



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN ESQUEMA DE EXTRACCION
DE COMPUESTOS LIMONOIDES A PARTIR DE
RESIDUOS DE LIMON MEXICANO (*Citrus aurantifolia*
Swingle)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

ISRAEL CAMPOS RUIZ



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Israel Campos Ruiz

FECHA: 10-Marzo-2004

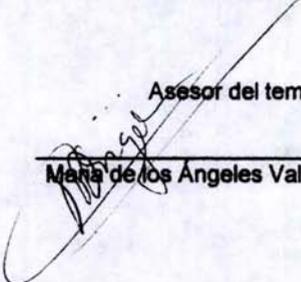
FIRMA: Campos Ruiz Israel

JURADO ASIGNADO

Presidente	Profesora Francisca Iturbe Chifias
Vocal	Profesora Maria de los Angeles Valdivia López
Secretario	Profesor Luis Orlando Abrajan Villaseñor
1er Suplente	Profesora Claudia Lucia Mancilla Ascencio
2do Suplente	Profesora Maria Teresa Plata Jiménez

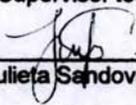
Sitio donde se desarrollo el tema: Laboratorios 322-323 Departamento de Biotecnología Edificio "E" Facultad de Química

Asesor del tema



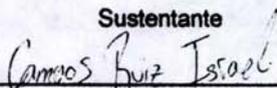
Maria de los Angeles Valdivia López

Supervisor técnico



B. Julieta Sandoval Guillén

Sustentante



Israel Campos Ruiz

A mis padres:

Marcos y Ma. Hipólita

Por estar siempre conmigo y con mucho
esfuerzo y paciencia me han llevado
hasta lo que soy.

A mi directora de tesis
M. en C. Maria de los Ángeles Valdivia
Por el empeño que tuvo para la
realización de este trabajo.

Con respeto y agradecimiento a quienes
estuvieron durante la colaboración de
mi meta profesional.

Julieta Sandoval

Fanny Iturbe

Orlando Abrajan.

A Carla

Con un especial cariño, te agradezco
haber estado en todo momento.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
CAPITULO I. ANTECEDENTES	3
1.1 Origen del limón	3
1.1.1 Descripción del árbol	
1.1.2 Descripción botánica	4
1.1.3 Producción mundial y exportación de cítricos	5
1.1.4 Partes que conforman al fruto	7
1.1.5 Composición química del limón	8
1.1.6 Producción nacional del limón	9
1.1.7 Aprovechamiento del limón	11
1.2 Alimentos funcionales	12
1.3 Terpenos	16
1.3.1 Limonoides	
1.3.2 Biosíntesis de los limonoides	22
1.3.3 Acción de los limonoides	24
1.3.4 Limonoides como quimiotaxonómicos	25
1.4 Extracción y cuantificación de limonoides	26
1.4.1 Solubilidad	
1.4.2 Extracción	
1.4.3 Cuantificación por cromatografía	27
CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL	
2.1 Esquema general de trabajo	29
2.2 Obtención y acondicionamiento de la muestra	30
2.3 Extracción de limonoides	31
2.3.1 Esquema de extracción de limonoides	32

2.4 Purificación de limonoides	33
2.5 Determinación de las condiciones cromatográficas	34
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 Acondicionamiento de La muestra	35
3.2 Optimización de las condiciones de extracción	37
3.3 Optimización del análisis cromatográfico de los limonoides	39
3.4 Cuantificación de los limonoides	44
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO I	54
ANEXO II	61

INTRODUCCION.

En el mercado nacional de cítricos, el limón (*Citrus uarantifolia Swingle*) ocupa el segundo puesto en producción después de la naranja. El 70% de la producción corresponde a limón agrio y el 30% restante al llamado limón persa o sin semilla. Así mismo alrededor del 70% de la producción total es consumida en el país.

En la actualidad el aprovechamiento del limón se limita al uso del jugo dejando de lado otros componentes, dentro de los cuales se encuentra la semilla, que además de tener una gran cantidad de aceites esenciales, presenta una serie de compuestos fitoquímicos que son de gran interés debido a su bioactividad en el metabolismo proporcionando beneficios a la salud.

Los limonoides son fitoquímicos de gran importancia ya que proporcionan protección al tejido pulmonar, actuando también como agentes quimiopreventivos específicos y terapéuticos.

Hasta el momento existen reportes que han caracterizado y cuantificado los limonoides en algunas especies de cítricos, principalmente en el jugo, sin embargo falta reunir evidencia en relación a otras partes del limón donde se cree existen en mayor cantidad.

Estos fitoquímicos (limonoides) pueden ser aprovechados a través de los llamados alimentos funcionales, e incluso se pueden utilizar como quimiotaxonómicos en las variedades del limón debido a sus propiedades particulares.

Este trabajo tiene como objetivo aportar información básica para siguientes investigaciones, observando el efecto del estado de madurez sobre la concentración de estos compuestos y dar una alternativa donde se aproveche un residuo como la semilla, que no tiene ningún uso actualmente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer la influencia del estado de madurez en la concentración de los compuestos limonoides presentes en la semilla de limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*), para dar un aprovechamiento integral al fruto.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer condiciones de extracción para la obtención de limonoides a partir de la semilla de limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*).
- Desarrollar un esquema cromatográfico (HPLC) para la separación y cuantificación de limonoides de semilla de limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*).

CAPITULO I ANTECEDENTES

1.1 ORIGEN DEL LIMÓN.

Los llamados cítricos, constituyen un género (*Citrus*) que forma parte de la familia de las rutáceas y conforman varias especies, entre ellas: las naranjas (*Citrus sinensis*, *citrus aurantium*), los limones (*Citrus limón*); las mandarinas (*Citrus reticulata*, *citrus reshmi*) y las toronjas (*Citrus paradisi Maef*). El origen del género *Citrus* se sitúa en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago Indomalayo hasta Nueva Guinea. Las primeras variedades e híbridos de cítricos fueron el resultado de un largo proceso de identificación, colecta y reproducción de plantas silvestres.

En relación con el origen geográfico de las distintas especies, la naranja y la mandarina parecen provenir de China e Indochina. El pomelo, probable ancestro de la toronja, aunque más dulce que ésta, proviene de Malasia e Indonesia donde se daban de manera silvestre; posteriormente se realizó un cruzamiento natural de naranjo dulce y pomelo, en Barbados (Indias Occidentales) alrededor de 1700. Aunque existen serias dudas en lo que concierne a la determinación del lugar exacto de origen del limonero, la idea general es designar su procedencia en países del Sudeste Asiático y Malasia.

Los árabes introdujeron la naranja y el limón en la región africana del Mediterráneo hacia el siglo X, pero no fue hasta los albores del año 1400, después de los viajes de Marco Polo a China (1287), cuando los portugueses introdujeron el naranjo en el hoy mediterráneo europeo. La variedad dulce la difundieron los comerciantes genoveses en el siglo XV. En 1556, los españoles la llevan a América, plantando naranjos en Florida y California, actualmente uno de los mayores productores del mundo. (Agrocadenas, 2002).

1.1.1 DESCRIPCIÓN DEL ÁRBOL.

Limonero: Nombre común de un pequeño árbol espinoso, que produce el fruto llamado limón. El limonero se cultiva en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, sobre todo en Italia, España, Portugal y Estados Unidos. La planta viaja desde

Oriente hasta España y el norte de África durante la edad media. Es posible que el limonero cultivado sea un híbrido de dos especies silvestres, la lima y el cidro.

El limonero alcanza entre 3 y 6 metros de altura y está cubierto de follaje. La flor tiene cinco sépalos, cinco pétalos, numerosos estambres y un solo pistilo. Los pétalos son blancos por el haz y rosados por el envés. La flor exhala un aroma agradable parecido al de la flor del naranjo, pero menos acusado.

Casi todas las variedades cultivadas de limonero son híbridos que apenas producen semillas. Por tanto, en la horticultura comercial el limonero se multiplica injertando yemas de esta especie en patrones de alguna otra próxima como el naranjo, el pomelo o toronja. Los árboles se plantan en suelo fértil, que se abona continuamente. Las plantas se colocan a una distancia entre 5 y 8 metros, según la variedad, el clima y la topografía. Salvo que las temperaturas extremas retrasen la floración, se producen frutos durante todo el año. Éstos se recolectan verdes, casi a punto de madurar, entre seis y diez veces al año, y se dejan madurar a temperatura moderadamente cálida. Un árbol adulto puede rendir entre 1000 y 2000 frutos al año. (Primo, 1982).

1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Rutáceas: Nombre común de una familia de un tamaño mediano de plantas con flores, en su mayor parte arbustos y árboles. Engloba unas 1,700 especies agrupadas en 161 géneros. La familia es de gran importancia económica. A ella pertenecen los cítricos, y de muchos miembros de esta familia se extraen compuestos químicos utilizados en curtiduría, medicina y perfumería.

El limón es una baya de forma elíptica, que termina por lo general en un mamelón apical. La coloración va desde verde hasta amarillo intenso, según el color se puede determinar en cierta forma el estado de madurez del limón. (Infoagro, 2003).

Nombre científico: *Citrus aurantifolia* Swingle.

Familia: Rutáceas.

Género: Citrus.

Especie: Citrus limón.

Fruto: Hesperidio

Requerimiento de suelo: Textura franco arenosa y arcillosa, 6.2-7.5 pH

Temperatura óptima de cosecha: 18-30°C (Praloran, 1977).

1.1.3 PRODUCCION MUNDIAL Y EXPORTACIÓN DE CÍTRICOS.

Dentro de las frutas que se cultivan en el mundo, los cítricos tienen un papel relevante en la dieta de los consumidores, destacando entre éstos la naranja como la más importante, seguida de otras frutas como la mandarina, el limón, las limas y la toronja, entre otras. Siendo uno de los cítricos de especial importancia el limón, producto que ha registrado un fuerte incremento en la producción mundial, síntoma de la importancia que ha retomado en las preferencias de los consumidores. Se puede destacar, que el principal incremento en la producción de limón se ha registrado en los países denominados en vías de desarrollo, porque al contar con las condiciones climatológicas idóneas y un importante mercado en expansión, han canalizado sus esfuerzos para hacer más productivo el sector y contribuir con la entrada de divisas. (Infoaserca, 1995).

