreversible de la muestra en la columna de separación (Jeon & Kim, 2013). Otro método propuesto ha sido el uso de surfactantes, formando micelas que puedan seleccionar a los polifenoles, tomando en cuenta que los polifenoles tienen una variada estructura molecular con un amplio rango de polaridades, ofreciendo una mejora en la separación de compuestos fenólicos y antioxidantes (Sharma, Kori, & Parmar, 2015).

La destilación por arrastre de vapor también es utilizada para separar algunos compuestos. Se trata de un proceso que consiste en un dispositivo en el cual la materia prima se encuentra sostenida por un rejilla encima del agua hirviendo en la parte inferior del destilador; el vapor resultante es enfriado para recuperar los componentes arrastrados por medio de la condensación. El objetivo principal de este método es separar una mezcla de varios componentes, aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles. Los compuestos que quedan en el destilador son compuestos no volátiles que por lo general son responsables del sabor más que del olor. Algunas sustancias muy volátiles se pierden en ésta destilación. Además el proceso puede

inducir cambios químicos, como la oxidación o hidrólisis (Jiang, Yang, Zhu, Piao, & Jiang, 2011).

Una vez que los compuestos se encuentran en la fase del solvente, se pueden obtener como extracto puro, a fin de poder utilizarlos en las aplicaciones deseadas, y facilitar su almacenamiento, manipulación, transporte, durabilidad y versatilidad. Una de las técnicas utilizadas para el separación del solvente y del extracto puro es el secado por aspersión, en el que se pueden utilizar aditivos inertes (almidón, maltodextrina, celulosa) que coadyuvan al secado y evitan la pérdida durante el proceso de compuestos de bajo peso molecular, ocasionada por la adhesión a las superficies internas del equipo, lo que traería como consecuencia baja recuperación de producto (Lopez, Menendez, Garcia, Gonzalez, & Nogueira, 2011).

#### 5.4 Caracterización de Extractos Cítricos

Una vez que se ha obtenido el extracto, es importante caracterizarlo, con el fin de comprobar que los compuestos fueron separados como se esperaba. Algunos métodos colorimétricos nos dan información acerca del contenido de un grupo de compuestos con estructura similar. El método colorimétrico de Folin-Ciocalteu utiliza la formación de un complejo azul al reaccionar los compuestos fenólicos con el reactivo fosfomolibdénico – fosfotugsténico a un pH elevado. A pesar de que no se trata de un método específico, se aplica frecuentemente en la medición de fenoles totales en ensayos bioquímicos, animales y clínicos (Ikawa, Schaper, Dollard, & Sasner, 2003). El contenido de fenoles totales en jugos varían entre las diferentes especies cítricas entre 106.22 a 784.67 mg equivalentes de ácido gálico (GAE) L<sup>-1</sup>. (Tounsi, et al., 2010). Otra determinación ampliamente utilizada es el contenido de flavonoides totales mediante la reacción con cloruro de aluminio, formando un complejo de color amarillo (Andreu, Fernández, & Gómez, 2010). El contenido de flavonoides totales en jugos cítricos varía entre las diferentes especies cítricas entre 34.68 a 85.33 mg equivalentes de catequina (EC) L<sup>-1</sup> (Tabla 4).

**Tabla 4. TPC y TFC registrados en *C. limetta* y *C. reticulata*.**

IM	TPC	TFC	Referencia
<i>Citrus limetta</i>			

Jugo	N.I.	$364 \pm 1.0 \text{ mg L}^{-1}$	N.I.	(Sharma, Kori, & Parmar, 2015)
<i>Citrus reticulata</i>				
Jugo	$11.9 \pm 0.01$	$750.3 \pm 3.36$ GAE, $\text{mg L}^{-1}$	N.I.	(Kelebek, Selli, Canbas, & Cabaroglu, 2009)
	$14.5 \pm 0.01$	$426.1 \pm 4.74$ GAE, $\text{mg L}^{-1}$	N.I.	
	$12.5 \pm 0.0$	$486.3 \pm 7.71$ GAE , $\text{mg L}^{-1}$	N.I.	
Cáscara	N.I.	N.I.	$8.04 \pm 0.065 -$ $11.56 \pm 0.091$ $\text{mg g}^{-1}$ FW $28.1 \pm 0.43 -$ $31.07 \pm 0.44 \text{ mg}$ $\text{g}^{-1}$ DW	(Levaj, Dragovic, Bursac, & Krasnici, 2009)
	N.I.	$58.68 \pm 4.01 \text{ mg}$ GAE $\text{g}^{-1}$ DW	N.I.	(Londoño, et al., 2010)
	N.I.	$29.38 - 51.14$ $\text{mg GAE g}^{-1}$ DW	$7.95 - 20.66$ $\text{mg g}^{-1}$ DW	(Zhang, et al., 2014)
Pulpa	N.I.	N.I.	$1.65 \pm 0.0293 -$ $1.64 \pm 0.0166$ $\text{mg (100 g)}^{-1}$ FW $12.63 \pm 0.18 -$ $12.6 \pm 0.18 \text{ mg}$ $\text{g}^{-1}$ DW	(Levaj, Dragovic, Bursac, & Krasnici, 2009)
	$11.79 -$ $21.25$	$500 - 800$ $\mu\text{g/g}$ FW	$270 - 630 \mu\text{g}$ $\text{g}^{-1}$ FW	(Ramful, Tamus, Aruoma, Bourdon, & Bahorun, 2011)
	N.I.	$17 - 23 \text{ mg}$ GAE $\text{g}^{-1}$ DW	$1.8 - 2.4 \text{ mg}$ CE $\text{g}^{-1}$ DW	(Xi, Zhang, Sun, Shen, & Zhou, 2014)
Semilla	Inmadura	$41.39$ $\pm$ $2.45 \text{ mg GAE g}^{-1}$ DW	$29.26$ $\pm$ $1.05 \text{ mg CE g}^{-1}$ DW	(Moulehi, Bourgou, Ourghemmi, & Tounsi, 2012)
	Semimadura	$25.32$ $\pm$ $0.33 \text{ mg GAE g}^{-1}$ DW	$36.21$ $\pm$ $1.52 \text{ mg CE g}^{-1}$ DW	
	Madurez comercial	$71.39$ $\pm$	$6.69$ $\pm$	

---

$$\frac{2.73 \text{ mg GAE g}^{-1}}{\text{DW}} \quad \frac{0.05 \text{ mg CE g}^{-1}}{\text{DW}}$$

---

IM: índice de madurez; CE: equivalente de catequina; DW: peso seco; FW: peso fresco; GAE: equivalentes de ácido gálico; N.I.: No indicado.

Los métodos más modernos permiten una identificación y cuantificación simultánea de varios compuestos fenólicos y flavonoides presentes en extractos de origen vegetal. Para cada método es importante conocer la polaridad de los compuestos que se quieren analizar, con el fin de seleccionar el soporte y los solventes adecuados.

El principal método para la caracterización de los extractos obtenidos a partir de cítricos y otras plantas, ha sido la cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), siendo necesaria la operación del cromatógrafo a diferentes condiciones, dependiendo de las especies a analizar y usando una amplia variedad de métodos de detección. (Duan, Guo, Liu, Liu, & Li, 2014). Las propiedades de fluorescencia de los compuestos fenólicos y flavonoides también han sido utilizadas para su detección en HPLC (Andreu, Fernández, & Gómez, 2010). El uso de HPLC permite la identificación y cuantificación simultánea de varios compuestos fenólicos y flavonoides (Barreca, Bellocco, Caristi, Leuzzi, & Gattuso, 2011). HPLC combinado con detección ultravioleta (UV) y espectrometría de masas (MS) (Krüger & Ganzera, 2012) con ionización de electrospray (ESI) (Brito, Ramirez, Areche, Sepulveda, & Simirgiotis, 2014; Zhang, et al., 2012) y/o doble espectrómetro de masas (MS/MS) (Tong, et al., 2012) es la técnica más útil disponible actualmente para identificar las clases y estructuras de los polifenoles presentes en los alimentos (DiDonna, et al., 2013; Kelebek, Canbas, & Selli, 2008; Prasain, Wang, & Barnes, 2004). Las diferencias en el espectro de luz UV, detectadas con un arreglo de diodos (DAD) o fotodiodos (PAD), son importantes para determinar qué longitud de onda debe monitorearse en la identificación y cuantificación por HPLC (Markham & Mabry, 1968; He, et al., 2011). Generalmente se utilizan longitudes de onda de 280 a 400 nm, que es el rango en el que los principales flavonoides presentan una mayor absorbancia de la radiación (Mata, Andrés, Jáuregui, & Lamuela, 2007). La cromatografía HPLC acoplada a espectrometría de masas con electrospray de ionización a presión atmosférica (Pan, Li, Deng, & Xiao, 2014) también ha permitido determinar alcaloides (sinefrina, octopamina, n-metiltiramina, tiramina y hordenina) en cítricos. Comúnmente se utilizan columnas C18, con flujo de alrededor de 1

mL min<sup>-1</sup> y gradientes de la composición de la fase móvil, operando a temperatura ambiente para la identificación de compuestos fenólicos y flavonoides (Ribeiro & Ribeiro, 2008). La Tabla 5 muestra algunas otras configuraciones utilizadas en determinaciones por HPLC. Las diferencias en la orientación de los grupos –OH resultan en diferentes afinidades de los isómeros por la fase estacionaria y por lo tanto la separación de los diferentes compuestos presentes en la muestra. Una buena caracterización de las muestras puede lograrse determinando la relación entre la retención de los compuestos presentes en la muestra y la composición de la fase móvil (Stobiecki, 2000).

**Tabla 5 Configuraciones del HPLC para flavonoides en cítricos.**

Especie	Columna	Fase móvil	Detector	Flavonoides	Referencia
<i>C. aurantium</i>					
Jugo	Discovery C <sub>18</sub> 250x4.6 mm	CH <sub>3</sub> CN / H <sub>2</sub> O 0-100%	HPLCMS	Nr, Ni, Nh	(Barreca, Bellocco, Caristi, Leuzzi, & Gattuso, 2011)
Semilla	Hypersil ODS C18 250x4.6 mm	(A) CH <sub>3</sub> CN, (B) 0.2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O.	UV-Vis, 280 nm	Ni, Hd, Nh	(Moulehi, Bourgo, Ourghemmi, & Tounsi, 2012)
Entera	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH (v/v)	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Ni, Hd, Nb, Tg	(Sun, et al., 2013)
<i>C. limetta</i>					
Jugo	Diamonsil C <sub>18</sub>	MeOH : CH <sub>3</sub> CN:PBS (10:40:39, v/v)	UV-Vis, 210 nm	Hd	(Barreca, Bellocco, Caristi, Leuzzi, & Gattuso, 2011)
Cáscara	ProntoSIL C18Aq 250x2.00 mm	(A) H <sub>2</sub> O, (B) CH <sub>3</sub> CN	HPLCMS	Hd	(Rodriguez, Lugo, Winterhalter, & Jerz, 2014)
<i>C. limon</i>					
Jugo	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH – H <sub>2</sub> O (0.5:99.5, v/v), (B)	UV-DAD, 280 – 370 nm	Ht, Ne	(Abad-García, et al., 2014)

Cáscara y Pulpa	Purospher star-C18 250 x 5 mm	MeOH (A) 10% HCOOH in H <sub>2</sub> O, (B) CH <sub>3</sub> CN	HPLCMS	Hd, Lu, Ni	(Brito, Ramirez, Areche, Sepulveda, & Simirgiotis, 2014)
Entera	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH in H <sub>2</sub> O (v/v)	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Hd, Nb	(Sun, et al., 2013)
<i>C. paradisi</i>					
Jugo	Beckman Ultrasphere ODS 205x4.6mm	(A) H <sub>2</sub> O / HCOOH (95:5; v/v), (B) CH <sub>3</sub> CN / (A) (60:40; v/v)	UV-DAD, 200 – 600 nm	Nr, Ni, Hd, Nh	(Kelebek, 2010)
	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH – H <sub>2</sub> O (0.5:99.5, v/v), (B) MeOH	UV-DAD, 280 – 370 nm	Ht, Ne	(Abad-García, et al., 2014)
Jugo y Flavedo	Zorbax SB C-18 250 x4 mm	(A) H <sub>2</sub> O / AcOH (99:1, v/v), (B) CH <sub>3</sub> CN/ AcOH (99:1,v/v).	HPLCMS	Ni, Hd, Nh	(Zhang, Duan, Zang, Huang, & Liu, 2011)
Cáscara y Pulpa	Acquity UPLC BEH C18 100x2.1 mm	(A) 0.2% AcOH in H <sub>2</sub> O, (B) MeOH	UPLC-PDA	Nr, Ni, Hd, Nh, Ne, Ht	(Xi, Fang, Zhao, Jiao, & Zhou, 2014)
Entera	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH in H <sub>2</sub> O (v/v )	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Ni, Hd, Nh, Nb, Tg	(Sun, et al., 2013)
<i>C. reticulata</i>					
Jugo	Discovery C <sub>18</sub> 250x4.6 mm	CH <sub>3</sub> CN / H <sub>2</sub> O 0-100%	HPLCMS	Nr, Hd, Nb, Tg	(Barreca, et al., 2013)
	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH / H <sub>2</sub> O (0.5:99.5, v/v), (B) MeOH	UV-DAD, 280 – 370 nm	Ht, Ne	(Abad-García, et al., 2014)
	Beckman	(A) H <sub>2</sub> O /	UV-DAD,	Nr, Hd	(Kelebek &

	Ultrasphere ODS 250x4.6 mm	HCOOH (95:5; v/v), (B) CH <sub>3</sub> CN / (A) (60:40; v/v)	200-600 nm		Selli, 2014)
Cáscara	Hypersil BDS (C8) 250x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H <sub>2</sub> O, (B) CH <sub>3</sub> CN, 75% A and 25% B.	HPLCMS	Hd, Nh	(Londoño, et al., 2010)
	Chromsep SS C-18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 2% AcOH in H <sub>2</sub> O (v/v)	UV-DAD, 282-330 nm	Hd, Nb, Tg	(Makovsek, Knez, & Skerget, 2012)
	Zorbax SB-C18, 250x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H <sub>2</sub> O, (B) MeOH	UV-DAD, 283 – 367 nm	Nr, Ni, Hd, Nh, Ne, Lu, Nb, Tg	(Zhang, et al., 2014)
Pulpa	Waters Spherisorb ODS-2 150x4.6 mm	(A) H <sub>2</sub> O – CH <sub>3</sub> CN (90:10, v/v), (B) CH <sub>3</sub> CN	UV-DAD, 280-330 nm	Hd, Nr	(Ramful, Tamus, Aruoma, Bourdon, & Bahorun, 2011)
	Zorbax SB-C18, 250x4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H <sub>2</sub> O, (B) MeOH	UV-DAD, 283 – 367 nm	Nr, Ni, Hd, Nh, Nb	(Xi, Zhang, Sun, Shen, & Zhou, 2014)
Semilla	Hypersil ODS C18 250x4.6 mm	(A) CH <sub>3</sub> CN, (B) 0.2% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O	UV-Vis, 280 nm	Ni, Hd	(Moulehi, Bourgou, Ourghemmi, & Tounsi, 2012)
<i>C. sinensis</i>					
Jugo	Onyx monolithic C <sub>18</sub> , 100x4.6 mm	Ternary mixture of 0.15 mol L <sup>-1</sup> acetic buffer, pH 4.0, CH <sub>3</sub> CN and MeOH.	SLM Aminco AB2 luminescence spectrometer, 585-625 nm	Ni, Hd, Ne	(Andreu, Fernández, & Gómez, 2010)
	Phenomenex Luna C18(2) 150x4.6 mm	(A) AcOH – H <sub>2</sub> O (0.5:99.5, v/v), (B) MeOH	UV-DAD, 280 – 370 nm	Ht, Ne	(Abad-García, et al., 2014)
	Discovery C <sub>18</sub> 250x4.6	CH <sub>3</sub> CN / H <sub>2</sub> O 0-100%	HPLCMS	Nr, Hd	(Barreca, Bellocco,

	mm				Leuzzi, & Gattuso, 2014)
Cáscara	Hypersil BDS (C8) 250x 4.6 mm	(A) 0.1% HCOOH in H <sub>2</sub> O, (B) CH <sub>3</sub> CN, 75% A and 25% B.	HPLCMS	Hd, Nh, Nb, Tg	(Londoño, et al., 2010)
	Hypersil GOLD C <sub>18</sub> 250x 4.6 mm	(A) MeOH, (B) 9% AcOH in H <sub>2</sub> O	UV-Vis, 280 nm	Ni, Nh	(Chen, Yang, & Liu, 2011)
Pulpa	Waters Spherisorb ODS-2 150x4.6 mm	(A) H <sub>2</sub> O – CH <sub>3</sub> CN (90:10, v/v), (B) CH <sub>3</sub> CN	UV-DAD, 280-330 nm	Hd, Nr	(Ramful, Tamus, Aruoma, Bourdon, & Bahorun, 2011)
	Agilent Eclipse XDB-C <sub>18</sub> 150x2.1 mm	(A) 1 mM NH <sub>4</sub> F in H <sub>2</sub> O, (B) MeOH	HPLCMS	Hd, Nh, Ni, Nb	(Pan, Li, Deng, & Xiao, 2014)
Entera	Diamonsil C18 250x4.6 mm	(A) MeOH, (B) 4% AcOH in H <sub>2</sub> O (v/v)	UV-DAD, 200 – 400 nm	Nr, Hd, Nb, Tg	(Sun, et al., 2013)

**AcOH:** ácido acético, **Hd:** Hesperidina, **HPLCMS:** HPLC acoplado con ESI-MS/MS, **Ht:** Hesperetina, **MeOH:** Metanol, **Ni:** Naringina, **Nh:** Neohesperidina, **Ne:** Naringenina, **Nr:** Narirutina, **Nb:** Nobiletina, **Lu:** Luteolina, **Tg:** Tangeretina, **UPLC-PDA:** Cromatografía de líquidos de ultra desempeño con detector PDA, **UV-DAD:** Detector de arreglo de diodos UV, **UV-Vis:** Detector UV y visible.