Los principales productores de cítricos en el mundo son Brasil y Estados Unidos, participando respectivamente con el 22.6% y 15.6% de la producción mundial. Le siguen en importancia China, México, España e India, representando en conjunto el 25.98% del total mundial. Estos seis países son responsables por el 64.17% del total. (Infoagro, 2003). La tabla (1) muestra que México presenta la mayor tasa de crecimiento anual a nivel mundial.

PUESTO	PAÍS	PRODUCCION	TASA ANUAL DE CRECIMIENTO DE PRODUCCION	PRODUCCIÓN ACUMULADA 1997-2001 (TONELADAS)
1	Brasil	22.6%	0.6%	108306948
2	Estados Unidos	15.6%	3.6%	74625730
3	China	10.0%	5.9%	47705499
4	México	5.9%	6.2%	28075436
5	España	5.7%	1.4%	27461258
6	India	4.4%	5.9%	21234000

Tabla (1). Fuente: FAO según la producción acumulada para el periodo 1997-2001.

EXPORTACIONES

La tendencia mundial de las exportaciones de cítricos, indica que hay un alto consumo interno. Solo el 9.08% de la producción mundial se exportó en el 2000. (Infoagro, 2003). En la tabla (2) se muestra que España es el principal país exportador de cítricos.

DISTRIBUCIÓN DE LA EXPORTACIÓN MUNDIAL

PAÍS	PORCENTAJE
España	34%
Estados Unidos	13%
Argentina	11%
Turquía	8%
México	8%
Países Bajos	7%

Tabla (2). Fuente: FAO 1996-2000.

1.1.4 PARTES QUE CONFORMAN AL FRUTO.

Flavedo: Es el tejido exterior que está en contacto con la epidermis y en el abundan vesículas o celdillas que contienen lípidos, aceites esenciales y cloroplastos.

Albedo: Se encuentra debajo del flavedo: Es un tejido esponjoso, blanco y celulósico, el cual constituye la mayor parte de la corteza. El mismo tejido forma el corazón o eje central del fruto y ambos contienen los vasos que proporcionan agua y materiales nutritivos.

Endocarpio: Es la parte comestible de los cítricos, y está formado por los carpelos o gajos que a su vez, están separados por las membranas inter capilares. Al prensar estas vesículas, se separa el zumo que contiene componentes solubles y partículas en suspensión tales como: colorantes, tejidos que se encuentran desintegrados y pectinas, entre otros. La pulpa y el bagazo queda al extraer el zumo, contiene la mayor parte fibrosa y celulósica de las vesículas, y por tal motivo, retienen una gran cantidad de zumo. (Fennema 1995).

Semillas: De cubierta dura, lignocelulósica, están usualmente situadas dentro de dos filas en el endocarpio justo alrededor del eje central. Cada segmento contiene algunas semillas. En la tabla (5) se muestra la composición de una semilla fresca de cítrico. Las semillas de cítricos contienen una considerable cantidad de proteínas que algunas veces llega a 16% en base seca. Las semillas contiene solo un tipo de proteína, definidas como globulinas. Es interesante el aspecto de que la semilla contiene una alta cantidad de aceite, el cual es utilizado comercialmente. (Braverman, 1997).

En la tabla (3) se muestra la proporción de las partes que conforman a un cítrico.

PROPORCIÓN DE LAS PARTES QUE CONFORMAN UN CÍTRICO

COMPONENTE	PORCENTAJE
Flavedo	8-10 %
Albedo	15-30 %
Endocarpio jugo	40-45 %
Pulpa y bagazo	20-30 %
Semilla	0.4 %

Tabla (3) (Fennema1995).

1.1.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL LIMÓN

Agua	91.7g
Proteína	0.3g
Grasa	0.6g
Carbohidratos	6.9g
Vitamina C	61mg
Calcio	11mg
Potasio	176mg
Fósforo	10mg
Calorías	20kcal

Tabla (4). Por 100g de limón fresco. (Infoagro, 2003).

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE SEMILLA FRESCA.

AGUA	44.6-39.0%
GRASA	19.5-25.5%
NITRÓGENO	1.7-1.3%
PROTEÍNA CRUDA	10.6-8.6%
FIBRA	4.6-7.2%
COMPUESTOS NO NITROGENADOS	18.7-17.2%
CENIZAS	1.7-2.3%

Tabla (5). (Braverman, 1997).

Cuando está seca la semilla contiene entre 30 y 35% de aceite, y ocasionalmente llega a 50%. La grasa puede ser expresada de acuerdo con el disolvente utilizado en la extracción, y aunque un poco de sabor amargo es aceptable en los alimentos, después es apropiado la purificación y blanqueado. (Braverman, 1997).

La composición de ácidos grasos se muestra en la tabla (6) donde se puede ver el alto contenido de palmítico en cuanto a ácidos grasos saturados se refiere y la mayoría de ácidos grasos insaturados lo constituyen el linoleico y oleico.

COMPOSICIÓN DE ACIDOS GRASOS EN SEMILLAS DE CÍTRICOS

ACIDOS GRASOS SATURADOS	
Palmítico	20.7%
Esteárico	4.7%
Araquidónico	0.9%
ACIDOS GRASOS INSATURADOS	
Linolenico	0.6%
Linoleico	36.5%
Oleico	36.6%

Tabla (6). (Braverman, 1997).

1.1.6 PRODUCCIÓN NACIONAL DE LIMON.

El limón ocupa dentro de los cítricos el segundo lugar en importancia, tanto por su consumo en fresco como por su uso industrial. Dentro del contexto mundial, México está considerado como el principal país productor en las variedades de limón persa y mexicano.

Limón persa (sin semilla): Costa del Golfo (Veracruz, Tabasco y Yucatán).

La región contribuye con 30% de la producción total.

Se dedica casi exclusivamente a la exportación.

Limón mexicano (con semilla): Costa del Pacífico (Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero y Oaxaca).

La región contribuye con 70% de la producción Nacional.

Es principalmente para el consumo doméstico.

(Infoaserca, 1995).

Entre 1990 y 2000 en el país, el promedio anual de la superficie cosechada de limón mexicano (con semilla) fue de 850094 hectáreas, con un promedio anual de producción de 893000 toneladas. Los principales estados productores han sido Colima y Michoacán. En la tabla (7) se muestran los principales productores de limón mexicano en el país, así como el rendimiento en el año 2000. (SAGARPA, 2001).

VOLUMEN DE PRODUCCIÓN DEL LIMÓN MEXICANO

ESTADO	PROMEDIO ANUAL 1990-2000 (Toneladas)	PARTICIPACIÓN %	RENDIMIENTO (Ton/ Ha) del año 2000
Colima	325000	35	18.8
Guerrero	63000	8	8.0
Jalisco	12000	1	11.6
Michoacán	220000	25	11.8
Oaxaca	152000	17	11.7
Tabasco	11000	1	7.9
Tamaulipas	18000	2	10.6
Veracruz	84000	9	9.2
Otros	35000	2	
Total	893000	100	

Tabla (7). (SAGARPA, 2001).

La producción nacional del limón mexicano registra una marcada estacionalidad, con el 50-60% de la producción cosechada en los meses de mayo a septiembre. (SAGARPA, 2001).

1.1.7 APROVECHAMIENTO DEL LIMÓN.

Las regiones tropicales y subtropicales se caracterizan por la inmensa variedad de especies vegetales que crecen de forma natural. Determinadas especies vegetales producen compuestos químicos específicos que no se encuentran en otras especies. Estos compuestos (fitoquímicos) se caracterizan por la gran dificultad de ser obtenidos por vía sintética así como poseer actividad biológica y tener propiedades de uso industrial. Por tal motivo en la actualidad se están desarrollando investigaciones enfocadas a la evaluación de los productos y subproductos agrícolas, así como la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento.

En este sentido, es bien sabido que las semillas del limón constituye una materia prima importante para la obtención de productos de interés industrial; por lo que, en virtud del crecimiento de la producción cítrica en el país, los esfuerzos están encaminados al análisis de los productos que se obtienen de los desechos sólidos de la extracción del jugo de cítricos, a fin de establecer estrategias sustentables de aprovechamiento de los mismos.(Quijano, 2000).

El limón mexicano fresco prácticamente en su totalidad se consume en el país. La industria de procesamiento sólo adquiere 43000 toneladas de limón anual a un precio de \$550 pesos/tonelada. El aceite esencial destilado es el principal subproducto de exportación la cual se hace a través de grandes comercializadoras internacionales que a su vez lo venden a las grandes refresqueras de cola. En 1999 y 2000, las exportaciones de México a los Estados Unidos, principal comprador, fueron como promedio anual de 1197 toneladas (6597 tambos) con un valor promedio anual de US\$ 15.8 millones. El volumen y valor de estas exportaciones representaron el 76% de las importaciones totales de aceite destilado de *Citrus aurantifolia* realizadas por los Estados Unidos. (SAGARPA, 2001).

De la fruta fresca que será procesada se extrae el jugo: El cual es pasteurizado, concentrado, helado o deshidratado. (Infoaserca, 1995).

El aceite esencial destilado, se usa en la elaboración de jarabe que sirve de base para la elaboración de refrescos de cola y los de tipo lima-limón, sabores para galletas, dulces y medicamentos entre otros.

La Cáscara deshidratada de limón se obtiene de un proceso de deshidratación después de una extracción de jugo y aceite. Aproximadamente de este producto secundario se obtiene 12900 toneladas de cáscara fresca anualmente. El uso principal es para la obtención de pectina y antes de recibir el tratamiento de secado puede destinarse para la preparación de alimentos balanceados y forrajes. (SAGARPA, 2001).