Con las diferentes técnicas de cromatografía líquida se han logrado importantes avances en el estudio de la composición de las frutas cítricas, al comprobar que la presencia y concentración de los diferentes compuestos fenólicos y flavonoides depende de cuál es la especie cítrica en análisis (Tabla 6) (Dugo, et al., 2005).

**Tabla 6. Flavonoides encontrados en jugos de especies cítricas, ordenados por su aparición en cromatografía líquida (Dugo, et al., 2005).**

Especie	Compuestos
Limón	Apigenina 6,8-di-C-glucosido, Diosmetina 6,8-di-C-glucosido, Apigenina 7-(malonilapiosil)-glucosido, Eriocitrina, Rutina, Diosmetina 6-C-β-D-

---

	glucosido, Hesperidina, Neohesperidina, Iso-/Limocitrol, Limocitrina.			
Naranja	Apigenina	6,8-di-C-glucosido,	Apigenina	7-(malonilapiosil)-glucosido, Eriocitrina, Narirutina, Hesperidina, Naringenina, Neodiosmina, Rhoifolina, Didimina.
Toronja	Apigenina	6,8-di-C-glucosido,	Apigenina	7-(malonilapiosil)-glucosido, Eriocitrina, Neoeriocitrina, Narirutina, Naringina, Hesperidina, Neohesperidina, Didimina, Poncirina.
Mandarina	Apigenina	6,8-di-C-glucosido,	Diosmetina	6,8-di-C-glucosido, Eriocitrina, Narirutina, Hesperidina, Diosmina, Apigenina, Didimina.

---

A continuación se muestran los resultados encontrados en la literatura científica publicada recientemente con el contenido de los principales flavonoides hesperidina y naringina y ácido ascórbico en *C. limetta* y *C. reticulata* obtenidos por análisis HPLC (Tabla 7). Se puede observar un cambio en la concentración de éstos compuestos a medida que la fruta va madurando (Ramful, Tamus, Aruoma, Bourdon, & Bajorun, 2011).

**Tabla 7 Contenido de hesperidina, naringina y ácido ascórbico en *C. limetta* y *C. reticulata*.**

IM	Hesperidina	Naringina	Ácido ascórbico	Referencia
<i>Citrus limetta</i>				
Jugo				
N.I.	4.29±0.53 mg/L	N.I.	N.I.	(Barreca, Bellocco, Caristi, Leuzzi, & Gattuso, 2011)
<i>Citrus reticulata</i>				
Jugo				
N.I.	21.1± 0.797 mg/L	N.I.	N.I.	(Barreca, et al., 2013)
N.I.	166±21 - 879±92 mg/L	N.I.	N.I.	(Abad-García, et al., 2014)

Cáscara	11.9±0.01	74.1±0.96 mg/L	N.I.	372.6±10.1 mg/L	(Kelebek & Selli, 2014)
	14.5±0.01	18.7±0.44 mg/L	N.I.	496.2±12.1 mg/L	
	12.5±0.0	40.5±0.04 mg/L	N.I.	398.8±11.2 mg/L	
	N.I.	135.26±1.91 -	106.91±1.51 -	N.I.	(Levaj, Dragovic, Bursac, & Krasnici, 2009)
		157.48±2.23 mg/100 g FW	135.21±1.91 mg/100 g FW		
		42.33±0.60 -	28.74±0.41 -		
Pulpa	N.I.	47.22±0.67 mg/g DW	47.21±0.67 mg/g DW	N.I.	(Makovsek, Knez, & Skerget, 2012)
		9.36 ± 0.25 mg/g DW	N.I.	N.I.	(Zhang, et al., 2014)
	N.I.	17.53 – 55.98 mg/g DW	0.04 – 2.78 mg/g DW	N.I.	
	N.I.	73.33±1.04 - 51.35±0.73 mg/100 g FW	18.84±0.27 - 43.25±0.61 mg/100 g FW	N.I.	(Levaj, Dragovic, Bursac, & Krasnici, 2009)
		55.97±0.79 - 47.22±0.67 mg/g DW	14.38±0.20 - 33.27±0.47 mg/g DW		
		11.79 – 21.25	15.10 – 20.35 mg/g FW	N.D.	160 – 390 µg/mL
Semilla	N.I.	7.22 – 22.13 mg/g DW	3.54 – 4.23 mg/g DW	N.I.	(Xi, Zhang, Sun, Shen, & Zhou, 2014)
	Inmaduro	2.83 ±	10.87 ±	N.I.	(Moulehi, Bourgou,

	0.25 mg /g DW	1.22 mg /g DW		Ourghemmi, & Tounsi, 2012)
Semimaduro	16.76 ± 2.33 mg /g DW	0.45 ± 0.01 mg /g DW	N.I.	
Madurez Comercial	0.15 ± 0.01 mg /g DW	0.73 ± 0.03 mg /g DW	N.I.	

IM: índice de madurez; DW: peso seco; FW: peso fresco; N.I.: No indicado.

Un método alternativo para el análisis de contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en cítricos ha sido la cromatografía en capa fina (TLC), la cual es una opción más económica, aunque a costa de la resolución en el cromatograma y la consecuente identificación de los componentes (Houghton, 2002). La cromatografía en capa fina (TLC) continúa siendo un importante método para el análisis cualitativo de productos herbales debido a sus ventajas inherentes, ya que pueden analizarse varias muestras de manera rápida y simultánea, y se pueden aplicar múltiples técnicas de detección, incluida la fluorescencia (Andreu, Fernández, & Gómez, 2010), para detectar la presencia de flavonoides específicos en una forma más simple que por HPLC (Curtright, Ryneerson, & Markwell, 1996). Esto permite evaluar la calidad de los productos vegetales o sus derivados de forma rápida. Los avances en la cromatografía de capa fina resultan útiles para separar e identificar productos naturales que pueden ser de utilidad a partir de las complejas mezclas propias de los vegetales (Maciejewicz & Soczewinski, 2000).

La cromatografía es efectuada sobre placas de sílica gel ó poliamida como fase estacionaria y la migración se lleva a cabo por una fase móvil formada por mezclas de solventes como las siguientes: C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-MeCOEt-MeOH 6-1-3 ó 4-3-3; CHCl<sub>3</sub>-MeOH-MeCOEt-Ac<sub>2</sub>CH<sub>2</sub> 60-10-5-1 ó 20-10-5-1; C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>-Petroleo-MeCOEt-MeOH 60-26-7-7. Estas proporciones pueden ser adaptadas a la química particular de cada extracto. La separación convencional sobre sílica gel y fases móviles moderadamente polares consistentes en pequeñas cantidades de metanol con solventes menos polares ha sido utilizada exitosamente para compuestos polifenólicos. El factor de retención (Rf) de los diferentes compuestos refleja su polaridad, dada por el número de grupos -OH, los cuáles muestran

mayor afinidad por la fase estacionaria. Es difícil encontrar un sistema TLC que permita separar flavonoides agliconas de sus glucósidos en un solo cromatograma. Las agliconas se separan bien por fases móviles polares débiles, por ejemplo, heptano con pequeñas cantidades de un solvente polar (10-20% de etilacetato, cetonas ó éteres) mientras que una fase móvil más polar (por ejemplo, mezclas de etilacetato con metanol), deben ser utilizadas para separar las formas glicosadas (Matysik, Soczewinski, Wójciak-Kosior, & Wojtasik, 2000).

Asimismo, existe la cromatografía de capa fina de alto desempeño (HPTLC) cómo una metodología estandarizada moderna con una creciente aceptación cómo método analítico. Posee varias ventajas, tales como costos más bajos, menor tiempo de análisis, la posibilidad de detección múltiple, y la derivación específica en la misma placa. La identificación de compuestos separados se basan en las diferencias de Rf y del color de las manchas. Se puede decir que el compuesto identificado es idéntico a una sustancia estándar si la diferencia entre sus Rf es menor a 0.03. La identificación precisa se puede obtener utilizando 3 fases móviles diferentes en la misma fase estacionaria, o 3 tipos diferentes de detección. Así, se pueden obtener y digitalizar los patrones de las muestras y los componentes pueden ser detectados y descritos sin necesidad de conocer la naturaleza química de cada mancha (Cimpoi, 2006). Después de la migración, se puede hacer la desorción de los compuestos de la fase fija con metanol (Jay, Gonnet, Wollenweber, & Voirin, 1975) para un análisis más amplio.

La cromatografía de gases (GC) también es utilizada, pero debido a sus características, es necesario que la muestra sea soluble en los solventes volátiles y volátil a la temperatura de operación de la columna (Yáñez, Lugo, & Parada, 2007).

## **5.5 Efecto Microbicida de los Cítricos**

### **5.5.1 Organismos patógenos**

#### **5.5.1.1 Bacterias coliformes**

Las bacterias coliformes son un grupo heterogéneo compuesto por varios géneros taxonómicos. La falta de certeza en cuanto a su filiación taxonómica y la imprecisa correlación entre los métodos recomendados para la detección de coliformes han presentado problemas. El primero, es que *Escherichia coli* es aceptada como bacteria

coliforme, la especie contiene variantes que no producen gas de la lactosa o lo hacen después de 48 horas, por lo que no se les identifica por medio de esta técnica. Segundo, la capacidad de fermentar la lactosa está frecuentemente asociada a genes localizados en plásmidos. Estos determinantes extracromosomales son fácilmente transferidos entre otras bacterias Gram negativas no relacionadas a las coliformes, que pueden, en consecuencia, ser recuperados en la etapa inicial del análisis. No obstante en la práctica, la técnica ha demostrado su efectividad (NOM-112-SSA1-1994).

El grupo de los microorganismos coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas.

El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

- La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.
- La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.
- Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas.
- La calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos.

La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales (NOM-113-SSA1-1994).

#### **5.5.1.2 *Salmonella***

Los miembros del género *Salmonella* han sido muy estudiados como patógenos cuando se encuentran presentes en los alimentos. El control de este microorganismo, tanto por parte de las autoridades sanitarias, como en las plantas procesadoras de alimentos, depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección. Este microorganismo fue inicialmente identificado en muestras clínicas y los métodos empleados para estos casos se adaptaron posteriormente para su detección en alimentos. Las modificaciones a los métodos consideraron dos aspectos principales, el primero es el debilitamiento o daño a las células bacterianas presentes en un alimento debido al proceso a que está sujeto (por ejemplo: tratamiento térmico, secado, etc.) y segundo, la variabilidad inherente a la naturaleza del

producto bajo estudio. Para diversos alimentos existen diferentes protocolos para el aislamiento de Salmonella, todos ellos son esencialmente similares en principio y emplean las etapas de preenriquecimiento, enriquecimiento selectivo, aislamiento en medios de cultivo selectivo y diferencial, identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos (NOM-114-SSA1-1994).

#### **5.5.1.3 Staphylococcus**

El crecimiento de *Staphylococcus aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias.

Entre las razones para determinar el *Staphylococcus aureus* en alimentos están:

- Confirmar la presencia de este microorganismo como agente causal de una enfermedad de origen alimentario.
- Determinar si un alimento o ingrediente es fuente potencial de este microorganismo enterotoxigénico.
- Demostrar la contaminación postproceso la cual es usualmente debida a contacto humano o con superficies inadecuadamente sanitizadas.

Los alimentos sujetos a contaminación postproceso con tipos enterotoxigénicos de *Staphylococcus aureus* representan un riesgo por la ausencia de flora competitiva que normalmente restringe el crecimiento del *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas. Este tipo de alimentos se vuelven más peligrosos, si además son sujetos a un inadecuado manejo o son mantenidos a temperaturas de conservación inapropiadas. Los alimentos perecederos tales como: carnes crudas y procesadas, ensaladas, productos de pastelería y productos de leche, son los más comúnmente asociados con intoxicación estafilocócica (NOM-115-SSA1-1994).

#### **5.5.1.4 Listeria**

*Listeria monocytogenes* recibe su nombre del cirujano inglés Joseph Lister y de su capacidad de que extractos de su membrana son capaces de estimular la generación de monocitos en el conejo. Puede ser aislada de diversos ambientes como suelo, agua fresca, aguas residuales y vegetación y puede llegar a infectar numerosos animales domésticos

contaminando la vegetación y el suelo donde habitan. Es también un contaminante frecuente de los productos alimentarios, ya que es capaz de generar biopelículas en alimentos que se encuentren en refrigeración, porque tiene la capacidad de crecer hasta a 4 °C. La infección por *L. monocytogenes*, en el contexto del embarazo, suele diagnosticarse de forma tardía, produciéndose un cuadro muy grave, llamado granulomatosis infantisepticum, llegando a provocar abortos. También se ha relacionado con meningoencefalitis y meningitis especialmente en neonatos, ancianos e inmunodeprimidos, así como bacteriemia en mujeres gestantes, inmunodeprimidos y neonatos (granulomatosis infanto-séptica) (Ryan & Ray, 2004).

#### **5.5.1.5 *Pseudomona aeruginosa***

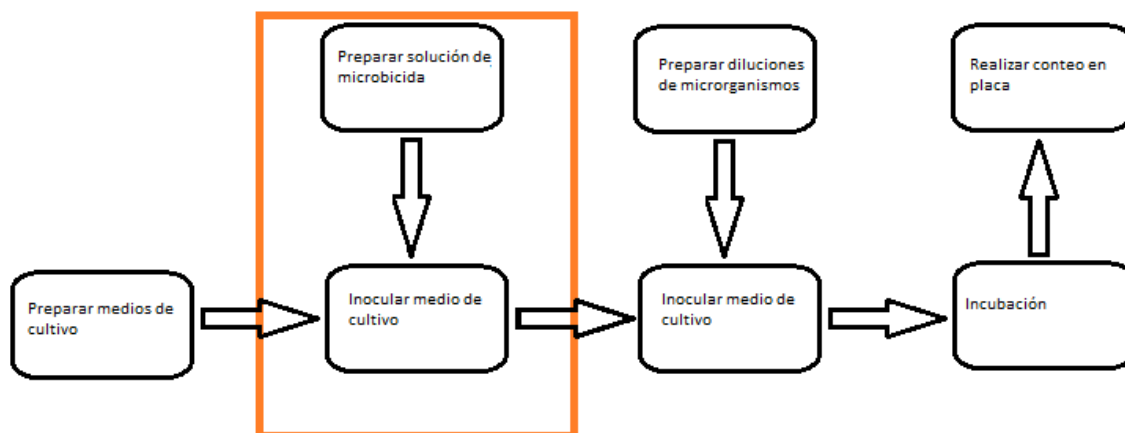
*Pseudomona aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, aeróbica, con motilidad unipolar. Es un patógeno oportunista en humanos y también en plantas. *Aeruginosa*, el nombre latino para el cardenillo u "óxido de cobre", describe el pigmento azul verdoso bacteriano visto en los cultivos de laboratorio de *P. aeruginosa*. Secreta una variedad de pigmentos como piocianina (azul verdoso), fluoresceína (amarillo verdoso fluorescente) y piorrubina (rojo pardo). Algunos agares específicos son "Pseudomonas Agar P" (también conocido como "medio King A") para mejorar la producción de piocianina y piorrubina; y "Pseudomonas Agar F" (también conocido como "medio King B") para la fluoresceína. *P. aeruginosa* es a menudo identificada, de modo preliminar, por su apariencia perlada y olor a uvas in vitro. La identificación clínica definitiva de *P. aeruginosa* frecuentemente incluye, tanto identificar la producción de piocianina y fluoresceína como determinar su habilidad de crecer a 42 °C. *P. aeruginosa* es capaz de crecer en combustibles como queroseno o gasóleo, ya que es un microorganismo capaz de nutrirse a partir de hidrocarburos, causando estragos de corrosión microbiana, y creando una gelatina oscura que a veces se identifica inadecuadamente con un alga. Este patógeno oportunista de individuos inmunocomprometidos, *P. aeruginosa* infecta los pulmones y las vías respiratorias (causado neumonías), las vías urinarias, los tejidos, (heridas), y también causa otras sepsis (infecciones generalizadas en el organismo) (Ryan & Ray, 2004).

#### **5.5.2 Mecanismo de acción antimicrobiana**

Los métodos para determinar la actividad antimicrobiana pueden ser cualitativos o cuantitativos. Son cualitativos si sólo suministran información sobre sensibilidad de la cepa en estudio: si es sensible, resistente o intermedio. Los métodos cuantitativos, informan acerca de sensible, intermedio o resistente, pero mencionan adicionalmente, cuán sensible o resistente es el agente bacteriano en estudio (Andrews, 2001).

Dentro de los métodos, existe la técnica de difusión en agar o placa, en la cual se prepara una placa que contenga un medio con agar y se inoculan cantidades conocidas del agente antimicrobiano a pequeños discos de papel filtro, que luego se colocan en la superficie del agar. Durante la incubación, el agente difunde desde el papel, cuanto más se aleja, mayor es la concentración del agente. Se ha creado por tanto una zona (halo) de inhibición y el diámetro de esta zona es proporcional a la cantidad del agente antimicrobiano añadido y a la efectividad del agente (Alvarez-Ordoñez, et al., 2013).

Existe también el método de conteo en placa de unidades formadoras de colonias (UFC's). La norma mexicana (NMX-BB-040-SCFI-1999) define su metodología. Después del período de incubación, contar el número de UFC en las placas (Figura 4).



**Figura 4. Metodología de las pruebas microbidas en placa.**

El método de microdilución en caldo es más sensible que los métodos en agar y, por lo tanto, más apropiados para una rápida determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de extractos vegetales. Utilizando éste método, se puede determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) y bactericida (MBC) a concentraciones más bajas

comparado con otros métodos de dilución, en un lapso no mayor a 24 horas, después de las cuales no se observa crecimiento significativo de los microorganismos. El método de microdilución es preferido para establecer la correlación entre el rango de actividad antibacterial e inhibición de crecimiento de los extractos, determinado por curvas de crecimiento. Aun más, éste método representa una opción rápida y no costosa de uso de reactivos, permitiendo probar simultáneamente un amplio rango de combinaciones de diferentes bacterias y extractos (Klančnik, Piskernik, Jeršek, & Možina, 2010).

Se define como microbicida a una sustancia que destruye microorganismos o impide su multiplicación o desarrollo. Pueden ser naturales o químicos, que de manera creciente se han utilizado como intervención primaria para la inhibición o inactivación de microorganismos patógenos en los alimentos. Un producto etiquetado como germicida, debe tener un por ciento de reducción de la cuenta viable de 99,999 % en 30 s de contacto a la concentración de uso recomendada, cuando la cuenta viable inicial se encuentra entre 75 y 125 X 10<sup>8</sup> UFC / mL (NMX-BB-040-SCFI-1999). La actividad antimicrobiana se mide determinando la cantidad más pequeña del agente antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un organismo control, esto es conocido como concentración mínima inhibitoria (MIC) (Andrews, 2001). Al promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes, se calcula el porcentaje de reducción mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde:

S son las células sobrevivientes UFC / mL, y

C.V. es la cuenta viable inicial.

Varios de los compuestos encontrados en los cítricos se han estudiado para probar su efecto microbicida (Valero, Carrasco, Perez, Garcia, & Zurera, 2006; Bejarano & Centeno, 2009). Más aún, se ha demostrado sinergia entre flavonoides así como entre flavonoides y otros agentes utilizados de manera rutinaria (Cushnie & Lamb, 2005).

Los antimicrobianos pueden tener acción en los microorganismos de las siguientes formas:

1. Interferencia con la Membrana celular entrando a ésta a través de los canales porínicos de la membrana externa donde se unen a las proteínas, debilitando, conduciendo a lisis celular y muerte. Además, en la membrana citoplásmica se difunden causando el derrame del citoplasma hacia el exterior de la célula, resultando así la muerte celular (Hegggers, et al., 2002).

2. Interferencia en la síntesis de proteínas: se unen a los ribosomas bloqueando la adherencia del RNA, evitando el crecimiento de la cadena de proteínas. También puede provocar la inserción de aminoácidos erróneos en la proteína o en la interferencia con la capacidad de los aminoácidos para conectarse unos con otros (Alvarez-Ordoñez, et al., 2013).

3. Disminución de las actividades enzimáticas, es decir, deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y síntesis de componentes estructurales. Una vez que el antimicrobiano cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así a la actividad celular. Los flavonoides también inhiben enzimas virales importantes, como la transcriptasa inversa y proteasa, y destruyen algunos protozoarios. Sin embargo, su toxicidad en células animales es baja (Havsteen, 2002).

Las propiedades de los cítricos han sido bien conocidas y utilizadas de manera empírica para el control de microorganismos, entre otros usos. Los flavonoides ocupan un lugar importante en éste tipo de estudios, y se ha venido haciendo uso de preparaciones que los contienen para tratar algunas enfermedades (Cushnie & Lamb, 2005), demostrando en varias investigaciones un efecto microbicida considerable sobre diferentes tipos de hongos, cómo *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporium* (Ghani, et al., 2008), bacterias (Cushnie & Lamb, 2011; Sandoval-Montemayor, et al., 2012), e inclusive virus (Özçelik, Kartal, & Orhan, 2011).

Actualmente, existe una tendencia a evitar los conservadores químicos en alimentos, lo que provoca un creciente interés en los compuestos naturales que muestran actividad

microbicida (Angioni, et al., 2003) y ayudan a extender la vida de anaquel de los productos alimenticios (Knorr, et al., 2011). Se busca también que la obtención de extractos con agentes microbicidas a partir de fuentes biológicas se haga a bajo costo, de manera inocua y con técnicas que puedan ser ejecutadas en corto tiempo (Papetti, 2012), lo que abre un nuevo campo de estudio en la investigación de la extracción, purificación y caracterización de extractos obtenidos dentro de la industria de alimentos (Damián-Reyna, González-Hernández, & Chávez-Parga, 2016).

Dado el gran número de compuestos presentes en los microbicidas extraídos de plantas, incluidos los aceites esenciales, puede ser que no esté actuando sólo uno, sino varios mecanismos potenciales simultáneamente durante el tiempo de contacto con el microorganismo. Los dos efectos principales que han sido identificados son primero la formación de poros en la membrana bacteriana a concentraciones del extracto por debajo de la concentración mínima inhibitoria (MIC), generando una fuga de los componentes intracelulares en el período inicial de contacto, sin causar un decrecimiento en la población bacteriana, sólo en su actividad. Éste efecto se puede revertir en condiciones adecuadas de cultivo después de un corto período de exposición. Cuando las bacterias son expuestas a concentraciones por encima de la MIC, ocurre el segundo efecto, que consiste en un cambio químico irreversible en la membrana, ya sea por la modificación de los grupos carboxilo en los ácidos grasos presentes en la membrana o la reacción de los polisacáridos y carbohidratos de la membrana celular. Éste efecto también se observa al exponer a la bacteria a la MIC del extracto por un período más prolongado, reduciendo la población bacteriana (Alvarez-Ordoñez, et al., 2013).

A pesar que los microbicidas naturales están ganado interés como alternativa al uso en tratamientos de conservación físicos y químicos, aún existen varias restricciones, cómo su efectividad microbicida, aceptación por el consumidor y costo de la aplicación de éstos agentes que requieren una investigación más intensa (Zhang, Jiang, Qian, Shang, & Duan, 2014).

Algunos de los principales temas de estudio son el desarrollo de resistencia a los microbicidas por parte de los microorganismo patógenos, la incorporación homogénea de los compuestos en matrices de alimentos, la extracción a gran escala de fuentes naturales sin perder su funcionalidad, y la autorización de su uso por parte de las agencias

reguladoras. Muchos de éstos microbicidas de origen natural son clasificados como “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS) para usar en el procesamiento de alimentos, pero su uso en otras líneas comerciales (farmacéutica, cosmética, etc.) involucra una aprobación regulatoria diferente. Los microbicidas naturales representan un área de oportunidad para la seguridad y conservación de los alimentos, pero aún es necesaria más investigación para optimizar su uso (Juneja, Dwivedi, & Yan, 2012; Sarkar & Shetty, 2014).

Los microbicidas utilizados para inhibir el crecimiento de microorganismos en alimentos y bebidas durante su procesado deben ser seleccionados cuidadosamente para no afectar las propiedades organolépticas. La actividad microbicida de algunos extractos de plantas, incluidos los cítricos (Sandoval-Montemayor, et al., 2012), han permitido disminuir el crecimiento o causar la muerte de los microorganismos, incrementando así la calidad y duración de la seguridad de los alimentos. Algunas de sus ventajas son que un mismo extracto puede ser utilizado para diferentes propósitos o contribuir con los tratamientos comúnmente utilizados, generando la base para el desarrollo de nuevas alternativas, más efectivas, menos caras y con menos efectos colaterales que los antibióticos comerciales (Palacios-Espinosa, Escobedo-Hinojosa, & Romero, 2011).

Los cítricos se encuentran entre las principales fuentes dietéticas de compuestos bioactivos (Vikram, Jayaprakasha, Jesudhasan, Pillai, & Patil, 2010). Un grupo de polifenoles con propiedades microbicidas presente en los cítricos son los flavonoides (Özçelik, Kartal, & Orhan, 2011). En particular, los compuestos fenólicos y flavonoides (Barreca, et al., 2013) han atraído la atención de la comunidad científica debido a una conexión bien establecida entre el consumo de flavonoides y la prevención de padecimientos (Abeyasinghe, et al., 2007). Éstos compuestos han mostrado efecto antibacterial a concentraciones diluidas, con la ruptura de la membrana como mecanismo de acción (Heggors, et al., 2002), alterando la estructura macromolecular de las membranas bacterianas, afectando los grupos carboxílicos de los ácidos grasos en la membrana (Alvarez-Ordoñez, et al., 2013). La obtención casi a diario de nueva evidencia de éstos compuestos interfiriendo con varios factores de virulencia en bacterias patógenas, incluidas enzimas, toxinas y receptores de señales, abre la posibilidad de utilizarlos en terapias contra

infecciones o incluso el desarrollo de nuevos medicamentos (Cushnie & Lamb, 2011; Quiros, Ayala, Olivas, & Gonzalez, 2014).

Algunos metabolitos secundarios de especies tales como *C. aurantifolia*, *C. sinensis*, *C. paradisi*, *C. reticulata* y *C. limetta*, las cuales son cultivadas en México así como en varias partes del mundo, han presentado actividad bactericida, ayudando a combatir algunas infecciones causadas por patógenos en humanos (Cushnie & Lamb, 2011; Özçelik, Kartal, & Orhan, 2011; Vikram, Jayaprakasha, Jesudhasan, Pillai, & Patil, 2010). Son particularmente útiles como antivirales en herpes, influenza, etc. (Özçelik, Kartal, & Orhan, 2011), antifungi (Wu, et al., 2013), y antibacteriales (Martínez-Flores, González-Gallego, Culebras, & Tuñón, 2012; Vollmerhausen, Ramos, Thi, Dzung, & Brauner, 2013).

Los extractos de cítricos han mostrado efecto bactericida (Oikeh, Omoregie, Oviasogie, & Oriakhi, 2016), con valores reportados de concentración mínima bactericida (MBC) para aceite esencial de *C. sinensis* en *L. monocytogenes* MTCC-657  $>1000 \mu\text{L} / \text{mL}$ , *E. coli* MTCC-40  $>1000 \mu\text{L} / \text{mL}$ , *P. aeruginosa* MTCC-4676  $>1000 \mu\text{L} / \text{mL}$ , y *S. aureus* MTCC-87  $>1000 \mu\text{L} / \text{mL}$  (Debbarma, Kishore, Nayak, Kannuchamy, & Gudipati, 2013), el cuál es aún bajo comparado con lo reportado para extractos de té verde en *S. aureus* ATCC 25923  $0.156 \text{ mg} / \text{mL}$ , *L. monocytogenes* ZM58  $>10 \text{ mg/mL}$ , *E. coli* O157:H7  $1.25 \text{ mg} / \text{mL}$  (Klančnik, Piskernik, Jeršek, & Možina, 2010). Los extractos de pericarpio de *C. reticulata* han mostrado un amplio espectro antibacterial, mostrando un efecto más fuerte contra bacterias gram-positivas que contra gram-negativas. La bacteria más susceptible a éstos extractos fue *S. aureus* CCTCC AB9105 (MIC  $100 \text{ mg/mL}$ ). La hesperidina mostró efectos de inhibición similares a los extractos, mientras que tangeretina y nobiletina muestran baja actividad microbica (Yi, Yu, Liang, & Zeng, 2008).

Varias publicaciones recientes reportan la presencia regular de actividad antibacterial de los flavonoides aislados (Herborne & Williams, 2000); con MIC para hesperidina contra *E. coli* CCTCC AB94014 de  $800 \mu\text{g} / \text{mL}$ , y contra *S. aureus* CCTCC AB9105 de  $200 \mu\text{g} / \text{mL}$  (Yi, Yu, Liang, & Zeng, 2008); para naringina contra *E. coli* ATCC 35218 de  $4 \mu\text{g} / \text{mL}$ , contra *P. aeruginosa* ATCC 10145 de  $2 \mu\text{g} / \text{mL}$ , y contra *S. aureus* ATCC 25923 de  $16 \mu\text{g} / \text{mL}$ ; para nobiletina contra *E. coli* CCTCC AB94014 de  $1600 \mu\text{g} / \text{mL}$ , y contra *S. aureus* CCTCC AB9105 de  $1600 \mu\text{g} / \text{mL}$  (Yi, Yu, Liang, & Zeng, 2008); para quercitina contra *E. coli* ATCC 35218 de  $4 \mu\text{g} / \text{mL}$ , contra *P. aeruginosa* ATCC 10145 de  $4 \mu\text{g} / \text{mL}$ ,

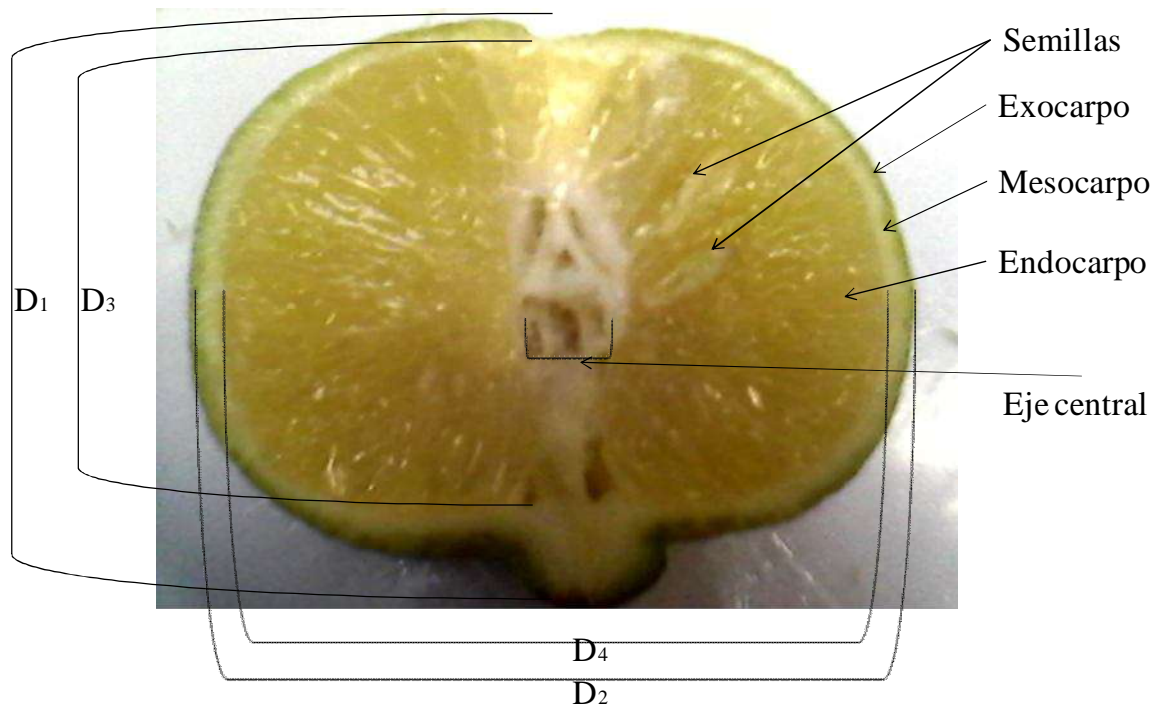
y contra *S. aureus* ATCC 25923 de 2 µg / mL; para tangeretina contra *E. coli* CCTCC AB94014 de 1600 µg / mL, y contra *S. aureus* CCTCC AB9105 de 1600 µg / mL (Yi, Yu, Liang, & Zeng, 2008); para ácido gálico contra *E. coli* ATCC 35218 de 4 µg / mL, contra *P. aeruginosa* ATCC 10145 de 2 µg / mL, contra *S. aureus* ATCC 25923 de 16 µg / mL (Özçelik, Kartal, & Orhan, 2011), los cuales son similares a la inhibición bacteriana de extractos de semilla de uva con MIC contra *S. aureus* ATCC 25923 de 1.25 mg / mL, contra *L. monocytogenes* ZM58 >10 mg / mL, contra *E. coli* O157: H7 de 2.5 mg / mL (Klančnik, Piskernik, Jeršek, & Možina, 2010). Esto ha impulsado el desarrollo de extractos comerciales de cítricos, con un buen desempeño bactericida y MIC de 20-80 ppm contra *S. enterica* CECT 4300 (Alvarez-Ordoñez, et al., 2013). Aún así, algunos compuestos cítricos no inhiben ciertas bacterias tales como *L. monocytogenes* 01/155 y 99/287, *P. aeruginosa* ATCC27853, *S. aureus* ATCC29213, y *E. coli* O157: H7, quienes no mostraron inhibición a concentraciones de hasta 0.25 mM de naringina (Celiz, Diaz, & Audisio, 2011).

Por lo tanto, la investigación de los compuestos fenólicos y flavonoides en frutas cítricas y su aplicación como microbicidas es muy atractiva. La extracción y análisis de compuestos fenólicos y flavonoides a partir de cáscara, jugo y semilla de cítricos ha sido reportada recientemente (Damián-Reyna, González-Hernández, & Chávez-Parga, 2016). Sin embargo, pocos estudios han analizado y comparado simultáneamente la composición de fenoles y flavonoides en bagazo, jugo y semilla para contribuir a su uso racional.

## VI. METODOLOGÍA

### 6.1 Acondicionamiento de materia prima

Buscando que éste proyecto esté orientado hacia la innovación, se eligen los cítricos, disponibles en el estado de Michoacán, *C. limetta* y *C. reticulata*, que no han sido tan extensamente estudiados. Los frutos se adquirieron en la ciudad de Morelia, provenientes de los estados de Michoacán y Estado de México, durante las estaciones invernales de 2013 y 2014. Se midieron las distintas dimensiones de las frutas (Figura 5).



**Figura 5. Secciones de un fruto cítrico. D<sub>1</sub>: diámetro polo a polo total; D<sub>2</sub>: diámetro ecuatorial total; D<sub>3</sub>: diámetro polar del endocarpo; D<sub>4</sub>: diámetro ecuatorial del endocarpo.**

Se pesa el fruto completo, se mide su diámetro de polo a polo (D<sub>1</sub>) y ecuatorial (D<sub>2</sub>). Se corta la fruta como se muestra en la Figura 5, a fin de medir el tamaño del endocarpo (D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>) así como el del eje central. Para obtener los pesos de cada capa de la fruta, se

retiran manualmente capa por capa y se pesan en balanza analítica. Se registra también el número de gajos y semillas.