1.2 ALIMENTOS FUNCIONALES.

No existe un acuerdo para definir en forma precisa lo que son "alimentos funcionales". Muchos consideran que se trata de un concepto aún en desarrollo y que bien podrían ser clasificados como productos intermedios entre los alimentos tradicionales y la medicina.

Los alimentos funcionales podrían definirse como "cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contiene componentes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona".

El interés del consumidor por obtener dietas óptimas para mantener una buena salud, por extender los años de vida, la desconfianza hacia los alimentos "procesados" y el aumento en el mercado de los alimentos "naturales" ha creado el estado de "revolución" tecno-científica de los "alimentos funcionales" o "alimentos diseñados" en la que cada vez mas participan. La base de los componentes a que se refiere la definición es eminentemente de origen vegetal o fitoquímica, aunque como excepción también están incluidos los suplementos prebióticos y probióticos. Los alimentos funcionales, los productos alimentarios y los suplementos de dieta que proveen un posible beneficio fisiológico en el control o la prevención de enfermedades representan una oportunidad para el desarrollo de nuevos productos.

La idea de los "alimentos funcionales" fue desarrollada en Japón durante la década de 1980s como una necesidad para reducir el alto costo de los seguros de salud que aumentaban por la necesidad de proveer cobertura a una población cada vez mayor en edad, gracias a los avances en cuidado médico y una buena nutrición. El término se refería a alimentos procesados conteniendo ingredientes que ayudan a ciertas funciones específicas del organismo además de ser nutritivos. Al momento, Japón es el único país que ha formulado un proceso regulatorio específico para la aprobación de estos productos. Conocidos como "alimentos para uso específico de salud" ("foods for specified health use" o FOSHU) estos alimentos son elegibles para llevar un sello de aprobación del Ministerio de Salud y Bienestar. Mas de 100 productos tienen licencia FOSHU en Japón.

En los Estados Unidos la categoría de alimentos funcionales no está legalmente reconocida. A pesar de esto, muchas organizaciones han propuesto definiciones para esta nueva área de las ciencias de los alimentos y de la nutrición. El Directorio de Alimentos y Nutrición de Instituto de Medicina ha definido a los alimentos funcionales como "cualquier alimento o ingrediente alimentario que pueda proporcionar beneficios de salud además de los tradicionalmente nutricionales" (Hasler, 1998).

El primer término usado para este tipo de alimentos en los Estados Unidos fue el de "alimentos diseñados", utilizado en 1989 por el Dr. Herbert Pierson, Director del Programa de Alimentos Diseñados del Instituto Nacional del Cáncer, para describir aquellos alimentos que contienen naturalmente o que son enriquecidos con componentes químicos, biológicamente activos pero no nutritivos, provenientes de plantas (fitoquímicos), efectivos en la reducción de los riesgos al cáncer. Ese mismo año, el Dr. Stephen DeFelice, Director de la Fundación de Medicina Innovativa, crea el término "nutracéutico" para referirse a "cualquier sustancia que pueda ser considerada como alimento o como parte de un alimento y que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención o el tratamiento de una enfermedad" (Vasconcellos, 1998).

Recientes trabajos de investigación científica han permitido clasificar a los "fitoquímicos" en grupos de acuerdo a sus funciones de protección biológica que ejercen, así como a sus características físicas y químicas. Tabla (8). (Vasconcellos, 1998).

<u>COMPONENTE</u>	<u>POSIBLES PROPIEDADES BENÉFICAS</u>	<u>FUENTES ALIMENTARIAS</u>
Bifidobacterias	Podrían favorecer la función gastrointestinal y la producción de vitamina B12 y vitamina K	Yogurt y otros productos lácteos
Súlfidos alílicos	Inhibición de síntesis de colesterol	ajo
<u>Acido α-linolénico</u>	Reduce la inflamación sistema inmunológico	soya, nueces y almendras
Carotenoides Antioxidantes	Protegen contra cáncer. Pueden ayudar a reducir la acumulación de plaquetas arteriales	Zanahorias, camotes, frutas cítricas, melones, espinaca, acelgas, duraznos, perejil
Catequinas	a una baja incidencia de cánceres intestinales. Pueden ayudar al sistema inmunológico y reducir el cáncer.	Muchos estudios las han relacionado Tés, cerezas
Cumarinas	Actividad como anticancerígeno	Zanahorias, frutas cítricas, perejil
Flavonoides	hormonas involucradas en la ocurrencia de cáncer	Zanahorias, frutas cítricas, col, pepinos, tomates, pimientos, berenjenas, productos de soya, cerezas, perejil
g-glutamil cisteína alílica	Posible función en reducción de la presión	Extracto de ajos
Indoles	desactivan el estrógeno	Col, col de bruselas
Isotiocianatos	Potentes inductores de enzimas protectoras	Mostaza, rábanos
Limonoides	Potentes inductores de enzimas protectoras	Frutas cítricas

<u>COMPONENTE</u>	<u>POSIBLES PROPIEDADES BENÉFICAS</u>	<u>FUENTES ALIMENTARIAS</u>
Licopeno	Previene cáncer de la próstata y cánceres cervicales)	Tomates, toronja roja, pimientos rojos, sandía
Monoterpenos	Antioxidantes de acción Inhiben la producción de colesterol y ayudan en la protección de la actividad de ciertas enzimas	Perejil, zanahorias, col, tomates, berenjenas, pimientos, frutas cítricas, granos integrales, cerezas, pepinos

Tabla (8).Substancias Naturales(Fitoquímicos) que Podrían Prevenir Enfermedades

1.3 TERPENOS.

Al no ser volátiles, los terpenos no son componentes olorosos de los aceites esenciales. Constituyen la mayor parte de la fracción no volátil de las oleorresinas; éstas son extractos con éter de tejidos de plantas resinosas. Las oleorresinas de varias verduras (pimientas, semillas de tomate, etc.) son valiosos concentrados de sabores. Químicamente se consideran como producto de la condensación de moléculas de Isopreno.

USO DE TERPENOS.

Ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en alimentos verdes, productos de soya y granos, constituyen una de las mas amplias clases de alimentos funcionales o fitonutrientes. Los terpenos funcionan como antioxidantes, protegiendo a los lípidos, a la sangre y a otros fluidos corporales contra el ataque de radicales libres, algunas especies de oxígeno reactivo, grupos hidroxilos, peróxidos y radicales superóxidos. Los terpenos mas intensamente estudiados son los carotenoides y los limonoides.(Dillar, 2000)

En estudios experimentales se ha demostrado que, los terpenos previenen la ocurrencia del cáncer en muchos sitios, incluyendo los pulmones, las glándulas mamarias, el colon, el estómago, la próstata, el páncreas, el hígado y la piel (American Institute for Cancer Research, 1996). Los terpenos expresan su actividad antitumorífica a través de una variedad de mecanismos. Importante entre éstos es su inhibición de la proliferación de células malignas por decrecimiento de la actividad de las proteínas oncogénicas ras. Un oncógeno es un gen causante de cáncer tales como los genes *H-ras* y *c-myc*. Cuando un oncógeno muta, dirige a una célula a sintetizar una proteína anormal que puede constituir un factor de crecimiento anormal o puede regular la actividad de una enzima que a su vez controla el crecimiento. La proteína anormal ordena a las células dividirse agresivamente de modo que el cáncer progresa a su vez a formas mas agresivas. La actividad de las enzimas que controlan el crecimiento a menudo envuelven reacciones de fosforilación, metilación e isoprenilación.

Los terpenos también causan un decrecimiento de la actividad de la enzima decarboxilasa de ornitina (DCO), esencial para la síntesis de poliaminas, importantes en

la proliferación celular; la inhibición de la DCO reduce las poliaminas y decrece la proliferación celular. Los terpenos son agentes antitumoríficos efectivos que tienen un futuro prometedor como drogas quimioterapéuticas.

1.3.1 LIMONOIDES.

Los limonoides son triterpenos que poseen una estructura simple policíclica, normalmente tetra o penta cíclica. Casi siempre hidroxilados en posición 3, presentan, al contrario de los demás terpenos, una unidad estructural bastante fuerte. Estos compuestos se encuentran en las familias de las rutaceas y meliaceas.

Los triterpenos constituyen el vínculo entre los terpenos y otras clases de sustancias liposolubles: los esteroides. (Bruneton, 1991).

De acuerdo a investigaciones anteriores, en las semillas de ciertos frutos cítricos se encuentran los terpenos llamados limonoides en grandes cantidades en relación a las otras partes de este. Figura (1). (Rousseff, 1982).

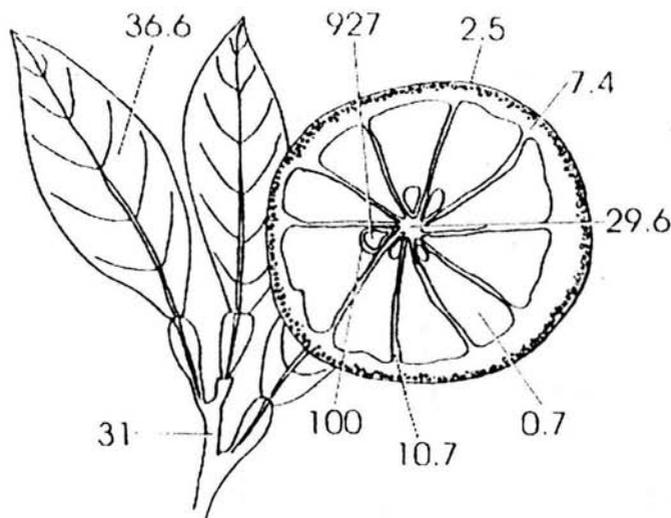


Figura (1) Distribución de limonin en el fruto y planta de un cítrico µg/100g de fruto (Berhow, et al, 2000).

Los limonoides son sustancias de sabor amargo, que poseen considerable interés en la tecnología de los cítricos. Se sabe que el jugo de naranjas de ombligo, que es dulce cuando está recién exprimido, se torna muy amargo si se le deja permanecer en contacto con la pulpa. El sabor amargo se desarrolla rápidamente si se calienta el jugo, por ejemplo como consecuencia de la pasteurización. Es debido a esto que las naranjas de ombligo no pueden emplearse como fuente comercial de jugo procesado. El mismo tipo de sabor amargo puede encontrarse en otras variedades de naranjas dulces, especialmente durante las primeras etapas de la maduración.

Se aisló el principio del sabor amargo de dichos jugos y lo identificó como limonin, una sustancia perteneciente a los limonoides de las semillas. Desde entonces, se ha acumulado una voluminosa literatura acerca de la estructura y bioquímica de limonin y su precursor (LARL). (Braverman, 1997).

ORIGEN BIOSINTETICO DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE COMPUESTOS SECUNDARIOS.

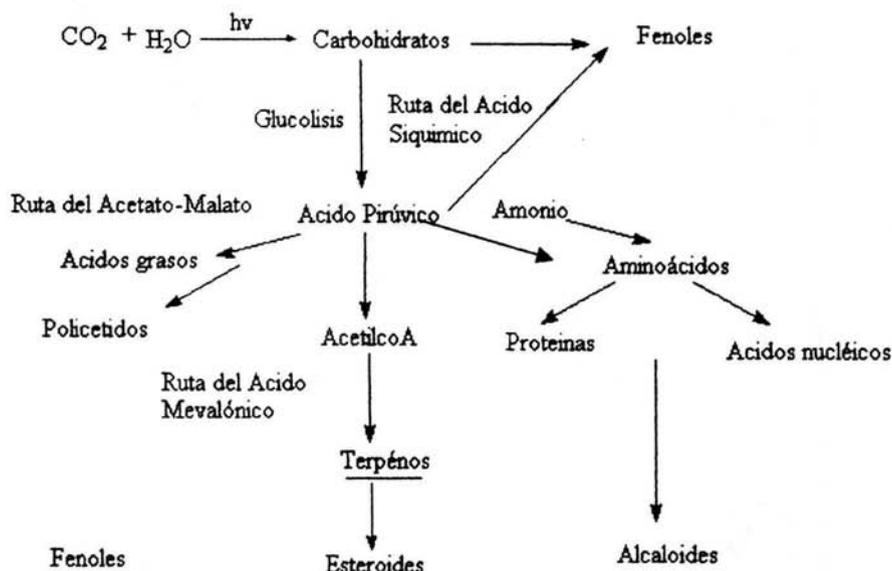


Figura (2). (Grosso S, et al, 2001).

Los limonoides son uno de los mayores metabolitos secundarios en los cítricos (Terres, 1994) (figura 2). La estructura característica de los limonoides es la de limonin. Figura (3). De forma natural los limonoides contenidos en cítricos están formados de un anillo furano unido a un anillo-D, con un grupo epoxido.

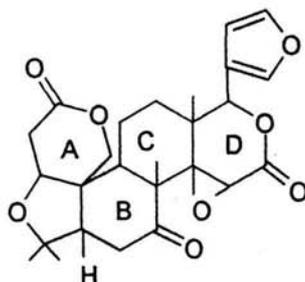


Figura (3). (Estructura básica de los limonoides de semilla de cítricos).(Yoshihiko, 1991).

Se han utilizado métodos para eliminar el amargor del zumo de naranja utilizando enzimas inmovilizadas de *Arthrobacter* sp. *Acinetobacter* sp. Los enzimas que sencillamente rompen la lactona del anillo D proporcionan únicamente una solución temporal al problema porque el anillo vuelve a cerrarse en condiciones ácidas. Sin embargo, el empleo de limonoato deshidrogenasa para invertir el compuesto resultante de la apertura del anillo D en el compuesto no amargo 17- dehidrolimonoato anillo A-lactona, proporciona un medio irreversible de eliminar el amargor del zumo de naranja, pero este proceso todavía no se ha comercializado.

El limonin no existe en cantidad alguna en los frutos intactos, pues la forma predominante es un derivado de la limonin insípido producido por hidrólisis enzimática de la lactona del anillo D de la limonin. Después de extraer el zumo, las condiciones ácidas favorecen el cierre del anillo D para formar limonin (Figura 4), produciéndose el fenómeno del sabor amargo retrasado, con consecuencias económicas muy graves. (Fennema, 1995).

El grado de amargor, por lo tanto, depende de la concentración de 17- dehidrolimonoato anillo A-lactona (LARL precursor de limonin) en la fruta. (Hideaki, 1995).

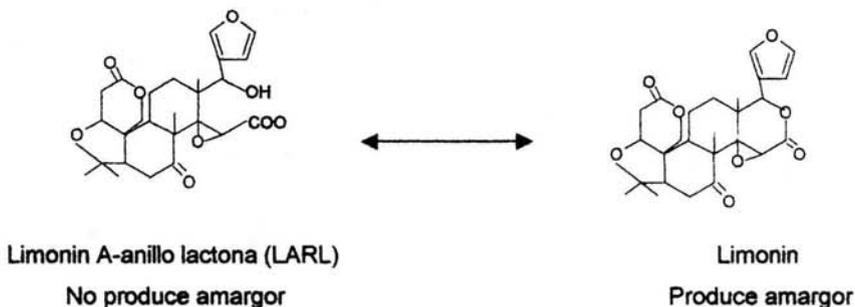


Figura (4)

Existen dos grupos de limonoides presentes en frutas cítricas: los aglucones y los correspondientes glucosilados, estos limonoides contienen una molécula de glucosa unida con un enlace β en posición 17 del limonoide. Entre 36 aglucones y 20 compuestos glucosilados se han aislado de frutas cítricas.

El limonin es el principal limonoide ya que representa entre el 80% del total de los limonoides aglucones. Se encuentran en menor cantidad nomilin (figura 5) y obacunone (figura 6).

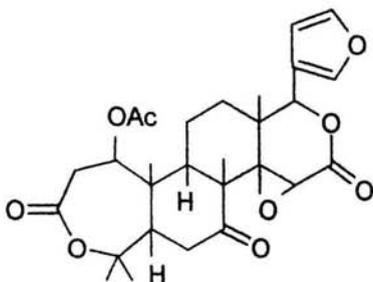


Figura (5), estructura de nomilin.

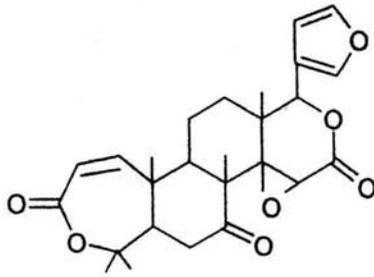


Figura (6), estructura de obacunone.

1.3.2 BIOSÍNTESIS DE LOS LIMONOIDES.

El limonin es un producto de una serie de reacciones que se originan en el tronco de los árboles cítricos. El limonoide nomilin es formado en el tronco del árbol y se transfiere al fruto, cuando este es convertido en varios limonoides (Figura 7) incluyendo el insípido limonoato A-anillo lactona, que es el anillo abierto del limonin. En muchas variedades de cítricos, este precursor de limonin se concentra dentro de las semillas de frutas cítricas maduras. Sin embargo, en algunas variedades de naranja, existen restos de A-anillo lactona en un medio neutro en el citoplasma o membrana de células del jugo.

Un trabajo de radioactividad muestra las posibles líneas de biosíntesis de limonoides.

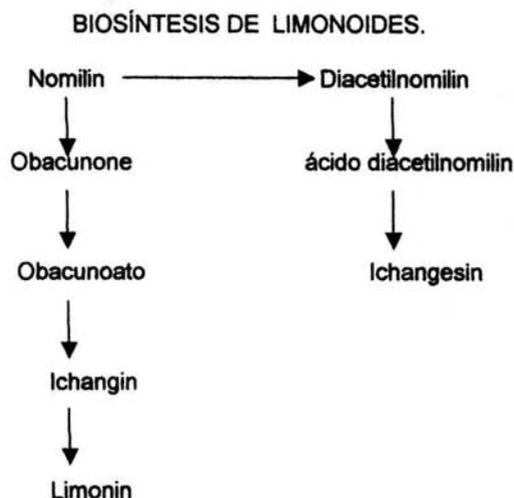


Figura (7).(Hideaki, 1992).

Nomilin es considerado el limonoide más activo biológicamente y es el segundo limonoide en abundancia en las semillas de naranja, seguido por deacetilnomilin y obacunone. (Fong, 1993).

A través del análisis de cromatografía en capa fina, se observa que limonin, nomilín, obacunone y diacetilnomilín son los limonoides que se encuentran en forma mayoritaria.

Limonin es el componente mayoritario en todas las especies, seguido por nomilín, excepto en la semilla de tangerina, con un contenido mayoritario de diacetilnomilín y nomilín.

Obacunone es el limonoide que en la mayoría de los cítricos se encuentra en concentraciones muy bajas, excepto en la semilla de limón y lima donde alcanza la misma concentración que nomilín. (Hasegawa, 1980).

1.3.3 ACCION DE LOS LIMONOIDES

Los limonoides que se encuentran en la cáscara de frutas cítricas, parecen estar específicamente destinados a la protección del tejido pulmonar. Además estos compuestos actúan como agentes quimiopreventivos específicos. En algunas pruebas preliminares, pacientes de cáncer reciben limoneno oralmente para probar su efectividad terapéutica. Actúa como inhibidor de la reacción de isoprenilación, como un mecanismo para prevenir la expresión oncogénica y controlar de esa manera el crecimiento celular.

De manera repentina se ha descubierto que los limonoides poseen actividad anticancerígena en animales. Como consecuencia de estas investigaciones, nuevos trabajos se están desarrollando en alimentos que contengan concentraciones altas de limonoides, un ejemplo de esto es el limón. Por lo tanto esta es una forma de aprovechar reservas, para producir productos que puedan tener un beneficio potencial en la salud.