Para obtener el jugo, las frutas se partien a la mitad y se exprimen con un exprimidor de cítricos marca Taurus modelo TC725, el diseño del exprimidor permite una presencia baja de los aceites de la cáscara en el jugo resultante. El bagazo y las semillas se separan a mano.

Se calcula el rendimiento en ml de jugo por gramo de fruta. También se miden los sólidos totales disueltos (TSS) expresados en °Brix, y se determina la acidez del jugo (pH) y acidez titulable (Bartholomew and Sinclair, 1943), como indicadores del estado de madurez del fruto. El índice de madurez (IM) se calcula de la siguiente forma:

$$I. M. = \frac{^{\circ}\text{Brix}}{\text{ácidez titulable}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Del material atrapado en la canastilla del extractor, se separan las semillas y se pesan. Se apartan también las cáscaras sobrantes de la obtención del jugo (bagazo: exocarpo + mesocarpo).

Los 3 materiales (jugo, semilla y bagazo) se secan en horno a una temperatura de 40 °C durante 48 horas, pesando los materiales cada 24 horas. Terminado éste tiempo, se muelen en licuadora durante 30 segundos. Se determina la humedad de los materiales secando una muestra por triplicado en horno a 105 °C hasta peso constante (Wang et al., 2016). Los resultados se expresan como porcentaje de pérdida de peso de las muestras durante el secado.

Los materiales se lavan con acetona (Meyer, México) en proporción 1:1 (gr de material: ml de acetona) en un matraz. La mezcla se agita durante 30 minutos a 200 rpm, a temperatura ambiente para después filtrarlo a vacío. Se repite la operación con hexano (J.T. Baker, México) en proporción 1:4 (gr de material: ml de hexano). Una vez realizada la filtración, se pasa a un horno a 60 °C durante 3 horas, a fin de evaporar los restos de los solventes de lavado.

## 6.2 Obtención de extractos

Para la extracción de los compuestos fenólicos y flavonoides, se utilizan 4 ml de metanol (J.T. Baker, México) por cada gramo de material, agitando la mezcla durante 30 minutos a 200 rpm (de Rijke et al., 2006) a temperatura ambiente. La mezcla se filtra a vacío y los extractos obtenidos se guardan en refrigeración a 4 °C hasta posteriores análisis.

### **6.3 Análisis de los extractos**

#### **6.3.1 Contenido de fenoles totales (TPC)**

El contenido de fenoles totales (TPC) de los extractos metanólicos se determina utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel, México), con ácido gálico (Golden Bell, México) como estándar, en concentraciones de 0 a 0.1 mg/mL. Al final de la reacción se mide la absorbancia a 750 nm (Vinson et al., 2001). Una alícuota de extracto de 0.1 mL se diluye con 0.4 mL de agua desionizada y la solución obtenida se mezcla con 2.25 mL de solución acuosa de Folin-Ciocalteu al 10% y 2.25 mL de solución de carbonato de sodio (Golden Bell, México) (0.20 mg por mL). Después de 2 horas de incubación, la absorbancia se mide a 750 nm contra un blanco de metanol (J.T. Baker, México), utilizando un espectrofotómetro (Jenway, mod. 7305). TPC se expresa como mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de peso seco (DW). El ensayo se replica por triplicado y el valor numérico se reporta como el promedio  $\pm$  desviación estándar (SD) para las tres réplicas.

#### **6.3.2 Contenidos de flavonoides totales (TFC)**

El contenido de flavonoides totales (TFC) se analiza con una modificación al método descrito por Abeysinghe *et al.* (2007). Brevemente, 1.5 mL de metanol se añaden a 0.1 mL de extracto diluido. Después, 0.1 mL de solución acuosa de cloruro de aluminio (Golden Bell, México) (6.804 g /50 ml de agua destilada) se agrega y la solución resultante se diluye con agua desionizada hasta un volumen final de 5 mL. La mezcla se agita, y se deja reposar durante 30 minutos antes de medir la absorbancia a 510 nm. El TFC de los extractos se compara con una curva de calibración para soluciones de quercitina (Aldrich, USA) de 0 a 0.1 mg /mL, y los resultados se expresan como mg de equivalentes de quercitina (QE) por gramos de peso seco (DW). El ensayo se repite por triplicado y el valor numérico se reporta como el promedio  $\pm$  desviación estándar, SD para las tres réplicas.

### 6.3.3 Contenido de hesperidina y ácido ascórbico

El análisis cuantitativo de hesperidina y ácido ascórbico se realizan en un HPLC Varian LC920 equipado con una columna Varian C18 25 cm x 4.6 mm D.I., y un detector de arreglo de diodos. Las fase móviles están formadas por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 mM, ácido fosfórico acuoso al 0.1% y 1% metanol, para determinar ácido ascórbico; y 33% de metanol y 67% de agua para determinar hesperidina, monitoreados a longitudes de onda de 215 y 283 nm, respectivamente. Para confirmar la linealidad y reproducibilidad de la cuantificación de los compuestos, las muestras se analizan por triplicado, y las curvas de calibración se construyen con los promedios de las áreas de los picos. Los contenidos de hesperidina (HD) y ácido ascórbico (AA) se expresan en mg por gramo de peso seco, DW. El ensayo se repite por triplicado y el valor numérico se reporta como el promedio  $\pm$  desviación estándar, SD para las tres réplicas.

## 6.4 Evaluación bactericida

### 6.4.1 Efecto de la concentración y madurez.

Se evalúa la capacidad bactericida de los extractos obtenidos mediante la prueba de inhibición de formación de unidades formadoras de colonias (UFC) (Andrews, 2001). Los organismos de prueba que se utilizan son *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Se evalúan los extractos, a las concentraciones de 50 y 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , obtenidos de jugo, semilla y bagazo. Se prueban también 2 niveles de índice de madurez en cada fruta. El conteo de UFC se realiza después de 48 horas de incubación a 37 °C. El porcentaje de reducción (inhibición) se selecciona como respuesta en un diseño de experimentos  $2^3$ .

### 6.4.2 Determinación de MIC y MBC

La determinación de la MIC y MBC se ejecuta por el método de dilución en caldo (Andrews, 2001), en concentraciones de 2 a 40 mg por mL. 5  $\mu\text{L}$  de suspensión bacteriana a 0.5 Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC /mL) se colocan en medio apropiado (caldo ceftridina para *P. aeruginosa*, caldo Muller-Hinton para las otras bacterias) en una microplaca estéril 96x300  $\mu\text{L}$  y el volumen se completa con el extracto diluido en el caldo de cultivo a la concentración de prueba. Se dejan pozos de control con caldo de cultivo, dilución del

extracto y suspensión bacteriana. La microplaca se incuba por 24 horas a 37 °C. La MIC es la concentración más baja a la cual no se observa viabilidad en el pozo después de la incubación (Klančnik et al., 2010). Para determinar la MBC, 20 µL de los pozos donde no se observa crecimiento se transfieren a una caja de petri con agar sólido (agar pseudomona para *P. aeruginosa*, agar Muller-Hinton para las otras bacterias) y se incuba a 37 °C durante 24 horas. La MBC es la concentración más baja a la que no se observa crecimiento de UFC después de la incubación. El control positivo son los pozos con la suspensión bacteriana en caldo. El control negativo son los pozos con el caldo de cultivo y la solución de extracto. Todas las determinaciones de MIC y MBC se hacen por triplicado.

#### 6.4.3 Organismos de Prueba

Se utilizan como microorganismos de prueba *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, obtenidos de la colección interna del Laboratorio de Bioquímica del Instituto Tecnológico de Morelia, Michoacán; y *Escherichia coli* ATCC 15597, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Salmonella enterica* ATCC 14028 and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 obtenidos de la colección interna del Laboratorio de Tecnologías Emergentes del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo de Hermosillo, Sonora.

#### 6.5 Análisis estadístico

Tres replicas y al menos tres experimentos independientes son realizados. Los datos se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar (SD). Los análisis estadísticos son realizados utilizando STATGRAPHICS Centurion version XVI.I (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA). Las diferencias entre los grupos son detectadas mediante ANOVA y prueba de comparación múltiple de Duncan. Se consideran los valores P menores a 0.05 cómo estadísticamente significativos. El efecto de la concentración, en µg/mL, e índice de madurez sobre el porcentaje de inhibición se ajustó al modelo:

$$\% \text{Inhibición} = a_0 + a_1 * \text{IM} + a_2 * \text{Concentración} + a_3 * \text{IM} * \text{Concentración} \quad (\text{Ec. 33})$$

Los coeficientes de correlación entre el efecto bactericida y la concentración e IM se calculan con los coeficientes de correlación de Pearson.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Fruta utilizada

Se eligieron dos niveles de madurez para cada fruta, utilizando el máximo y el mínimo de un total de 10 lotes muestreados para cada fruta durante las dos temporadas de producción. *C. limetta* tuvo un rango más amplio de IM, lo que se refleja también en la diferencia de sus dimensiones en ambos niveles de madurez (Tabla 8). Se puede observar que la cantidad de jugo se incrementa a medida que la fruta va madurando, así como el crecimiento de las semillas.

**Tabla 8. Frutas utilizadas en éste estudio.**

	IM	Diámetro (cm)	Altura (cm)	Peso (g)	Bagazo (%)	Jugo (%)	Semilla (%)
<i>C. limetta</i>	17.7	5.83±0.31 <sup>a</sup>	5.73±0.32 <sup>a</sup>	92.33±9.06 <sup>a</sup>	52.79±5.40 <sup>a,b</sup>	39.51±6.15 <sup>a,b</sup>	1.93±0.37 <sup>a</sup>
	9.9	5.03±0.46 <sup>a</sup>	4.97±0.35 <sup>a</sup>	64.79±10.81 <sup>a</sup>	60.48±11.32 <sup>b</sup>	35.02±0.24 <sup>a</sup>	1.18±0.64 <sup>a</sup>
<i>C. reticulata</i>	9.5	6.23±0.21 <sup>a</sup>	5.13±0.21 <sup>a</sup>	109.54±17.22 <sup>a</sup>	26.74±15.92 <sup>a</sup>	52.57±0.24 <sup>b</sup>	2.83±0.75 <sup>a</sup>
	6.3	6.07±0.40 <sup>a</sup>	5.00±0.36 <sup>a</sup>	107.32±7.81 <sup>a</sup>	28.69±19.13 <sup>a,b</sup>	49.53±0.24 <sup>a,b</sup>	2.06±0.49 <sup>a</sup>

Cada valor es el promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Los diferentes superíndices entre filas indican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0.05$ ).

### 7.2 Efecto de la madurez en TPC, TFC, hesperidina y ácido ascórbico

Se encontró un contenido importante de fenoles y flavonoides en toda la fruta, para ambos cítricos (Tabla 9), lo cual se esperaba, por ser una característica típica de los cítricos. Su contenido es similar al encontrado en otras especies de cítricos. Se observó una presencia mayor en *C. reticulata* que en *C. limetta*, tanto en fenoles totales como en flavonoides totales. Las semillas de ambas frutas fueron las menos ricas tanto en fenoles como en flavonoides totales. Se observa una diferencia en el contenido de fenoles y flavonoides dependiendo del estado de madurez, la más evidente es en las semillas de ambas especies, donde la concentración prácticamente se duplica al madurar la fruta.

**Tabla 9. Contenidos de TPC, TFC, hesperidina y ácido ascórbico.**

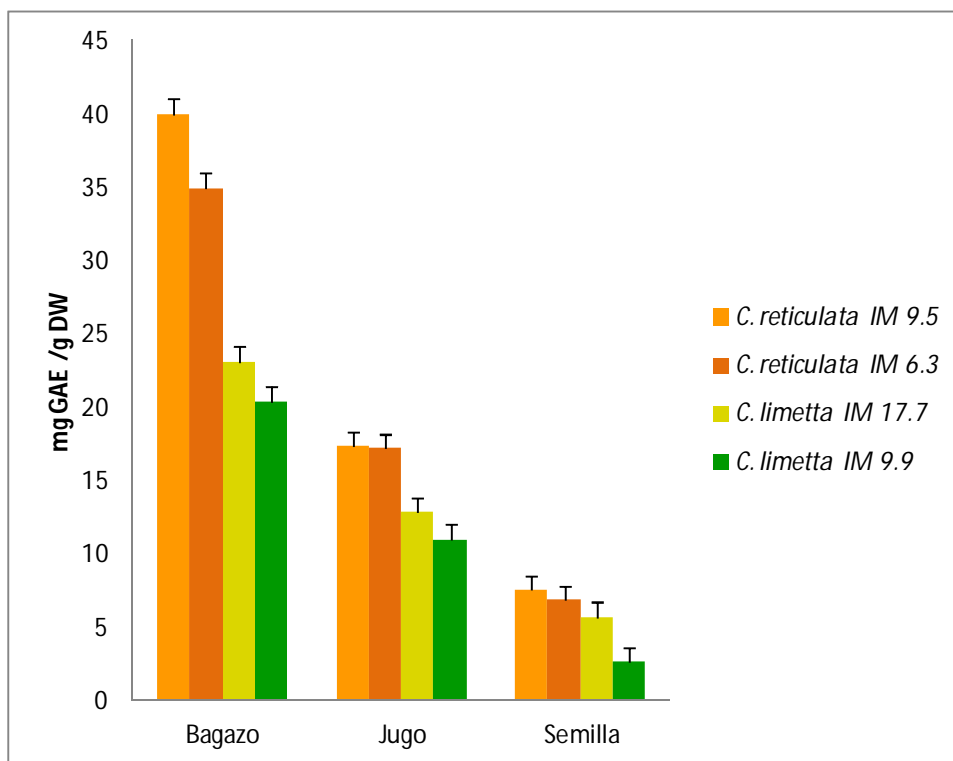
IM	TPC	TFC	HD	AA
----	-----	-----	----	----

		(mg GAE /g DW)	(mg QE /g DW)	(mg/g DW)	(mg/g DW)
<i>C. limetta</i>					
Bagazo	17.7	23.09±2.57 <sup>e</sup>	1.69±0.02 <sup>e,f</sup>	0.62±0.07 <sup>e</sup>	3.22±0.28 <sup>c</sup>
	9.9	20.38±0.97 <sup>d,e</sup>	1.58±0.01 <sup>e</sup>	0.40±0.02 <sup>d</sup>	3.13±0.41 <sup>c</sup>
Jugo	17.7	786±73.58 mg/L <sup>c</sup>	63.24±3.66 mg/L <sup>d</sup>	27.3±6.73 mg/L <sup>b,c</sup>	112±12 mg/L <sup>a,b</sup>
	9.9	725±9.14 mg/L <sup>c</sup>	45.91±1.00 mg/L <sup>c</sup>	8.6±1.64 mg/L <sup>a,b</sup>	222±16 mg/L <sup>b</sup>
Semilla	17.7	5.63±0.19 <sup>a,b</sup>	0.34±0.02 <sup>a,b</sup>	0.04±0.01 <sup>a</sup>	1.01±0.01 <sup>a</sup>
	9.9	2.59±0.95 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>a</sup>	0.02±0.00 <sup>a</sup>	0.96±0.07 <sup>a</sup>
<i>C. reticulata</i>					
Bagazo	9.5	39.97±1.25 <sup>g</sup>	1.93±0.01 <sup>g</sup>	0.98±0.04 <sup>f</sup>	3.46±0.20 <sup>c</sup>
	6.3	34.95±0.11 <sup>f</sup>	1.89±0.01 <sup>f,g</sup>	0.97±0.01 <sup>f</sup>	3.83±0.37 <sup>c</sup>
Jugo	9.5	1,470±96.50 mg/L <sup>d</sup>	145.24±0.53 mg/L <sup>e,f</sup>	21.7±3.16 mg/L <sup>d</sup>	153±14 mg/L <sup>b</sup>
	6.3	1,513±37.06 mg/L <sup>d</sup>	81.72±5.18 mg/L <sup>d</sup>	17.7±1.94 mg/L <sup>c</sup>	168±17 mg/L <sup>c</sup>
Semilla	9.5	7.46±0.95 <sup>b</sup>	0.54±0.04 <sup>b,c</sup>	0.09 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.08 <sup>a</sup>
	6.3	6.85±0.95 <sup>b</sup>	0.50±0.02 <sup>b,c</sup>	0.08 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.06 <sup>a</sup>

Cada valor es el promedio de 3 réplicas ± desviación estándar. Los diferentes superíndices entre filas indican diferencias significativas entre muestras ( $p < 0.05$ ).