Los resultados de estos experimentos muestran que las estructuras esenciales de los limonoides son críticas en la actividad quimiopreventiva del cáncer, ya que existen 4 de los limonoides cítricos (limonin, limonin glucosilados, limonin carboximetoxilo y deoxilimonin) que inhiben significativamente el desarrollo de DMBA (Dimetilbencen-a-antraceno). Con estos compuestos se da una reducción significativa en el peso del tumor, mientras que la inhibición completa va de 50-60%. El efecto en la producción de tumores es considerablemente baja de 15-30% en inhibición. En los tejidos tratados con estos compuestos, la formación de estos tumores se retrasa de 1 a 2 semanas. Por lo cual la actividad de estos limonoides aparentemente esta en la fase de promoción de la carcinogenesis.

Existen otros tres limonoides (nomilin, nomilin glucosilado y obacunone) los cuales pueden tener una actividad parcial contra otros tipos de tumores como por ejemplo nomilin sobre benceno-a-pireno previniendo su formación en el estómago. Estos compuestos tienen actividad principalmente en la fase de iniciación de carcinogenesis. En tumores de piel, los resultados con nomilin y limonin demuestran que el primero es más efectivo durante la etapa de iniciación, mientras que el segundo es más activo durante la fase de promoción de la carcinogenesis.

Ya que los limonoides de los cítricos (aglucones y glucosilados) pueden inhibir el crecimiento de cáncer en células, los investigadores están empezando a diseñar alimentos funcionales. Usando las técnicas desarrolladas para aislar limonoides, científicos japoneses aíslan grandes cantidades de estos compuestos y los usan para formar productos de prueba.

1.3.4 LIMONOIDES COMO QUIMIOTAXONOMICOS

La distribución limitada de los limonoides en especies de plantas, la relativa facilidad de análisis químico, identificación y la variación en la complejidad estructural hacen que esta clase de compuestos sean unos excelentes marcadores quimiotaconómicos. También están relacionados entre sí en su biosíntesis, esto permite una correlación con varios niveles de la taxonomía, no siendo posible con otros fitoquímicos.

La familia de las Rutáceas en general produce limonoides relacionados en su biosíntesis con limonin. La modificación del grupo C-metil es una oxidación invariablemente en las estructuras de los limonoides que se forman. La familia de las Rutáceas es muy limitada en este aspecto, porque la oxidación ocurre sólo en el grupo C-19 metil. Esta oxidación ocurre de manera progresiva aumentando el grado de especies. Esto parece ser una buena regla para saber si una especie produce limonoides. Una prueba cualitativa de limonoides en una planta puede ser usada para elucidar el parentesco y la posición en la taxonomía. Esta metodología se puede utilizar también para la examinación de varios cítricos híbridos. Esta propiedad puede ser usada como una identificación de especie, que podría ser considerado para ser usada en la clasificación clásica taxonomica, la cual tiene un potencial genético compatible con nuevos programas basados en biología molecular. (Berhow, et al, 2000).

1.4 EXTRACCION Y CUANTIFICACIÓN DE LIMONOIDES.

1.4.1 SOLUBILIDAD

En la mayoría de las investigaciones realizadas se han utilizado tanto acetona, acetonitrilo o cloroformo debido a su alto poder de solubilizar a los limonoides. De los tres el cloroformo es más volátil, propiedad que facilita la evaporación en vacío, mientras que la acetona y el acetonitrilo pueden solubilizar compuestos diferentes a los limonoides provocando una interferencia. (Kimball, 1991).

1.4.2 EXTRACCIÓN

La extracción depende del uso de disolventes adecuados, tiempo y métodos de preparación de la muestra para realizarla.

Como limonin es realmente soluble en disolventes orgánicos, la eliminación de material acuoso favorecerá esto para la cuantificación (HPLC) ya que se eliminarán impurezas que interfieran. (Kimball, 1991).

Los limonoides usualmente eran separados de otros compuestos en el jugo de cítricos con una extracción utilizando un disolvente orgánico. Esta extracción actúa para limpiar la muestra y concentrarla en un paso; se evapora el disolvente del extracto y se seca. Redisolviéndose posteriormente en una pequeña cantidad de fase móvil. (Russell, 1980).

1.4.3 CUANTIFICACION POR CROMATOGRAFIA.

HPLC ha sufrido un significativo desarrollo en las pasadas décadas, debido a se ha vuelto una herramienta importante en la industria de los alimentos. Esto es posible ya que se pueden hacer cambios en columnas, detectores y fase móvil para obtener resultados satisfactorios. Estas modificaciones permiten que pocos compuestos no puedan ser detectados por este sistema.

En HPLC los métodos que se diseñaron inicialmente solo eran para la medición de limonin, no se conocía la existencia de otros limonoides. El primer método usado fue con una columna, de sílica con poros de 10 μm y un detector de índice de refracción. (Fisher, 1973). El sistema de disolventes era cloroformo-acetonitrilo (95:5) v/v. Sin embargo, porque existía una baja sensibilidad y pobre estabilidad a la temperatura del detector de índice de refracción fue sustituido por un sistema de fase inversa empleando agua-metanol como el sistema de disolventes con una columna empacada de acetonitrilo y un detector de ultravioleta a 210 nm. (Fisher, 1978).

En la actualidad existen condiciones cromatográficas las cuales se han utilizado en varias investigaciones dando resultados aceptables. Se usa un detector ultravioleta a 210 nm con un sistema de disolventes acetonitrilo-metanol-agua (10:41:49) v/v/v de forma isocrática en un sistema de fase inversa con una columna de dimensiones 4.6 X 250mm, tamaño de partícula 5 μm . Estas últimas condiciones tienen tiempos de retención grandes para los limonoides limonin, nomilin y obacunone siendo 12.1, 22.6 y 36.1min. respectivamente. (Yoshihiko, 1991).

En la tabla (9) se muestran las condiciones generalmente utilizadas para la cuantificación de los limonoides aglucones y glucosilados en los cítricos. Se observa que existe una tendencia marcada para la utilización de una columna C-18 con fase inversa. El flujo es similar en casi todos los casos del mismo modo la longitud de onda. En contraste para la composición de la fase móvil existe una gran variedad de propuestas.

ALIMENTO	COLUMNA	FASE	FLUJO	λ	CONDICIONES
Toronja (Limonoides glucosilados)	C-18 Sherisorb ODS 2.5 μ m 250x4.6mm.	Fase inversa	1mL/min.	UV 210nm	15% Acetonitrilo en 3mM de ácido fosfórico
Cítrico Hanaju	C-18 5 μ m 250mmx4.6	Fase inversa	1mL/min.	UV	De 15% a 55% metanol-agua en 75 min.
Cítricos	Packed spherisorb silica 5 μ m. 250x4.5mm.	Fase inversa	1.5mL/min.	UV 215nm	99% Ciclohexano y 1% Tetrahidrofurano
Toronja (Limonoides aglucones)	C-18 Sherisorb ODS 2.5 μ m 250x4.6mm.	Fase inversa	1mL/min.	UV 210nm	Acetonitrilo- metanol-agua (10:41:49)

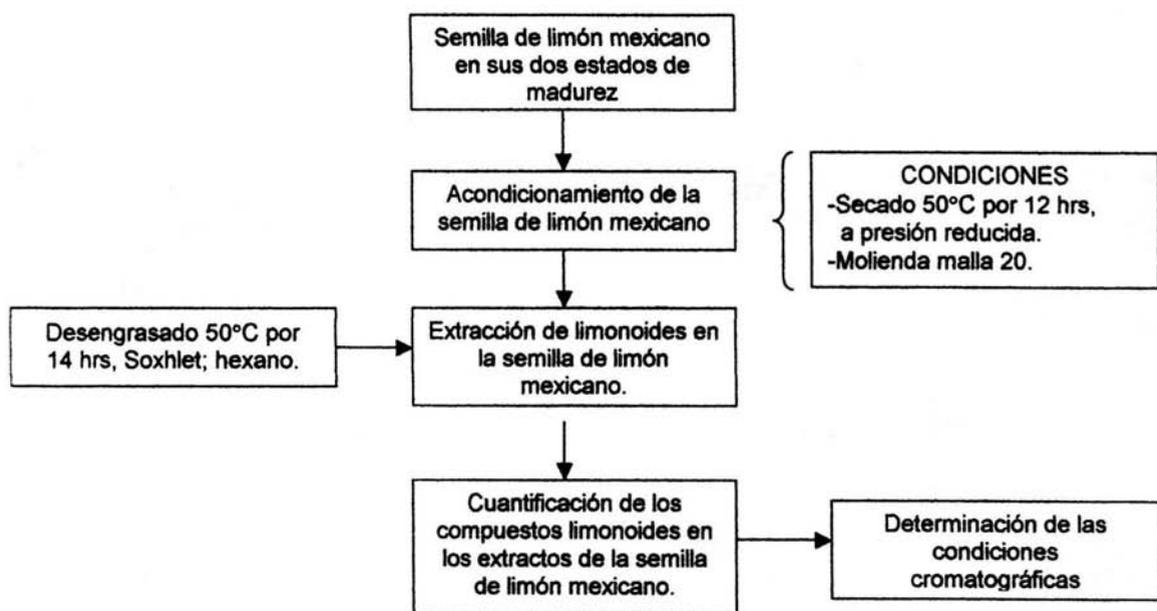
Tabla (9)

En resumen, para tener buenos resultados con el método de HPLC puede ser dividido en 4 secciones: Preparación de la muestra, separación de compuestos, detección y cuantificación de los mismos.

CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO:

En el esquema (1) se resume la estrategia experimental del proyecto para la separación y cuantificación de los compuestos limonoides.



Esquema 1.

2.2 OBTENCIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

Se trabajaron 3 lotes de limón mexicano en dos estados de madurez, los dos primeros se obtuvieron del mercado de la Merced con procedencia desconocida, el último lote se obtuvo del estado de Michoacán. El estado de madurez fue determinado por el color, tamaño y textura de acuerdo a la norma NMX-FF-087-SCFI-2001 Productos alimenticios no industrializados para su uso humano- Fruta fresca- Limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*). (anexo I).