Los TPC más altos se encontraron en bagazo, seguido de jugo y finalmente las semillas independientemente del estado de madurez para ambas frutas (Figura 6). Los cambios de TPC en bagazo, jugo y semilla mostraron una tendencia similar en los niveles de maduración probados. El bagazo mostró niveles elevados de TPC para ambas frutas. Se registró un aumento de alrededor del 13.3% y 14.4% de TPC en el bagazo durante la maduración ( $20.38 \pm 0.97$  a  $23.09 \pm 2.57$  y  $34.95 \pm 0.11$  a  $39.97 \pm 1.25$  mg GAE/ g DW) para *C. limetta* y *C. reticulata*, respectivamente. El TPC en jugo se incrementó 16.62% y 0.90% durante la maduración ( $10.98 \pm 0.14$  a  $12.80 \pm 1.20$  y  $17.15 \pm 0.42$  a  $17.30 \pm 1.14$  mg GAE/ g DW). El TPC en semilla se incrementó de  $2.59 \pm 0.95$  a  $5.63 \pm 0.19$  y de  $6.85 \pm 0.95$  a  $7.46 \pm 0.95$  mg GAE/ g DW. No se encontró una diferencia significativa entre la semilla de diferente madurez a  $p > 0.05$ . Éstas variaciones podrían deberse a la diferencias entre cultivos, origen, condiciones de crecimiento y proceso de extracción. Los compuestos

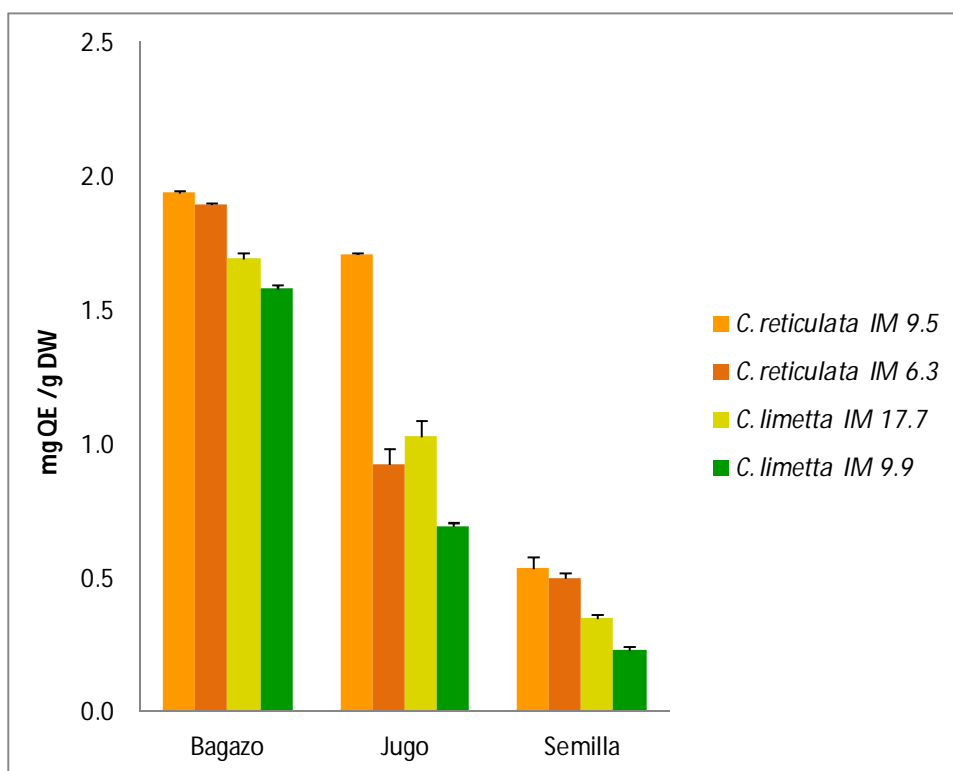
fenólicos son los metabolitos secundarios que han sido correlacionados estrechamente con la actividad antioxidante en varias frutas, vegetales y granos (Abeyasinghe et al., 2007). La presencia de altos TPC en el bagazo y jugo de *C. limetta* and *C. reticulata* confirman su valor nutricional y la presencia de compuestos fenólicos en sus semillas las convierte en una fuente atractiva para aplicaciones posteriores.



**Figura 6.** TPC en *C. limetta* y *C. reticulata*.

Los TFC más altos se encontraron en bagazo, seguido de jugo y finalmente las semillas independientemente del estado de madurez para ambas frutas (Figura 7). Los cambios de TFC en bagazo, jugo y semilla mostraron una tendencia similar durante la maduración. El bagazo mostró niveles elevados de TFC para ambas frutas. Se registró un aumento de alrededor del 7.11% y 2.23% de TFC en el bagazo durante la maduración ( $1579.03 \pm 12.85$  a  $1691.33 \pm 22.83$  y  $1892.63 \pm 6.89$  a  $1934.89 \pm 7.58$   $\mu\text{g QE/ g DW}$ ) para *C. limetta* y *C. reticulata*, respectivamente. El TFC en jugo se incrementó 48.33% y 84.62% durante la maduración ( $694.70 \pm 15.19$  to  $1030.44 \pm 59.58$  and  $1709.78 \pm 6.23$  to

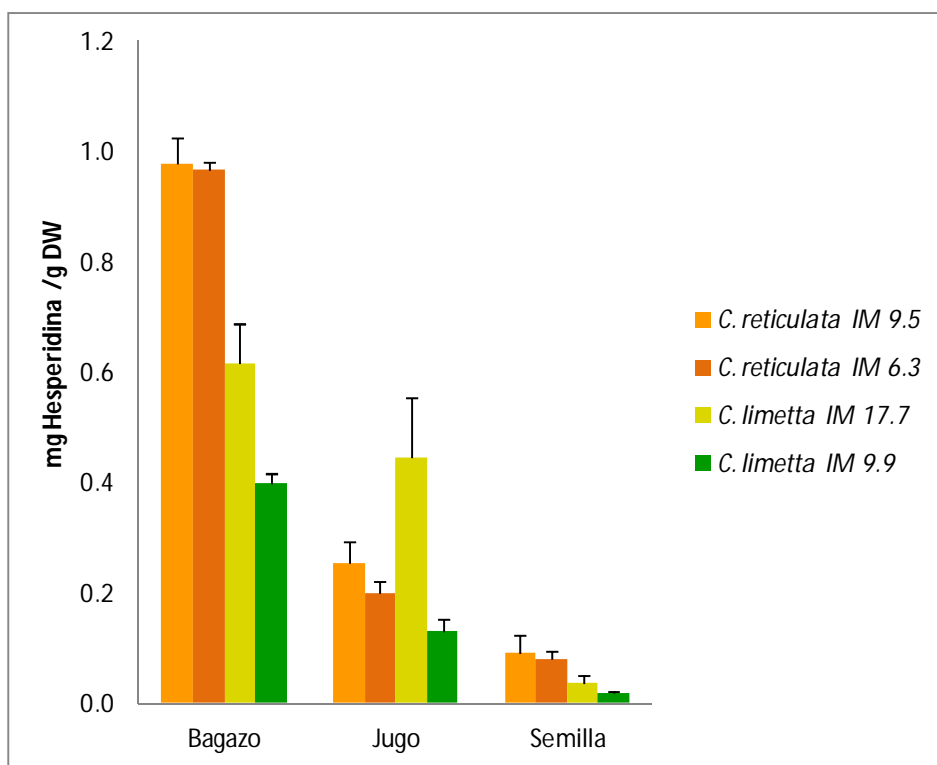
1892.63  $\pm$  6.89  $\mu\text{g QE/ g DW}$ ). El TFC en semilla se incrementó de 230.74  $\pm$  14.56 a 344.76  $\pm$  15.59 y 499.65  $\pm$  18.61 a 535.15  $\pm$  40.96  $\mu\text{g QE/ g DW}$ . No se encontró una diferencia significativa entre la semilla de diferente madurez a  $p > 0.05$ . Éstas variaciones podrían deberse a la diferencias entre cultivos, origen, condiciones de crecimiento y proceso de extracción. Los compuestos fenólicos como los flavonoides pueden inhibir radicales libres y atrapar especies de oxígeno reactivas (ROS) y por lo tanto, proveen un medio efectivo para prevenir y tratar padecimientos promovidos por los radicales libres (Ramful et al., 2010). La presencia de altos TFC en *C. limetta* and *C. reticulata* las define como una fuente significativa de antioxidantes con potenciales aplicaciones profilácticas y en el desarrollo de alimentos funcionales.



**Figura 7. TFC en *C. limetta* y *C. reticulata*.**

La presencia de hesperidina fue evidentemente diferente entre bagazo, jugo y semilla y estuvo influenciado por la maduración (Figura 8). En general, el valor más alto de hesperidina fue registrado en bagazo, seguido por jugo y semilla. Sin embargo, la variación

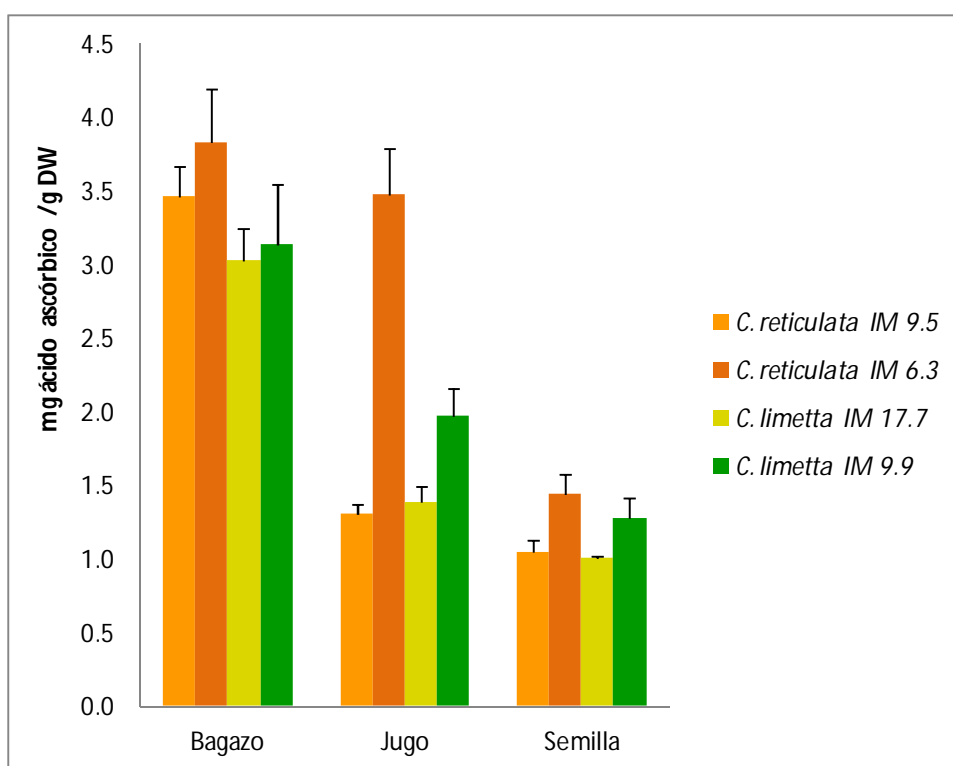
fue más grande en *C. limetta* durante la maduración. Grandes cantidades de hesperidina fueron identificadas no sólo en bagazo, sino también en jugo y semilla, lo que concuerda con niveles reportados previamente para *C. reticulata* (Ramful et al., 2010; Sun et al., 2010; Wang et al., 2016). La concentración de hesperidina en bagazo de *C. limetta* y *C. reticulata* se incrementó durante la maduración de  $397.37 \pm 20.01$  a  $617.21 \pm 70.73$  y de  $966.49 \pm 14.68$  a  $978.89 \pm 43.46$   $\mu\text{g} / \text{g DW}$ , respectivamente. De forma similar, la cantidad de hesperidina en jugo se incrementó de  $129.45 \pm 24.81$  a  $444.97 \pm 109.57$  y de  $200.69 \pm 22.01$  a  $255.54 \pm 37.21$   $\mu\text{g} / \text{g DW}$ , respectivamente. La hesperidina se acumuló en las semillas de *C. limetta* y *C. reticulata* durante la maduración, y sus cantidades se incrementaron 90.25% y 14.46%, respectivamente.



**Figura 8. Contenido de hesperidina en *C. limetta* y *C. reticulata*.**

Los contenidos de ácido ascórbico más altos se encontraron en bagazo, seguido de jugo y finalmente las semillas independientemente del estado de madurez para ambas frutas (Figura 9). El contenido de ácido ascórbico en el bagazo de *C. limetta* y *C. reticulata*

disminuyó levemente durante la maduración de  $3.13 \pm 0.41$  a  $3.02 \pm 0.22$  y de  $3.83 \pm 0.37$  a  $3.46 \pm 0.20$  mg / g DW para *C. limetta* y *C. reticulata*, respectivamente. Durante la maduración, el contenido de ácido ascórbico en jugo disminuyó de  $1.96 \pm 0.20$  a  $1.39 \pm 0.10$  y de  $3.47 \pm 0.31$  a  $1.30 \pm 0.08$  mg / g DW. El ácido ascórbico disminuyó de las semillas de *C. limetta* y *C. reticulata* con la maduración, y su cantidad se redujo en un 20.80% y 27.31%, respectivamente. Como el ácido ascórbico es un nutriente esencial para prevenir escorbuto, cáncer, padecimientos cardiovasculares y del sistema nervioso, parecen ser una fuente benéfica e importante de éste compuesto.



**Figura 9. Contenido de ácido ascórbico en *C. limetta* and *C. reticulata*.**

Las concentraciones de metabolitos encontradas en los jugos de *C. reticulata* concuerdan con los reportados previamente (Abad-García et al., 2014; Kelebek and Selli, 2014); también las cantidades encontradas en semilla (Moulehi et al., 2012).

### 7.3 Inhibición bacteriana

### 7.3.1 MIC y MBC

La prueba de susceptibilidad antibacterial de los extractos contra algunas cepas bacterianas gram-positivas y gram-negativas se muestra en la Tabla 10. La inhibición de crecimiento observada varió de un microorganismo a otro y de un extracto a otro. Las cepas gram-positivas mostraron valores de MIC y MBC más altos que las gram-negativas. Los extractos que mostraron efecto bactericida mayor fueron los obtenidos de bagazo para ambas frutas, con MIC de hasta 3 mg /mL y MBC de 4 mg /mL, lo que concuerda con los valores reportados de para aceite esencial de *C. sinensis* (Debbarma et al., 2013), éste efecto se puede deber al incremento de compuestos fenólicos y flavonoides durante la maduración de la fruta. *S. aureus* fue el microorganismo de prueba que mostró mayor resistencia a los extractos, con MIC por encima de 31 mg / mL y MBC mayores a 40 mg / mL para la mayoría de las pruebas. *L. monocytogenes* tuvo MIC desde 18 mg/mL y MBC desde 13 mg/mL. *E. coli* mostró MIC desde 13 mg/mL y MBC desde 22 mg/mL. *P. aureginosa* registró MIC desde 3 mg/mL y MBC desde 4 mg/mL. *S. enterica* registró MIC desde 9 mg/mL y MBC desde 13 mg/mL. Los extractos de *C. reticulata* mostraron un efecto inhibitorio mayor que los de *C. limetta*, pero aún por debajo del reportado para extractos de té verde (Klančnik, Piskernik, Jeršek, & Možina, 2010). La inhibición bacteriana más baja fue en los extractos de semilla para ambas frutas, con valores de MIC mayores a 36 mg /mL, pero aún por debajo de los obtenidos con extractos de semilla de uva (Klančnik, Piskernik, Jeršek, & Možina, 2010). Aún así, los extractos mostraron mejores actividades antibacteriales que los compuestos cítricos aislados tales como quercitina, ácido gálico (Özçelik, Kartal, & Orhan, 2011), y naringina (Celiz, Diaz, & Audisio, 2011); siendo aún mejores que el desempeño mostrado por algunos extractos comerciales de frutas (Alvarez-Ordoñez, et al., 2013).

**Tabla 10. MIC y MBC de los extractos, mg/mL**

IM	Gram positiva				Gram negativa					
	<i>Listeria monocytogene</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomona aureginosa</i>		<i>Salmonella entérica</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>C. limetta</i>										

Bagazo	17.7	18	22	31	40	13	22	3	4	13	22
	9.9	9	13	31	40	13	22	3	4	9	13
Jugo	17.7	40	>40	>40	>40	36	40	31	40	31	40
	9.9	40	>40	>40	>40	>40	>40	36	40	36	40
Semilla	17.7	>40	>40	>40	>40	>40	>40	36	40	36	40
	9.9	>40	>40	>40	>40	>40	>40	36	40	40	>40
<i>C. reticulata</i>											
Bagazo	9.5	22	31	40	>40	31	40	3	4	18	22
	6.3	22	31	40	>40	31	40	9	13	18	22
Jugo	9.5	27	31	40	>40	31	40	13	22	27	31
	6.3	31	40	40	>40	36	40	31	40	31	40
Semilla	9.5	>40	>40	>40	>40	>40	>40	36	40	40	>40
		>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40

MIC, concentración mínima inhibitoria; MBC, concentración mínima bactericida. Cada valor es el promedio de 3 réplicas con desviación estándar <10%.

### 7.3.2 Influencia de la madurez en la actividad antibacteriana

El efecto bactericida de los extractos de bagazo, jugo y semilla de *C. limetta* durante su maduración fue ensayado en *E. coli* (Figura 10) y *S. aureus* (Figura 11), los cuales inhibieron efectivamente el crecimiento bacteriano dependiendo de la dosis; se observaron variaciones entre las diferentes partes de la fruta y su madurez.

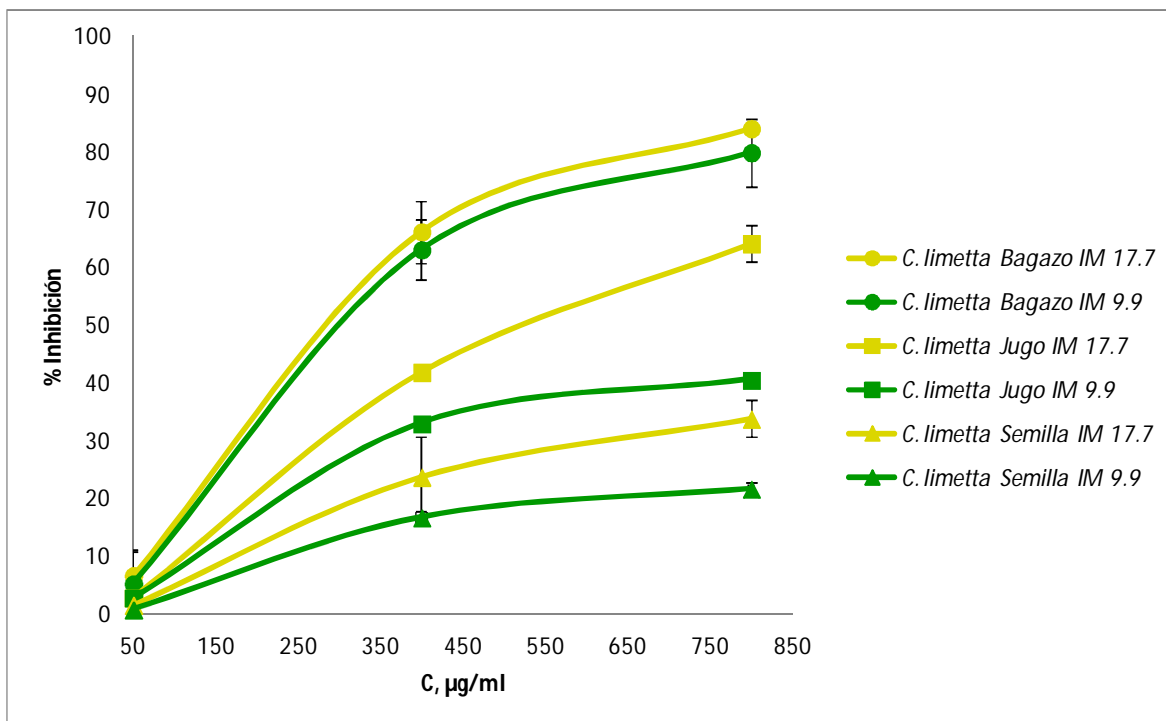


Figura 10. Efecto bactericida de *C. limetta* en *E. coli*.

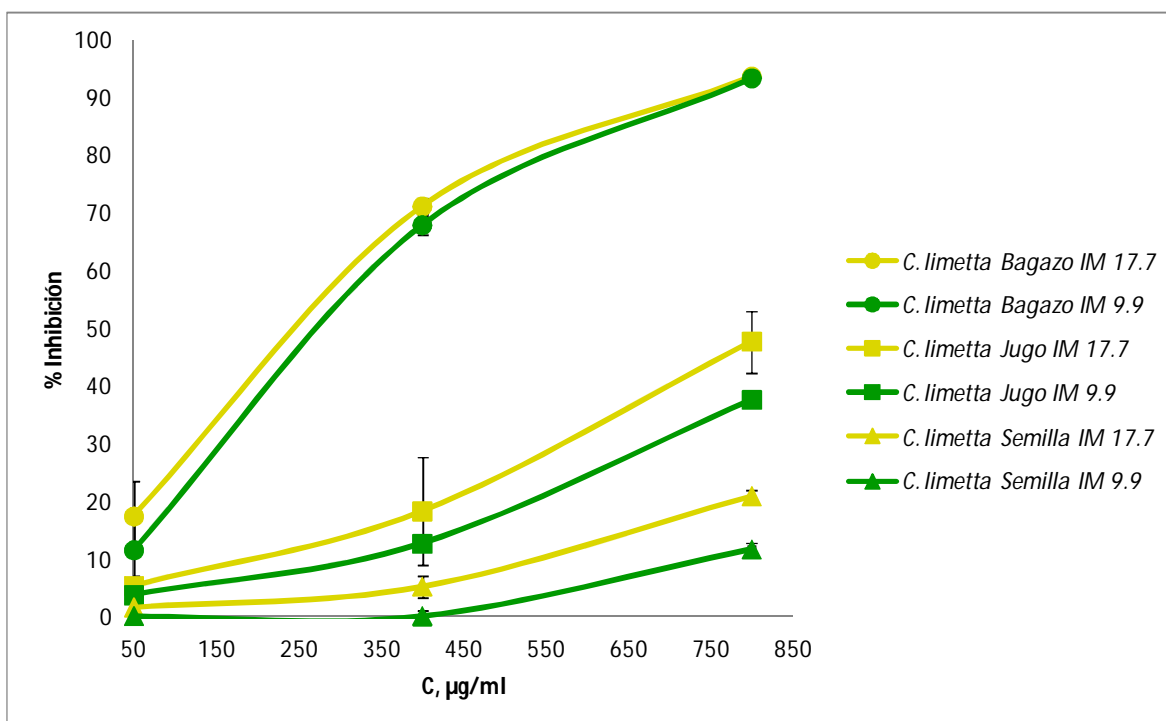


Figura 11. Efecto bactericida de *C. limetta* en *S. aureus*.

El bagazo de *C. reticulata* presentó el efecto más fuerte con una inhibición del 99.7% en *E. coli* (Figura 12) y 98.6 % en *S. aureus* (Figura 13), a 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Es interesante notar que éste extracto mostró los más altos niveles en la mayoría de los compuestos analizados; sin embargo, es posible asumir que la interacción de varios compuestos puede estar inhibiendo el crecimiento de los microorganismos.

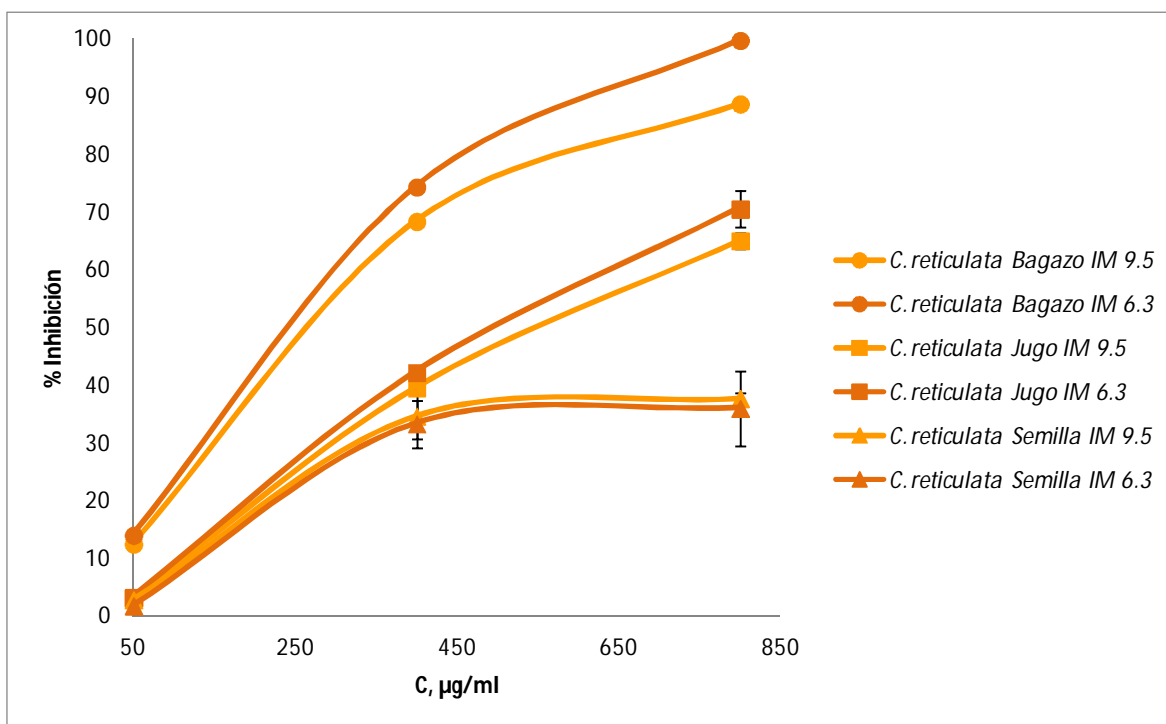
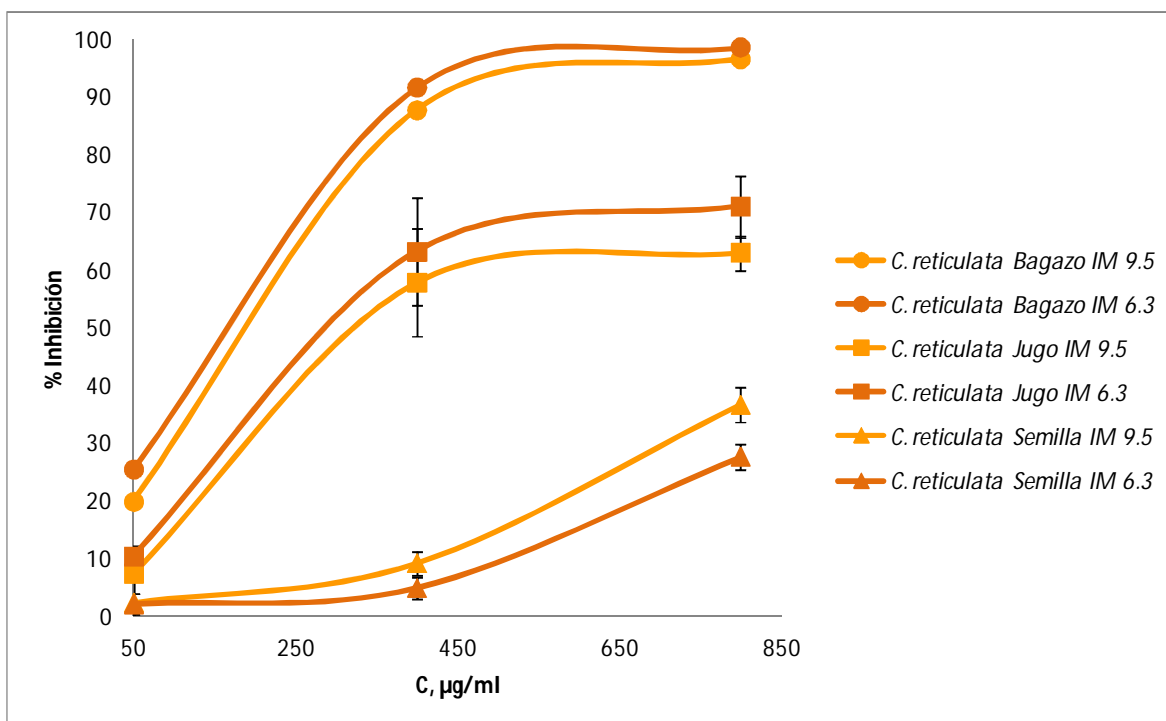


Figura 12. Efecto bactericida de *C. reticulata* en *E. coli*.



**Figura 13. Efecto bactericida de *C. reticulata* en *S. aureus*.**

El índice de madurez y la concentración del extracto, así como su interacción, mostraron un efecto significativo en la inhibición de crecimiento en ambas bacterias.

Las ecuaciones de regresión se muestran en la Tabla 11, junto con sus coeficientes de correlación. Los modelos de regresión explican del 75.94 al 98.46% de la variabilidad en el porcentaje de inhibición en ambas bacterias de prueba. Como se esperaba, el incremento del efecto bactericida es directamente proporcional a la madurez de la fruta, en ambas bacterias, probablemente como resultado del incremento de TPC y TFC. *S. aureus* fue más resistente a los extractos probados, mostrando inhibiciones hasta 20% menores que *E. coli* para todos los extractos.

**Tabla 11. Coeficientes de regresión para la inhibición de crecimiento bacteriano.**

Coeficientes	<i>C. limetta</i>			<i>C. reticulata</i>		
	Bagazo	Jugo	Semilla	Bagazo	Jugo	Semilla
<i>E. coli</i>						
a <sub>0</sub>	2.854	4.191	0.376	13.514	-0.770	4.092
a <sub>1</sub>	0.155	-0.199	0.00795	-0.277	0.0874	0.203
a <sub>2</sub>	0.0948	0.0103	0.00874	0.139	0.104	0.0200
a <sub>3</sub>	0.000479	0.00404	0.00194	-0.00397	0.00227	0.00262
R <sup>2</sup>	93.39 %	96.92 %	91.54 %	95.77 %	98.46 %	75.94 %
<i>S. aureus</i>						
a <sub>0</sub>	1.256	-1.543	-3.146	37.966	16.039	-3.798
a <sub>1</sub>	0.799	0.139	0.130	- 1.826	- 0.827	0.0577
a <sub>2</sub>	0.118	0.0308	0.00235	0.0882	0.0939	0.0171
a <sub>3</sub>	-0.000955	0.00145	0.00132	0.00148	- 0.00208	0.00278
R <sup>2</sup>	96.62 %	92.08 %	86.54 %	88.70 %	87.83 %	92.28 %

### VIII. CONCLUSIONES

- Bagazo, jugo y semilla de *C. reticulata* y *C. limetta* cultivadas en México contienen compuestos fenólicos y flavonoides. Su contenido se incrementa a medida que la maduración aumenta.
- Los extractos obtenidos muestran efecto microbicida en los microorganismos de estudio bajo condiciones in vitro. El efecto aumenta al elevarse la maduración de la fruta. Los extractos de *C. reticulata* tienen un mayor efecto bactericida que los obtenidos de *C. limetta*, en los microorganismos de prueba. Consecuentemente, la inhibición está relacionada directamente con el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides.
- Nuestros descubrimiento sugieren que *C. reticulata* y *C. limetta*, especialmente sus bagazos, son buenas fuentes de compuestos antioxidantes y antibacteriales. Los resultados de las especies cítricas analizadas en éste estudio pueden motivar a utilizarlos más ampliamente en las industrias farmacéutica y de alimentos.

**IX. REFERENCIAS.**

- Abad, B., Berrueta, L., Garmón, S., Urkaregi, A., Gallo, B., & Vicente, F. (2012). Chemometric Characterization of Fruit Juices from Spanish Cultivars According to Their Phenolic Compound Contents: I. Citrus Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 3635-3644.
- Abad-García, B., Garmón-Lobato, S., Sánchez-Ilárduya, M., Berrueta, L., Gallo, B., Vicente, F., & Alonso-Salces, R. (2014). Polyphenolic contents in Citrus fruit juices: authenticity assessment. *Europe Food Research Technology*, *238*, 803-818.
- Abeyasinghe, D., Li, X., Sun, C., Zhang, W., Zhou, C., & Chen, K. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chemistry*, *104*, 1338-1344.
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., & Tattini, M. (2012). Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Science*, *196*, 67-76.
- Alvarez, A., Jorrat, S., & Genta, M. (2005). Caracterización Físicoquímica de Jugo de Limón de Tucumán. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, *34*(2), 49-56.
- Alvarez, R., Carvalho, C., Sierra, J., Lara, O., Cardona, D., & Londoño, J. (2012). Citrus Juice Extraction Systems: Effect on Chemical Composition and Antioxidant Activity of Clementine Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 774-781.
- Alvarez-Ordoñez, A., Carvajal, A., Arguello, H., Martínez-Lobo, F., Naharro, G., & Rubio, A. (2013). Antibacterial activity and mode of action of a commercial citrus fruit extract. *Journal of Applied Microbiology*, *115*, 50-60.
- Amaro, M., Rocha, J., Vila, H., Figueira, M., Mota, H., Sepodes, B., & Ribeiro, M. (2009). Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice. *Food Research International*, *42*, 1010-1017.
- Andreu, A., Fernández, J., & Gómez, A. (2010). Long-Wavelength Fluorescence Detection of Flavonoids in Orange Juices by LC. *Chromatographia*, *72*, 1115-1120.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *48*(S1), 5-16.
- Angioni, A., Barra, A., Russo, M., Coroneo, V., Dessi, S., & Cabras, P. (2003). Chemical Composition of the Essential Oils of Juniperus from Ripe and Unripe Berries and Leaves and Their Antimicrobial Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3073-3078.

- Arab, L., & Liebeskind, D. (2010). Tea, flavonoids and stroke in man and mouse. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 501, 31-36.
- Ariza, R., Cruzaley, R., Vázquez, E., Barrios, A., & Alarcón, N. (2004). Efecto de las labores Culturales en la Producción y Calidad de Limón Mexicano de Invierno. *Fitotecnía Mexicana*, 27(1), 73-76.
- Asikin, Y., Maeda, G., Tamaki, H., Mizu, M., Oku, H., & Wada, K. (2015). Cultivation line and fruit ripening discriminations of Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata) peel oils using aroma compositional, electronic nose, and antioxidant analyses. *Food Research International*, 67, 102-110.
- Asikin, Y., Taira, I., Inafuku, S., Sumi, H., Sawamura, M., Takara, K., & Wada, K. (2012). Volatile Aroma Components and Antioxidant Activities of the Flavedo Peel Extract of Unripe Shiikuwasha (*Citrus depressa* Hayata). *Journal of Food Science*, 77(4), C469-C475.
- Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011). Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chemistry*, 124, 576-582.
- Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011). Elucidation of the flavonoid and furocoumarin composition and radical-scavenging activity of green and ripe chinotto (*Citrus myrtifolia* Raf.) fruit tissues, leaves and seeds. *Food Chemistry*, 129, 1504-1512.
- Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011). Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. *Food Chemistry*, 129, 417-422.
- Barreca, D., Bellocco, E., Caristi, C., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2011). Kumquat (*Fortunella japonica* Swingle) juice: Flavonoid distribution and antioxidant properties. *Food Research International*, 44, 2190-2197.
- Barreca, D., Bellocco, E., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2014). First evidence of C- and O-glycosyl flavone in blood orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chemistry*, 149, 244-252.
- Barreca, D., Bisignano, C., Ginestra, G., Bisignano, G., Bellocco, E., Leuzzi, U., & Gattuso, G. (2013). Polymethoxylated, C- and O-glycosyl flavonoids in tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) juice and their influence on antioxidant properties. *Food Chemistry*, 141, 1481-1488.
- Bartholomew, E., & Sinclair, W. (1943). Soluble constituents and buffer properties of orange juice. *Plant Physiology*, 18(2), 185-206.