Se procedió a lavar la muestra, se exprimó el jugo que será utilizado en otro análisis y las semillas fueron separadas de la cáscara manualmente para realizar el acondicionamiento. En primer término se hizo una premolienda para poder secarlas de manera más eficiente. Las condiciones que se establecieron fueron: 50°C por 12 horas. Posteriormente se homogeneizó el tamaño de partícula (malla 20) con una molienda. Debido a que las semillas contienen una gran cantidad de grasa fue necesario eliminarla, utilizando el método Soxhlet con hexano a 50°C durante 14 horas.

2.3 EXTRACCIÓN DE LIMONOIDES.

En la realización de la extracción, fue necesario disminuir el tamaño de partícula, esto para aumentar la superficie de contacto, se recomienda un tamaño igual al de malla 20 (Hideaki, 1995).

Para asegurar que se extrae la mayoría de los limonoides presentes en la semilla, se realizó una extracción general con metanol en tres tiempos (50 mL c/u). Se sabe que en los dos primeros tiempos se extrae la mayoría de los compuestos de interés y que el tercer tiempo es para asegurar que no quede una cantidad significativa en la matriz (incrementar el rendimiento).

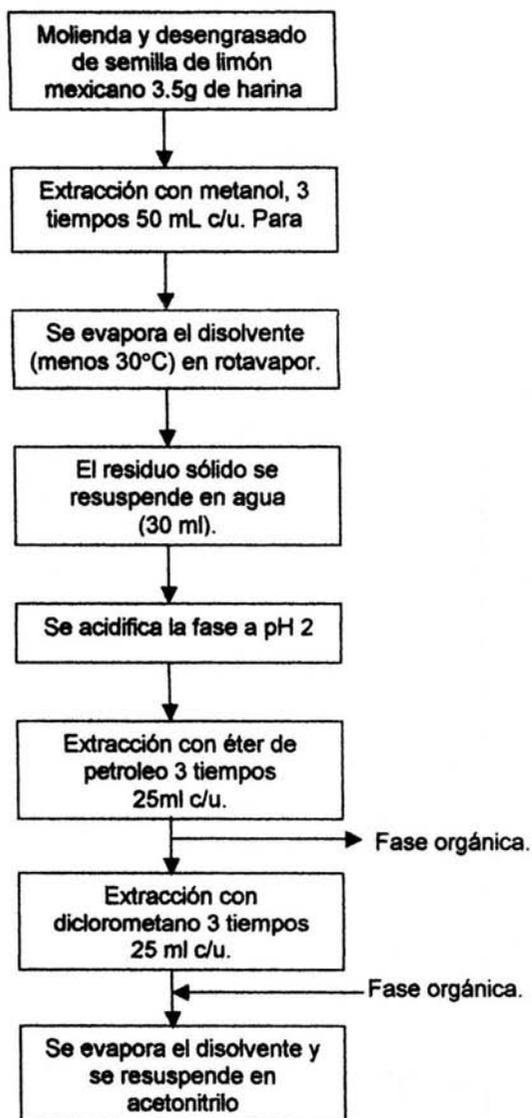
En este extracto se cuenta con limonoides y otros compuestos tales como: flavonas, ácidos orgánicos, polifenoles, carotenos, entre otros. Se evapora el metanol con un rotavapor en donde se controla la temperatura del extracto, la cual no debe ser mayor a 30°C. Este parámetro es muy importante ya que si no es considerado se puede destruir los limonoides y por tanto hacer una extracción inadecuada. Los limonoides son estables por debajo de 60°C.

El residuo sólido que queda de la evaporación es resuspendido en agua para poder llevar a cabo una extracción líquido-líquido. Se verifica el pH a 2.0 esto para asegurar que se cierre el anillo-D de los limonoides.

Se hizo una extracción con un disolvente orgánico (éter de petróleo) en tres tiempos (25 mL c/u) esto con la finalidad de eliminar compuestos no deseados del extracto.

Por último se realizó una extracción selectiva con diclorometano en tres tiempos (25 mL c/u) donde se encuentran los limonoides aglucones debido a su menor polaridad que los limonoides glucosilados los cuales se quedan en la fase acuosa. Se evapora el diclorometano y los compuestos se resuspenden en acetonitrilo para preparar el extracto que se pasará en sep-pak para realizar una extracción continua obteniendo una fracción con limonoides aglucones. En el esquema (3) se explica la purificación.

2.3.1 ESQUEMA DE EXTRACCIÓN DE LIMONOIDES.

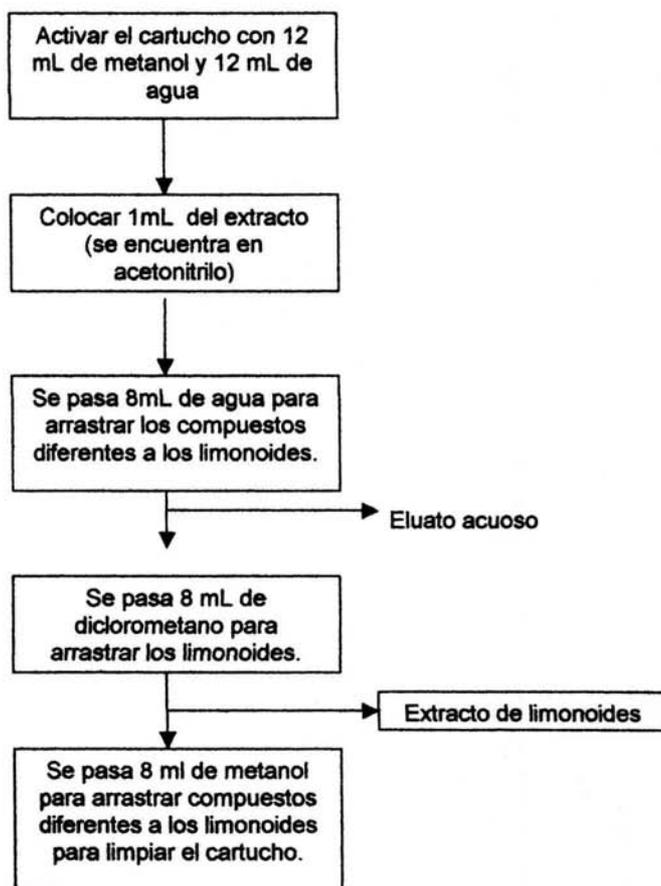


Esquema 2.

2.4 PURIFICACIÓN DE LIMONOIDES.

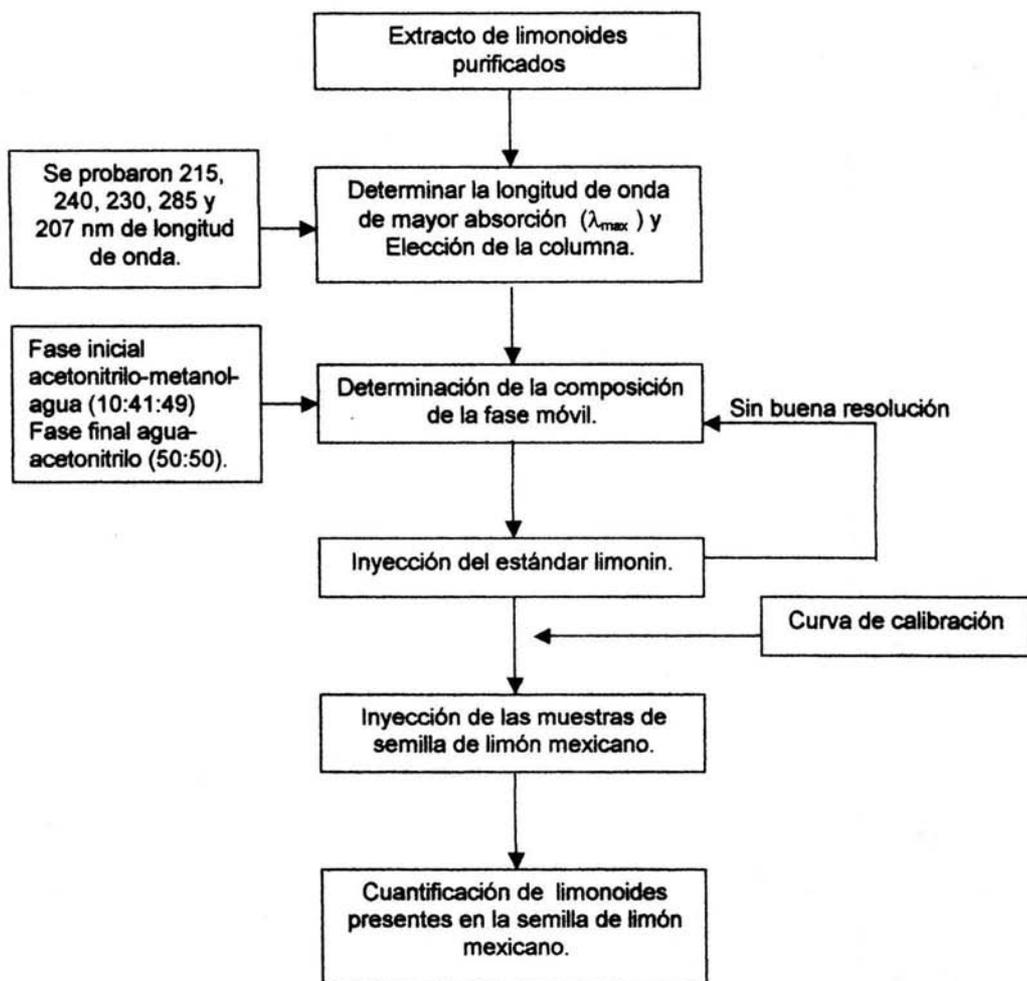
El cartucho utilizado para la purificación y separación previa a la cuantificación fue:
Vac 12cc silica 2g. Waters.

La forma de trabajo fue de la siguiente manera:



Esquema 3.

2.5 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.



Esquema 4.