- Bejar, A., Ghanem, N., Mihoubi, D., Kechaou, N., & Mihoubi, N. (2011). Effect of Infrared Drying on Drying Kinetics, Color, Total Phenols and Water and Oil Holding Capacities of Orange (*Citrus Sinensis*) Peel and Leaves. *International Journal of Food Engineering*, 7(5), 1-25.
- Bejarano, R., & Centeno, S. (2009). Extracto de Citrus limon para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(1), 57-61.
- Benavente, O., & Castillo, J. (2008). Update on Uses and Properties of Citrus Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6185–6205.
- Bocco, A., Cuvelier, M., Richard, H., & Berset, C. (1998). Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Citrus Peel and Seed Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2123-2129.
- Brito, A., Ramirez, J., Areche, C., Sepulveda, B., & Simirgiotis, M. (2014). HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. *Molecules*, 19, 17400-17421.
- Buer, C., Imin, N., & Djordjevic, M. (2010). Flavonoids: New Roles for Old Molecules. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 98-111.
- Cano, A., & Arnao, M. (2004). Actividad Antioxidante Hidrofilica y Lipofilica y Contenido en Vitamina C de Zumos de Naranja Comerciales: Relación con sus Características Organolépticas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(3), 185-189.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids structure-activity relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, 22(5), 749-760.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características Químicas y Aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5-14.
- Cartaya, O., Reynaldo, I., & Nogueiras, C. (2002). Caracterización química del complejo de bioflavonoides del limón (CBL). *Temas de Ciencia y Tecnología*, 6(18), 11-14.
- Casassa, L., & Harbertson, J. (2014). Extraction, Evolution, and Sensory Impact of Phenolic Compounds During Red Wine Maceration. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 83-109.
- Celiz, G., Diaz, M., & Audisio, M. (2011). Antibacterial activity of naringin derivatives against pathogenic strains. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 731–738.
- Chen, M., Yang, D., & Liu, S. (2011). Effects of drying temperature on the flavonoid, phenolic acid and antioxidative capacities of the methanol extract of citrus fruit (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) peels. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 1179–1185.

- Cheong, M., Zhu, D., Sng, J., Liu, S., Zhou, W., Curran, P., & Yu, B. (2012). Characterisation of calamansi (*Citrus microcarpa*). Part II: Volatiles, physicochemical properties and non-volatiles in the juice. *Food Chemistry*, *134*, 696–703.
- Chinapongtitiwat, V., Jongarootaprangsee, S., Chiewchan, N., & Devahastin, S. (2013). Important flavonoids and limonin in selected Thai citrus residues. *Journal of Functional Foods*, *5*, 1151-1158.
- Chiu, K., Cheng, Y., Chen, J., Chang, C., & Yang, P. (2002). Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids. *Journal of Supercritical Fluids*, *24*, 77-87.
- Cimpoi, C. (2006). Analysis of Some Natural Antioxidants by Thin-Layer Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *29*, 1125–1142.
- Codoñer, P., & Valls, V. (2010). Citrus as functional foods. *Current Topics in Nutraceutical Research*, *8*, 173-184.
- Costa, R., Russo, M., Grazia, S., Grasso, E., Dugo, P., & Mondello, L. (2014). Thorough investigation of the oxygen heterocyclic fraction of lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) juice. *Journal of Separations Science*, *37*, 792-797.
- Curtright, R., Rynearson, J., & Markwell, J. (1996). Anthocyanins Model Compounds for Learning about More than pH. *Journal of Chemical Education*, *73*(4), 306-309.
- Cushnie, T., & Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *26*, 343–356.
- Cushnie, T., & Lamb, A. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *38*, 99– 107.
- Damián-Reyna, A., González-Hernández, J., & Chávez-Parga, M. (2016). Current procedures for extraction and purification of citrus flavonoides. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *XVIII*(1), 135-147.
- Debbarma, J., Kishore, P., Nayak, B., Kannuchamy, N., & Gudipati, V. (2013). Antibacterial activity of plant essential oils on fish-borne bacteria. *Journal of Food Processing and Preservation*, *37*, 1022–1030.
- DeRijke, E., Out, P., Niessen, W., Ariese, F., Gooijer, C., & Brinkman, U. (2006). Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, *1112*, 31–63.
- Díaz, B., Moure, A., Domínguez, H., & Parajó, J. (2006). Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 2441-2469.

- DiDonna, L., Gallucci, G., Malaj, N., Romano, E., Tagarelli, A., & Sindona, G. (2011). Recycling of industrial essential oil waste: Brutieridin and Melitidin, two anticholesterolaemic active principles from bergamot albedo. *Food Chemistry*, *125*, 438–441.
- DiDonna, L., Taverna, D., Mazzotti, F., Benabdelkamel, H., Attya, M., Napoli, A., & Sindona, G. (2013). Comprehensive assay of flavanones in citrus juices and beverages by UHPLC–ESI-MS/MS and derivatization chemistry. *Food Chemistry*, *141*, 2328–2333.
- Djoukeng, J., Arbona, V., Argamasilla, R., & Gomez, A. (2008). Flavonoid Profiling in Leaves of Citrus Genotypes under Different Environmental Situations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 11087–11097.
- Duan, L., Guo, L., Dou, L., Yu, K. L., & Li, P. (2014). Comparison of Chemical Profiling and Antioxidant Activities of Fruits, Leaves, Branches, and Flowers of Citrus grandis 'Tomentosa'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*, 11122–11129.
- Duan, L., Guo, L., Liu, K., Liu, E., & Li, P. (2014). Characterization and classification of seven Citrus herbs by liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry and genetic algorithm optimized support vector machines. *Journal of Chromatography A*, *1339*, 118–127.
- Dugo, P., Presti, M., Öhman, M., Fazio, A., Dugo, G., & Mondello, L. (2005). Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS. *Journal of Separation Science*, *28*, 1149–1156.
- Duo-Long, D., Yuan-Yuan, Z., Xiao-Fen, C., Xin-Yi, H., & Shi-Lan, F. (2011). Advances in Application of High-Speed Countercurrent Chromatography in Separation and Purification of Flavonoids. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, *39*(2), 269–275.
- Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*, *37*, 277–285.
- Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, *24*, 851–874.
- Euterpio, M., Pagano, I., Piccinelli, A., Rastrelli, L., & Crescenzi, C. (2013). Development and Validation of a Method for the Determination of (E)-Resveratrol and Related Phenolic Compounds in Beverages Using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(8), 1640–1645.
- Fauconneau, B., Waffo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., & Merillon, J. (1997). Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from vitis vinifera cell cultures using in vitro test. *Life Sciences*, *61*(21), 2103–2110.

- Fernández, J., Fernández, J., Aleson, L., Sendra, E., Sayas, E., & Pérez, J. (2004). Application of functional citrus by-products to meat products. *Trends in Food Science & Technology*, *15*, 176–185.
- Forkmann, G., & Martens, S. (2001). Metabolic engineering and applications of flavonoids. *Current Opinion in Biotechnology*, *12*, 155–160.
- Franke, A., Cooney, R., Henning, S., & Custer, L. (2005). Bioavailability and Antioxidant Effects of Orange Juice Components in Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 5170-5178.
- Gattuso, G., Barreca, D., Gargiulli, C., Leuzzi, U., & Caristi, C. (2007). Flavonoid Composition of Citrus Juices. *Molecules*, *12*, 1641-1673.
- Geng, X., Ren, P., Pi, G., Shi, R., Yuan, Z., & Wang, C. (2009). High selective purification of flavonoids from natural plants based on polymeric adsorbent with hydrogen-bonding interaction. *Journal of Chromatography A*, *1216*, 8331–8338.
- Ghani, S., Weaver, L., Zidan, Z., Ali, H., Keevil, C., & Brown, R. (2008). Microwave-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *18*, 518-522.
- Gil, G., Villa, J., Ayala, J., Heredia, J., Sepulveda, D., Yahia, E., & Gonzalez, G. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *12*, 5-23.
- González, E., Domínguez, R., Moreno, D., & García, C. (2010). Natural bioactive compounds of Citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*, 327–345.
- Gorinstein, S., Martin, O., Park, Y., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M., . . . Trakhtenberg, S. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chemistry*, *74*, 309–315.
- Gorinstein, S., Weisz, M., Zemser, M., Tilis, K., Stiller, A., Flam, I., & Gat, Y. (1993). Spectroscopic Analysis of Polyphenols in White Wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, *75*(2), 115-120.
- Grace, M., Guzman, I., Roopchand, D., Moskal, K., Cheng, D., Pogrebnyak, N., . . . Lila, M. (2013). Stable Binding of Alternative Protein-Enriched Food Matrices with Concentrated Cranberry Bioflavonoids for Functional Food Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 6856-6864.

- Grace, M., Guzman, I., Roopchand, D., Moskal, K., Cheng, D., Pogrebnyak, N., . . . Lila, M. (2013). Stable Binding of Alternative Protein-Enriched Food Matrices with Concentrated Cranberry Bioflavonoids for Functional Food Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*, 6856-6864.
- Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J., Sousa, M., Carvalho, A., & Ferreira, I. (2010). Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: peels and juices of citrus fruits. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 99–106.
- Gursoy, N., Tepe, B., & Sokmen, M. (2010). Evaluation of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Peel Oil of Citrus Nobilis. *International Journal of Food Properties*, *13*, 983–991.
- Hamdan, D., El-Readi, M., Tahrani, A., Herrmann, F., Kaufmann, D., Farrag, N., . . . Wink, M. (2011). Chemical composition and biological activity of Citrus jambhiri Lush. *Food Chemistry*, *127*, 394–403.
- Harborne, J., & Williams, C. (2000). Advances in Flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*, 481-504.
- Havsteen, B. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, *96*, 67– 202.
- Hayata, K., Zhanga, X., Chenc, H., Xiaa, S., Jia, C., & Zhonga, F. (2010). Liberation and separation of phenolic compounds from citrus mandarin peels by microwave heating and its effect on antioxidant activity. *Separation and Purification Technology*, *73*, 371–376.
- He, D., Shan, Y., Wuc, Y., Liu, G., Chen, B., & Yao, S. (2011). Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, *127*, 880-885.
- Heggors, J., Cottingham, J., Gusman, J., Reagor, L., McCoy, L., Carino, E., . . . Zhao, J. (2002). The Effectiveness of Processed Grapefruit-Seed Extract as An Antibacterial Agent: II. Mechanism of Action and In Vitro Toxicity. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *8*(3), 333-340.
- Heim, K., Tagliaferro, A., & Bobilya, D. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 572–584.
- Herborne, J., & Williams, C. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, *55*, 481-504.
- Houghton, P. (2002). Chromatography of the chromone and flavonoid alkaloids. *Journal of Chromatography A*, *967*, 75–84.

- Hours, R., Ferreyra, M., Schvab, M., Gerard, L., Zapata, L., & Davies, C. (2005). Caracterización Físicoquímica y Microbiológica de Jugos de Naranja destinados a Vinificación. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, XVI(31), 219-239.
- Ibrahim, R. (2005). A forty-year journey in plant research: original contributions to flavonoid biochemistry. *Canadian Journal of Botany*, 83, 433–450.
- Ikawa, M., Schaper, T., Dollard, C., & Sasner, J. (2003). Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1811-1815.
- Jay, M., Gonnet, J., Wollenweber, E., & Voirin, B. (1975). Sur L'Analyse Qualitative des Aglycones Flavoniques dans una Optique Chimiotaxonomique. *Phytochemistry*, 14, 1605-1612.
- Jeon, J., & Kim, C. (2013). Preparative separation and purification of flavonoids and stilbenoids from *Parthenocissus tricuspidata* stems by dual-mode centrifugal partition chromatography. *Separation and Purification Technology*, 105, 1-7.
- Jiang, M., Yang, L., Zhu, L., Piao, J., & Jiang, J. (2011). Comparative GC/MS Analysis of Essential Oils Extracted by 3 Methods from the Bud of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Food Science*, 76(9), C1219-C1225.
- Juneja, V., Dwivedi, H., & Yan, X. (2012). Novel Natural Food Antimicrobials. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 381-403.
- Jung, H., Jeong, Y., Park, C., Park, C., & Hong, J. (2011). Inhibitory Effect of Citrus Peel Extract on Lipid Accumulation of 3T3-L1 Adipocytes. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 54(2), 169-176.
- Karimi, E., Oskoueian, E., Hendra, R., Armin Oskoueian, A., & Jaafar, H. (2012). Phenolic Compounds Characterization and Biological Activities of *Citrus aurantium* Bloom. *Molecules*, 17, 1203-1218.
- Kelebek, H. (2010). Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. *Industrial Crops and Products*, 32, 269–274.
- Kelebek, H., & Selli, S. (2014). Identification of phenolic compositions and the antioxidant capacity of mandarin juices and wines. *Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1094-1101.
- Kelebek, H., Canbas, A., & Selli, S. (2008). Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of blood orange juices obtained from cvs. Moro and Sanguinello (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) grown in Turkey. *Food Chemistry*, 107, 1710–1716.

- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, *91*, 187–192.
- Kim, S., Hur, H., Yang, H., Kim, H., Kim, M., Park, J., . . . Hwang, J. (2013). Citrus junos Tanaka Peel Extract Exerts Antidiabetic Effects via AMPK and PPAR- $\gamma$  both In Vitro and In Vivo in Mice Fed a High-Fat Diet. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2013*, 1-8.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, *81*, 121–126.
- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging Technologies in Food Processing. *Annual Reviews of Food Science Technology*, *2*, 203-235.
- Krüger, A., & Ganzera, M. (2012). Oroxyllum indicum seeds – Analysis of flavonoids by HPLC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *70*, 553-556.
- Kuljarachanan, T., Devahastin, S., & Chiewchan, N. (2009). Evolution of antioxidant compounds in lime residues during drying. *Food Chemistry*, *113*, 944–949.
- Lagha, S., & Madani, K. (2013). Phenolic contents and antioxidant activity of orange varieties (Citrus sinensis L. and Citrus aurantium L.) cultivated in Algeria: Peels and leaves. *Industrial Crops and Products*, *50*, 723-730.
- Lampila, P., Lieshout, M., Gremmen, B., & Lähtenmäki, L. (2009). Consumer attitudes towards enhanced flavonoid content in fruit. *Food Research International*, *42*, 122–129.
- Ledesma, C., & Luque, M. (2014). Towards a comprehensive exploitation of citrus. *Trends in Food Science & Technology*, *39*, 63-75.
- Levaj, B., Dragovic, V., Bursac, D., & Krasnici, N. (2009). Determination of Flavonoids in Pulp and Peel of Mandarin Fruits. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, *74*(3), 221-225.
- Loizzo, M., Tundis, R., Bonesi, M., Menichini, F., DeLuca, D., Colica, C., & Menichini, F. (2013). Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *92*, 2960-2967.
- Londoño, J., Rodrigues, V., Lara, O., Gil, A., Crecsynsky, T., Arango, G., & Ramirez, J. (2010). Clean recovery of antioxidant flavonoids from citrus peel: Optimizing an aqueous ultrasound-assisted extraction method. *Food Chemistry*, *119*, 81-87.
- Lopez, O., Menendez, R., Garcia, C., Gonzalez, M., & Nogueira, A. (2011). Estudio de secado por aspersión de extractos de Plectranthus amboinicus, Ocimum tenuiflorum, Passiflora

- incarnata, Matricaria recutita y Melissa officinalis. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(3), 216-220.
- Lorente, J., Vegara, S., Martí, N., Ibarz, A., Coll, L., Hernández, J., . . . Saura, D. (2014). Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) juices. *Food Chemistry*, 162, 186-191.
- Maciejewicz, W., & Soczewinski, E. (2000). Chemometric Characterization of TLC Systems of the Type Silica-Binary Non-Aqueous Mobile Phase in the Analysis of Flavonoids. *Chromatographia*, 51(7), 473-477.
- Makovsek, K., Knez, Z., & Skerget, M. (2012). Influence of Process Parameters on the Extraction of Flavanones from Mandarin Peel. *Acta Chimica Slovenica*, 59, 879-887.
- Mäkynen, K., Jitsaardkul, S., Tachasamran, P., Sakai, N., Puranachoti, S., Nirojsinlapachai, N., . . . Adisakwattana, S. (2013). Cultivar variations in antioxidant and antihyperlipidemic properties of pomelo pulp (*Citrus grandis* [L.] Osbeck) in Thailand. *Food Chemistry*, 139, 735-743.
- Mandalari, G., Benetti, R., Bisignano, G., Saija, A., Dugo, G., LoCurto, R., . . . Waldron, K. (2006). Characterization of Flavonoids and Pectins from Bergamot (*Citrus bergamia* Risso) Peel, a Major Byproduct of Essential Oil Extraction. *Journal of Agricultural and Food Science*, 54, 197-203.
- Mandalari, G., Bennett, R., Bisignano, G., Trombetta, D., Saija, A., Faulds, C., . . . Narbad, A. (2007). Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2056-2064.
- Manthey, J. (2004). Fractionation of Orange Peel Phenols in Ultrafiltered Molasses and Mass Balance Studies of Their Antioxidant Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7586-7592.
- Marín, F., Soler, C., Benavente, O., Castillo, J., & Pérez, J. (2007). By-products from different citrus processes as a source of customized functional fibres. *Food Chemistry*, 100, 736-741.
- Markham, K., & Mabry, T. (1968). A Procedure for the Ultraviolet Spectral Detection of Ortho-Dihydroxyl groups in Flavonoids. *Phytochemistry*, 7, 1197-1200.
- Martínez-Flores, S., González-Gallego, J., Culebras, J., & Tuñón, M. (2012). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, XVII(6), 271-278.
- Mata, M., Andrés, C., Jáuregui, O., & Lamuela, R. (2007). Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC-DAD and LC-MS. *Food Chemistry*, 101, 1742-1747.

- Matysik, G., Soczewinski, E., Wójciak-Kosior, M., & Wojtasik, E. (2000). Optimization of Chromatographic Systems for the High-Performance Thin-Layer Chromatography of Flavonoids. *Chromatographia*, 52, 357-362.
- Menichini, F., Loizzo, M., Bonesi, M., Conforti, F., DeLuca, D., Statti, G., . . . Tundis, R. (2011). Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1549-1555.
- Menichini, F., Tundis, R., Loizzo, M., Bonesi, M., Liu, B., Jones, P., . . . Menichini, F. (2011). *C. medica* cv Diamante peel chemical composition and influence on glucose homeostasis and metabolic parameters. *Food Chemistry*, 124, 1083–1089.
- Mokbel, M., & Hashinaga, F. (2006). Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. *Food Chemistry*, 94, 529–534.
- Molina, M., Priego, F., & Luque, M. (2015). Development and application of a quantitative method for determination of flavonoids in orange peel: Influence of sample pretreatment on composition. *Talanta*, 144, 349-355.
- Molnár, I., & Füzfai, Z. (2004). Chromatographic, capillary electrophoretic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 1073, 201–227.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.
- Moreno, M., Belén, D., Sánchez, M., Vilorio, M., & García, D. (2004). Evaluación de la Actividad Antioxidante de Extractos de Flavonoides de Cáscara de Naranja en el Aceite de Soja Desodorizado. *Interciencia*, 29(9), 176–185.
- Moulehi, I., Bourgou, S., Ourghemmi, I., & Tounsi, M. (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 74-80.
- Myasnikov, V., Ivanov, E., & Sakanyan, E. (2010). Determining the Kinetic Characteristics of Plant Raw Material Extraction by Repercolation. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 44(4), 202-204.
- Natarajan, N., Thamaraiselvan, R., Lingaiah, H., Srinivasan, P., & Periyasamy, B. (2011). Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 1, 207-215.

- Neves, A., Chinali, M., & Sala, M. (2010). Effects of Green Tea Use on Wound Healing. *International Journal of Morphology*, 3, 905-910.
- Nijveldt, R., Nood, E., Hoorn, D., Boelens, P., Norren, K., & Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418–425.
- NMX-BB-040-SCFI-1999. (s.f.). Determinacion de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.
- NMX-BB-040-SCFI-1999. (s.f.). Determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas.
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., & Ohta, H. (2006). Flavonoid composition of fruit tissues if citrus species. *Bioscience and Biotechnology Biochemistry*, 70, 178-192.
- NOM-111-SSA1-1994. (s.f.). Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NOM-112-SSA1-1994. (s.f.). Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número Más Probable.
- NOM-113-SSA1-1994. (s.f.). Método para la Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en Placa.
- NOM-114-SSA1-1994. (s.f.). Metodo para la determinacion de samonella en alimentos.
- NOM-115-SSA1-1994. (s.f.). Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos.
- Ochoa, C., & Ayala, A. (2004). Los Flavonoides: Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. *Ingeniería y Competitividad*, 6(2), 93-104.
- Oikeh, E., Omoregie, E., Oviasogie, F., & Oriakhi, K. (2016). Phytochemical, antimicrobial, and antioxidant activities of different citrus juice concentrates. *Food Science and Nutrition*, 4(1), 103-109.
- Omar, J., Alonso, I., Garaikoetxea, A., & Etxebarria, N. (2013). Optimization of Focused Ultrasound Extraction (FUSE) and Supercritical Fluid Extraction (SFE) of Citrus Peel Volatile Oils and Antioxidants. *Food Analytical Methods*, 6, 1244-1252.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619-4626.

- Özçelik, B., Kartal, M., & Orhan, I. (2011). Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical Biology*, 49(4), 396–402.
- Pająk, P., Socha, R., Gałkowska, D., & Rożnowski, J. (2014). Phenolic profile and antioxidant activity in selected seeds and sprouts. *Food Chemistry*, 143, 300-306.
- Palacios-Espinosa, F., Escobedo-Hinojosa, W., & Romero, I. (2011). Panorama actual del estudio de las plantas con actividad antiHelicobacter. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 14(1), 51-61.
- Pan, Z., Li, Y., Deng, X., & Xiao, S. (2014). Non-targeted metabolomic analysis of orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) wild type and bud mutant fruits by direct analysis in real-time and HPLC-electrospray mass spectrometry. *Metabolomics*, 10, 508-523.
- Papetti, A. (2012). Isolation and characterization of antimicrobial food components. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 168–173.
- Patil, J., Murthy, K., Jayaprakasha, G., Chetti, M., & Patil, B. (2009). Bioactive Compounds from Mexican Lime (*Citrus aurantifolia* Juice Induce Apoptosis in Human Pancreatic Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10933–10942.
- Pekal, A., Drozd, P., Biesaga, M., & Pyrzynska, K. (2011). Evaluation of the antioxidant properties of fruit and flavoured black teas. *European Journal of Nutrition*, 50, 681-688.
- Pernice, R., Giuseppina Borriello, G., Ferracane, R., Borrelli, R., Cennamo, F., & Ritieni, A. (2009). Bergamot: A source of natural antioxidants for functionalized fruit juices. *Food Chemistry*, 112, 545–550.
- Prasain, J., Wang, C., & Barnes, S. (2004). Mass Spectrometric Methods for the Determination of Flavonoids in Biological Samples. *Free Radical Biology & Medicine*, 37(9), 1324–1350.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513-523.
- Procházková, D., Boušová, I., & Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82, 513-523.
- Protti, M., Valle, F., Poli, F., Raggi, M., & Mercolini, L. (2015). Bioactive molecules as authenticity markers of Italian Chinotto (*Citrus x myrtifolia*) fruits and beverages. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 104, 75–80.
- Quiros, A., Ayala, J., Olivas, G., & Gonzalez, G. (2014). Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *Journal of Food Science and Technology*, 51(9), 1674-1685.

- Quirós, A., Ayala, J., Sayago, S., Velez, R., Sañudo, J., & Gonzalez, G. (2014). Added dietary fiber affects antioxidant capacity and phenolic compounds content extracted from tropical fruit. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, *87*, 227-233.
- Ramful, D., Baborun, T., Bourdon, E., Tarnus, E., & Aruoma, O. (2010). Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of Mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. *Toxicology*, *278*, 75-87.
- Ramful, D., Tamus, E., Aruoma, O., Bourdon, E., & Baborun, T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, *44*, 2088-2099.
- Ramirez, M., Mendoza, J., Arreola, R., & Ordaz, C. (2010). Flavonoides con actividad antiprotozoaria. *47*(1), 6-21.
- Rapisarda, P., Bellomo, S., Fabroni, S., & Russo, G. (2008). Juice Quality of Two New Mandarin-like Hybrids (Citrus clementina Hort. ex Tan x Citrus sinensis L. Osbeck) Containing Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 2074–2078.
- Rapisarda, P., Pannuzzo, P., Romano, G., & Russo, G. (2003). Juice Components of a New Pigmented Citrus Hybrid Citrus sinensis (L.) Osbeck x Citrus clementina Hort. ex Tan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 1611-1616.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical & Medicine*, *26*(9), 1231-1237.
- Ribeiro, I., & Ribeiro, M. (2008). Naringin and naringenin determination and control in grapefruit juice by a validated HPLC method. *Food Control*, *19*, 432–438.
- Rice, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, *2*(4), 152-159.
- Rodriguez, M., Lugo, E., Winterhalter, P., & Jerz, G. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in peels of Citrus limetta Risso by combination of preparative high-speed countercurrent chromatography and LC–ESI–MS/MS. *Food Chemistry*, *158*, 139-152.
- Rojas, J., Perea, A., & Stashenko, E. (2009). Obtención de Aceites Esenciales y Pectinas a partir de Subproductos de Jugos Cítricos. *Vitae*, *16*(1), 110-115.
- Roowi, S., & Crozier, A. (2011). Flavonoids in Tropical Citrus Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 12217-12225.
- Russo, M., Bonaccorsi, I., Torre, G., Saro, M., Dugo, P., & Modello, L. (2014). Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fiber: Availability in lemon's by-products. *Journal of Functional Foods*, *9*, 18-26.

- Ryan, K., & Ray, C. (2004). *Sherris Medical Microbiology*. McGraw Hill.
- Sandhar, H., Knmar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., & Sharma, P. (2011). A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 25-41.
- Sandoval-Montemayor, N., García, A., Elizondo-Treviño, E., Garza-González, E., Alvarez, L., & Camacho-Corona, M. (2012). Chemical Composition of Hexane Extract of Citrus aurantifolia and Anti-Mycobacterium tuberculosis Activity of Some of Its Constituents. *Molecules*, 17, 11173-11184.
- Sanfélix, G., Peiró, S., Librero, J., Ausejo, M., Suárez, C., Molina, T., . . . Castaño, E. (2010). Análisis Poblacional por Áreas de Salud de las Variaciones en Consumo, Precio y Gasto de Medicamentos Cardiovasculares en 8 Comunidades Autónomas, España, 2005. *Revista Española de de Salud Pública*, 84, 389-407.
- Sarkar, D., & Shetty, K. (2014). Metabolic Stimulation of Plant Phenolics for Food Preservation and Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 395-413.
- Scordino, M., Sabatino, L., Belligno, A., & Gagliano, G. (2011). Flavonoids and furocoumarins distribution of unripe chinotto (Citrus 3 myrtifolia Rafinesque) fruit: beverage processing homogenate and juice characterization. *European Food Research and Technology*, 233, 759-767.
- Seyoum, A., Asres, K., & El-Fiky, F. (2006). Structure–radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry*, 67, 2058–2070.
- Sharma, S., Kori, S., & Parmar, A. (2015). Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices. *Food Chemistry*, 185, 284-288.
- Soto, A., Gutierrez, A., Losso, J., Xu, Z., & Finley, J. (2012). Evolution of Phenolic Compounds from Color and Flavor Problems to Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6658-667.
- Soto, M., Moure, A., Dominguez, H., & Parajo, J. (2011). Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review. *Journal of Food Engineering*, 105, 1-27.
- Srinivasan, S., & Pari, L. (2013). Antihyperlipidemic effect of diosmin: A citrus flavonoid on lipid metabolism in experimental diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 5, 484-492.
- Stobiecki, M. (2000). Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 54, 237-256.
- Stobiecki, M. (2000). Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry*, 54, 237±256.

- Sun, Y., Qiao, L., Shen, Y., Jiang, P., Chen, J., & Ye, X. (2013). Phytochemical Profile and Antioxidant Activity of Physiological Drop of Citrus Fruits. *Journal of Food Science*, 78(1), C37-C42.
- Sun, Y., Wang, J., Gu, S., Liu, Z., Zhang, Y., & Zhang, X. (2010). Simultaneous Determination of Flavonoids in Different Parts of Citrus reticulata 'Chachi' Fruit by High Performance Liquid Chromatography—Photodiode Array Detection. *Molecules*, 15, 5378-5388.
- Tadeo, F., Cercos, M., Colmenero, J., Iglesias, D., Naranjo, M., Rios, G., . . . Talon, M. (2008). Molecular Physiology of Development and Quality of Citrus. *Advances in Botanical Research*, 47, 147-223.
- Tanaka, M., Takamizu, A., Hoshino, M., Sasaki, M., & Goto, M. (2012). Extraction of dietary fiber from Citrus junos peel with subcritical water. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 180-186.
- Tapas, A., Sakarkar, D., & Kakde, R. (2008). Flavonoids as Nutraceuticals: A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(3), 1089-1099.
- Tham, M., & Liew, K. (2014). Influence of different extraction temperatures and methanol solvent percentages on the total phenols and total flavonoids from the heartwood and bark of Acacia auriculiformis. *European Journal of Wood and Wood Products*, 72, 67-72.
- Tong, L., Zhou, D., Gao, J., Zhu, Y., Sun, H., & Bi, K. (2012). Simultaneous determination of naringin, hesperidin, neohesperidin, naringenin and hesperetin of Fractus aurantii extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 58, 58-64.
- Tounsi, M. S., Moulehi, I., Ouerghemmi, I., & Mejri, H. (2011). Changes in Lipid Composition and Antioxidant Capacity of Bitter Orange (Citrus aurantium. L) and Mandarin (Citrus reticulata Blanco) Oilseeds on Different Stages of Maturity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 961-966.
- Tounsi, M., Wannes, W., Ouerghemmi, I., Jegham, S., Njima, Y., Hamdaoui, G., . . . Marzouk, B. (2010). Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 142-151.
- Tripoli, E., LaGuardia, M., Giammanco, S., DiMajo, D., & Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chemistry*, 104, 466-479.
- Valero, A., Carrasco, E., Perez, F., Garcia, R., & Zurera, G. (2006). Growth/no growth model of Listeria monocytogenes as a function of temperature, pH, citric acid and ascorbic acid. *European Food Research and Technology*, 224, 91-100.

- Vikram, A., Jayaprakasha, G., Jesudhasan, P., Pillai, S., & Patil, B. (2010). Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*, *109*, 515–527.
- Vinson, J. A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *49*, 5315-5321.
- Vollmerhausen, T., Ramos, N., Thi, D., Dzung, N., & Brauner, A. (2013). Decoctions from Citrus reticulata Blanco seeds protect the uroepithelium against Escherichia coli invasion. *Journal of Ethnopharmacology*, *150*, 770–774.
- Wang, H., Chen, G., Guo, X., Abbasi, A., & Liu, R. (2016). Influence of the stage of ripeness on the phytochemical profiles, antioxidant and antiproliferative activities in different parts of Citrus reticulata Blanco cv. Chachiensis. *Food Science and Technology*, *69*, 67-75.
- Wang, S., Chen, P., Jiang, W., Wu, L., Chen, L., Fan, X., . . . Cheng, Y. (2014). Identification of the effective constituents for anti-inflammatory activity of Ju-Zhi-Jiang-Tang, an ancient traditional Chinese medicine formula. *Journal of Chromatography A*, *1348*, 105-124.
- Wang, Y., Chuang, Y., & Hsu, H. (2008). The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, *106*, 277–284.
- Wang, Y., Chuang, Y., & Ku, Y. (2007). Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. *Food Chemistry*, *102*, 1163–1171.
- Winkel, B. (2001). Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiology*, *126*, 485-493.
- Wu, T., Cheng, D., He, M., Pan, S., Yao, X., & Xu, X. (2013). Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from Citrus reticulata Blanco peel against Aspergillus niger. *Food Control*, *35*, 354-359.
- Xi, W., Fang, B., Zhao, Q., Jiao, B., & Zhou, Z. (2014). Flavonoid composition and antioxidant activities of Chinese local pummelo (Citrus grandis Osbeck.) varieties. *Food Chemistry*, *161*, 230-238.
- Xi, W., Zhang, Y., Sun, Y., Shen, Y., & Zhou, Z. (2014). Phenolic composition of Chinese wild mandarin (Citrus reticulata Blanco.) pulps and their antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, *52*, 466-474.
- Xu, G., Liu, D., Chen, J., Ye, X., Ma, Y., & Shi, J. (2008). Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. *Food Chemistry*, *106*, 545–551.
- Yáñez, X., Lugo, L., & Parada, D. (2007). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (Citrus sinensis, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia). *Bistua*, *5*(1), 3-8.

- Ye, X., Chen, J., Liu, D., Jiang, P., Shi, J., Xue, S., . . . Kakuda, Y. (2011). Identification of bioactive composition and antioxidant activity in young mandarin fruits. *Food Chemistry*, *124*, 1561-1566.
- Yi, Z., Yu, Y., Liang, Y., & Zeng, B. (2008). In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its main flavonoids. *LWT Food Science and Technology*, *41*, 597-603.
- Yilmaz, H., Tacyildiz, I., Keles, C., Gedik, E., & Kilinc, N. (2005). Micronized purified flavonoid fraction may prevent formation of intraperitoneal adhesions in rats. *Fertility and Sterility*, *84*(2), 1083-1088.
- Yoo, K., & Moon, B. (2016). Comparative carotenoid compositions during maturation and their antioxidative capacities of three citrus varieties. *Food Chemistry*, *196*, 544-549.
- Yoo, K., Hwang, I., Park, J., & Moon, B. (2009). Major Phytochemical Composition of 3 Native Korean Citrus Varieties and Bioactive Activity on V79-4 Cells Induced by Oxidative Stress. *Journal of Food Science*, *74*(6), C462-C468.
- Yu, E., Kim, G., Jeong, S., Park, S., Lee, S., Kim, J., . . . Shin, S. (2014). Flavonoid profile and biological activity of Korean citrus varieties (II): Pyunkyul (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) and overall contribution of its flavonoid antioxidant effect. *Journal of Functional Foods*, *6*, 637-642.
- Yu, M., Lou, S., Chiu, E., & Ho, C. (2013). Antioxidant activity and effective compounds of immature calamondin peel. *Food Chemistry*, *136*, 1130-1135.
- Zang, L., Shimada, Y., Kawajiri, J., Tanaka, T., & Nishimura, N. (2014). Effects of Yuzu (*Citrus junos* Siebold ex Tanaka) peel on the diet-induced obesity in a zebrafish model. *Journal of Functional Foods*, *10*, 499-510.
- Zhang, J., Zhang, Q., Zhang, H., Ma, Q., Lu, J., & Qiao, Y. (2012). Characterization of Polymethoxylated Flavonoids (PMFs) in the Peels of 'Shatangju' Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) by Online High- Performance Liquid Chromatography Coupled to Photodiode Array Detection and Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 9023-9034.
- Zhang, M., Duan, C., Zang, Y., Huang, Z., & Liu, G. (2011). The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chemistry*, *129*, 1530-1536.
- Zhang, M., Nan, H., Wang, Y., Jiang, X., & Li, Z. (2014). Comparison of Flavonoid Compounds in the Flavedo and Juice of Two Pummelo Cultivars (*Citrus grandis* L. Osbeck) from Different Cultivation Regions in China. *Molecules*, *19*, 17314-17328.

- Zhang, W., Jiang, S., Qian, D., Shang, E., & Duan, J. (2014). Determination of Metabolism of Neohesperidin by Human Intestinal Bacteria by UPLC-Q-TOF/MS. *Chromatographia*, 77, 439-445.
- Zhang, Y., Sun, Y., Xi, W., Shen, Y., Qiao, L., Zhong, L., . . . Zhou, Z. (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chemistry*, 145, 674-680.