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

La composición química de la semilla fresca del limón, está dada principalmente por el agua y la grasa. Para facilitar la extracción de limonoides se requiere eliminar la humedad por medio de un secado al vacío por 12 horas a 50°C. En la extracción de grasa se utilizó el método Soxhlet con hexano el cual se emplea en la mayoría de investigaciones recientes (Hideaki, 1995). El tiempo de extracción de la grasa se determinó haciendo varias pruebas hasta llegar a las condiciones en donde se extrae la mayor cantidad de grasa. El tiempo fue de 14 horas.

En la tabla (10) se muestran los resultados del contenido de humedad y grasa.

ESTADO DE MADUREZ	PORCENTAJE DE HUMEDAD	CV %	PORCENTAJE DE GRASA	CV %
Semilla de limón Inmaduro.	44.79	4.46	30.57	2.98
Semilla de limón Maduro.	44.09	4.79	35.27	2.53

Tabla (10)

Contenido de humedad y grasa en la semilla por triplicado de cada lote n=9.

Los resultados obtenidos del porcentaje de humedad que se muestran, se encuentran en el intervalo reportado en la literatura el cual es 44.7-39.0% (Braverman, 1997). Se puede observar también que no existe diferencia en el contenido de humedad entre el estado de madurez de las semillas de limón.

En los resultados del extracto lipídico, los valores se encuentran en el intervalo reportado 30-35% (Braverman, 1997). Sin embargo existe una diferencia del 16% en el porcentaje de grasa con respecto al estado de madurez.

Para la extracción de los compuestos limonoides es necesario realizar una operación que tiene interés industrial; el desengrasado de la semilla nos puede proporcionar una fracción lipídica con una gran cantidad de aceites esenciales que pueden ser aprovechados en la industria de saborizantes, materiales de limpieza, cosmetología y perfumería. (Grosse, 2000).

3.2 OPTIMIZACION DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCION

El proceso de extracción para limonoides se debe adecuar a las características de la matriz con la cual se trabaja. Existe una gran cantidad de métodos de extracción a partir de los jugos de cítricos. En cuanto a métodos de extracción utilizando como matriz a la semilla de limón se conocen menos, ya que no se había estudiado esta parte del cítrico con ese fin.

Se utilizó metanol para realizar una extracción general en la harina de semilla de limón mexicano. En el extracto metanólico se incluyen los limonoides aglucones así como los glucosilados.

Investigaciones anteriores (OCPI, 1987) evaluaron la influencia del nivel de acidez y la cantidad de agua, buscando con ésto las condiciones óptimas para convertir todo el precursor LARL a limonin y así tener un rendimiento mayor en la extracción del compuesto.

En la tabla (11) se muestra el efecto de la acidez y el contenido de agua sobre el rendimiento de la extracción.

CONDICIONES DE ACIDEZ EN 100GRAMOS DE HARINA	RENDIMIENTO %
HCl (conc.) hasta pH 2 En 50mL de agua	96
HCl (conc.) hasta pH 2 En 100mL de agua	19
50ml de HCl 2N pH 1	31
50mL de HCl 1.5N pH 1.5	46
50mL de HCl 1N pH 2	81

Tabla (11), (OCPI, 1987).

La tabla anterior muestra que al incrementar la relación de agua-harina 1:1, se disminuye el rendimiento en cinco veces.

Además se determinó una influencia significativa de la acidez pues a un pH menor de 2 disminuye el rendimiento. Esta influencia se debe a que los limonoides presentes en semillas de cítricos se encuentran en dos formas, dilactonas (D-anillo cerrado) y monolactona (D-anillo abierto), por lo cual es necesario ajustar el pH para cerrar el D-anillo (Fong, 1993).

Con estos resultados se puede determinar que las condiciones de HCl concentrado a pH 2 con una relación agua-harina 1:2 v/p son las más adecuadas. Sin embargo la cantidad de agua utilizada fue mayor, debido a que no se permitía un manejo de muestra apropiado. Se utilizó una relación diferente agua-harina 1:9 v/p para resuspender toda la muestra.

La extracción con el éter de petróleo tiene como objetivo eliminar compuestos que puedan interferir en la cuantificación, así como facilitar la purificación de los limonoides.

La tabla (12) muestra resultados de investigaciones hechas anteriores (OCPI, 1987), para observar el rendimiento con distintos disolventes en la extracción de limonoides. Esta extracción es de gran importancia debido a que es selectiva para los compuestos de interés a partir del extracto acuoso.

SOLVENTE	RENDIMIENTO %
Benceno	80
Cloroformo	30
Cloroformo-etanol	60
Diclorometano	100
Butanol	10

Tabla (12) (ocpi, 1987).

Es claro que el disolvente con un mayor rendimiento de recuperación en la extracción selectiva fue el diclorometano, seguido por el benceno. Con base en estos resultados se tomó la decisión de utilizar el diclorometano para la extracción selectiva de los limonoides.

3.3 OPTIMIZACION DEL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DE LOS LIMONOIDES

Existen varios parámetros necesarios para que se pueda realizar la separación y cuantificación por HPLC de limonoides. Debido a esto se fueron probando diferentes condiciones de trabajo. Se decidió utilizar fase inversa ya que es el método recomendado ampliamente en investigaciones recientes.

Se utilizó una columna C-18 Waters 4 μ m 3.9 X 150 mm para la separación y cuantificación de los limonoides aglucones. Se probaron diferentes longitudes de onda para la detección, dentro del intervalo de ultravioleta ya que la molécula de limonoides contiene un anillo furano con dobles ligaduras conjugadas.

Las longitudes probadas fueron (λ) 215nm, 240nm, 230nm, 285nm debido a que se realizó un barrido espectrofotométrico donde se obtuvieron las absorciones máximas en estas longitudes; cabe mencionar que este barrido se realizó con un extracto no purificado.

Comparando las áreas resultantes en cada longitud de onda se observó que 207nm fue la λ_{max} de absorción de los limonoides. El único inconveniente es que se acerca mucho a la longitud de corte del disolvente que se trabajó como fase móvil.

Otro factor importante fue la composición de la fase móvil, en principio se utilizó una ya establecida en investigaciones anteriores (Hasegawa, 1980). acetonitrilo-metanol-agua(10:41:49), dando resultados no satisfactorios ya que el tiempo de retención era muy grande y no había una buena resolución de los picos, así también los limonoides no eran totalmente solubles en esta fase móvil.

Se fueron probando diferentes proporciones para obtener una mejor resolución y solubilizar la muestra en la fase móvil. Se usaron las siguientes proporciones de disolventes acetonitrilo-metanol-agua(40:40:20).

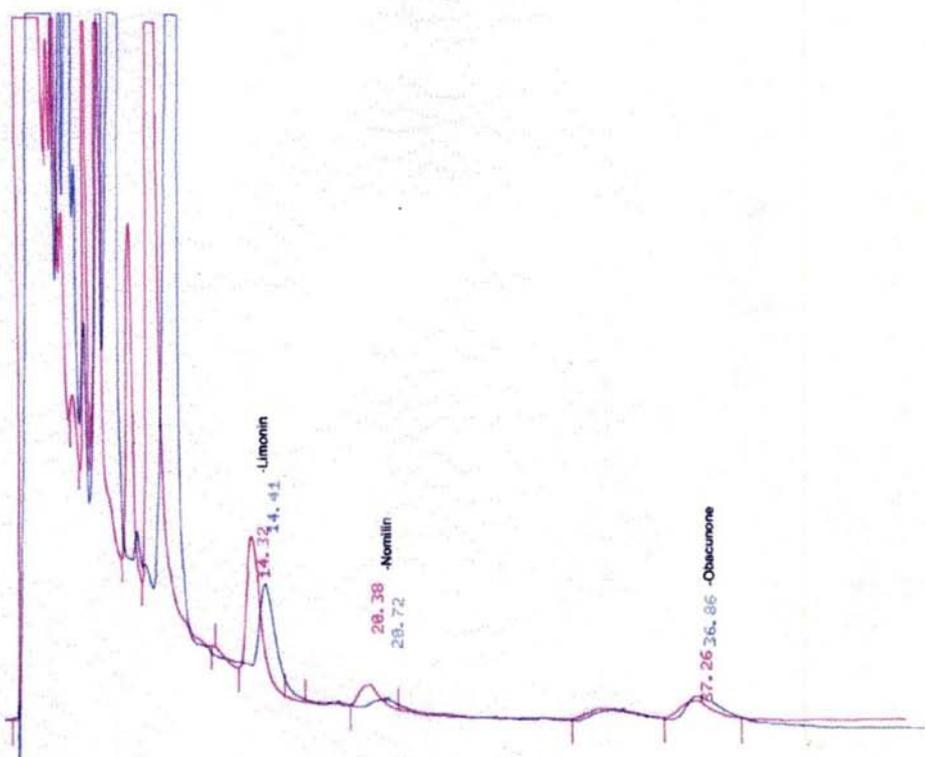
La siguiente fase que se probó fue acetonitrilo-metanol-agua (20:31:49) para mejorar la resolución que se tenía. Los resultados fueron los mismos que en la fase probada anteriormente, por lo que se decidió prescindir del metanol el cual produce una mayor retención en la columna dando respuestas con baja resolución

La composición de la fase solo con agua-acetonitrilo (50:50) dio menores tiempos de retención con una mejor resolución, así como la solubilización de los limonoides. Todas estas pruebas se realizaron con el extracto de la muestra.

Como se puede observar en el cromatograma (1) existen una gran cantidad de compuestos de mayor polaridad que los limonoides por tener tiempos de retención menores. Este problema no se eliminó del todo. En el cromatograma (2) se puede ver que se mejora la resolución así como reducción en los tiempos de retención.

Limonin fue identificado comparándolo con el tiempo de retención de un estándar. Para los dos limonoides siguientes (nomilin y obacunone) fueron reconocidos con base en datos sobre la elusión reportada (Yoshihiko O, 1991).

Limonoides aglucones



- Extracto de semilla de limón maduro
- Extracto de semilla de limón inmaduro

Cromatograma 1 Perfil de limonoides (condiciones iniciales).

Columna: C-18 waters 4 μ m 3.9X150mm.

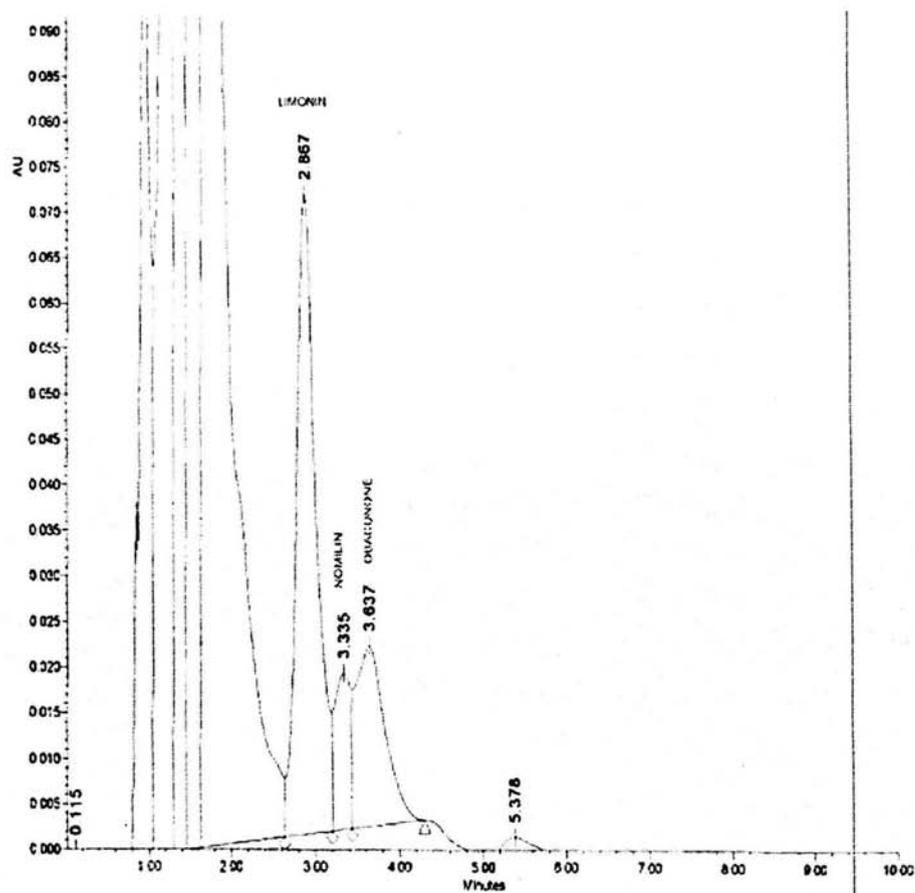
Fase móvil Acetonitrilo-Metanol-Agua (10:41:49)

Flujo 1ml/min.

Volumen de inyección 20 μ l

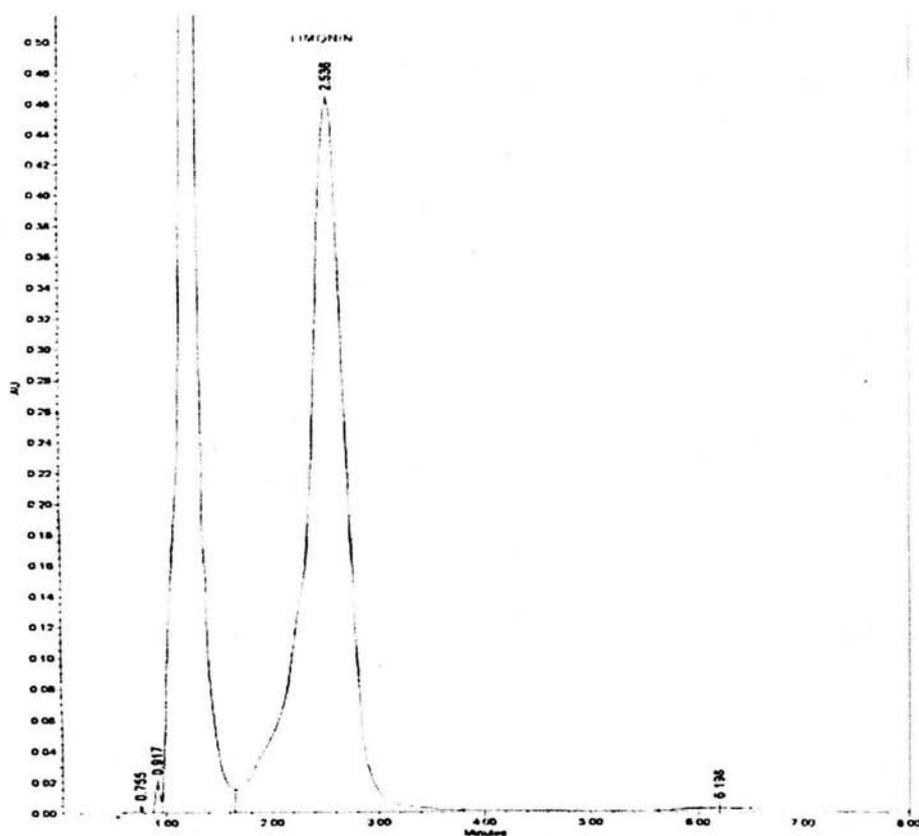
Detector UV λ 215nm.

En este cromatograma se observa claramente la mala resolución debido al metanol, el cual produce un alargamiento de los picos. Así como el tiempo de duración de la corrida que no es menor a 38 minutos.



Cromatograma (2) Perfil de limonoides (condiciones finales).

En este cromatograma podemos ver que siguen existiendo compuestos más polares que los limonoides por tener tiempos de retención menores. Se observa que hay una disminución de los tiempos de retención notable, no se pueden definir los picos con claridad los limonoides nomilin y obacunone. Esto se puede deber a que son muy similares en su estructura química solo diferenciándose por un acetato.



Cromatograma (3) Estándar de limonin

Las condiciones óptimas para la cuantificación de los compuestos limonoides fueron las siguientes:

Columna: C-18 waters 4 μ m 3.9X150mm.

Fase móvil Acetonitrilo-Agua(50:50)

Flujo 1ml/min.

Volumen de inyección 20 μ l

Detector UV λ 207nm.

Detector dual de absorbancia λ Waters 2487.

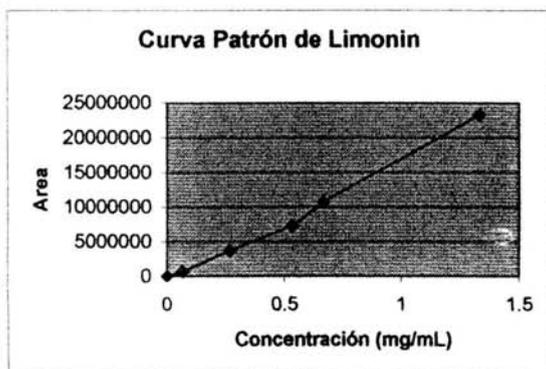
3.4 CUANTIFICACION DE LOS LIMONOIDES

La tabla (13) presenta los resultados de la curva patrón que se realizó por triplicado para cada concentración.

CONCENTRACIÓN DE LIMONIN(mg/mL)	ÁREA	CV %
0	0	0
0.067	664591	4.99
0.267	3673442	1.28
0.533	7289129	0.54
0.667	10736215	0.68
1.333	23263872	1.18

Tabla (13).

Tomando en cuenta la pureza del estándar limonin que era del 75% se realiza la rectificación en la concentración.



$$b = -783104$$

$$m = 23407382$$

$$r = 0.9962$$

El equipo de detección utilizado en HPLC proporciona un monitoreo de dos longitudes de onda. Las longitudes de onda fueron 215nm y 207nm. Sin embargo entre éstas se observó una diferencia significativa de respuesta. En la longitud de onda de

207nm se obtiene un respuesta casi del doble con respecto a 215nm. Por tal motivo se consideraron los resultados de 207nm.

En la tabla (14) se reporta la cantidad de limonin encontrado en el extracto realizado a tres lotes por cada estado de madurez, en cada lote se realizaron tres extracciones (tres pesadas) las cuales se inyectaron por triplicado en el HPLC. Con esto se asegura un análisis estadístico con $n=9$.

ESTADO DE MADUREZ	LOTE	CONC. ppm mg/kg semilla seca	CV	PROMEDIO ppm de limonin
Inmaduro	1	5416.62	2.66	
Inmaduro	2	5479.34	4.02	
Inmaduro	3	5434.15	1.31	5443.37
Maduro	1	4908.28	0.65	
Maduro	2	4722.95	2.00	
Maduro	3	4752.36	5.32	4794.53

Tabla (14). Concentración de limonin en mg/ Kg de semilla seca.

Estos resultados muestran una tendencia clara, siendo que en el estado inmaduro existe una mayor cantidad de limonin que en el estado maduro. El análisis de varianza (anexo II) realizado entre las muestras de la semilla de limón inmaduro y la semilla de limón maduro indica que el estado de madurez influye en la concentración de limonin.

Este comportamiento también se observa en los resultados de investigaciones anteriores. Se han llegado a reportar desde 1000 ppm hasta cerca de 8000 ppm (Yoshihiko O, 1991) esto se debe a que existe diferencia entre la misma especie y que se puede utilizar como una herramienta para la clasificación taxonómica.

Con estos resultados se puede proponer el uso del limón inmaduro, el cual es difícil de ser comercializado, debido a que el corte se realiza antes de su madurez comercial, como una alternativa viable para el aprovechamiento de un desecho como es la semilla.

Para el caso de los otros dos limonoides no se contó con estándar por lo que la cuantificación se realizó utilizando el factor de respuesta del limonin. Los resultados se presentan en la tabla (15).

Estado de madurez	ppm de nomilin	ppm de obacunone
Inmaduro	1074.72	708.27
Maduro	927.37	655.65

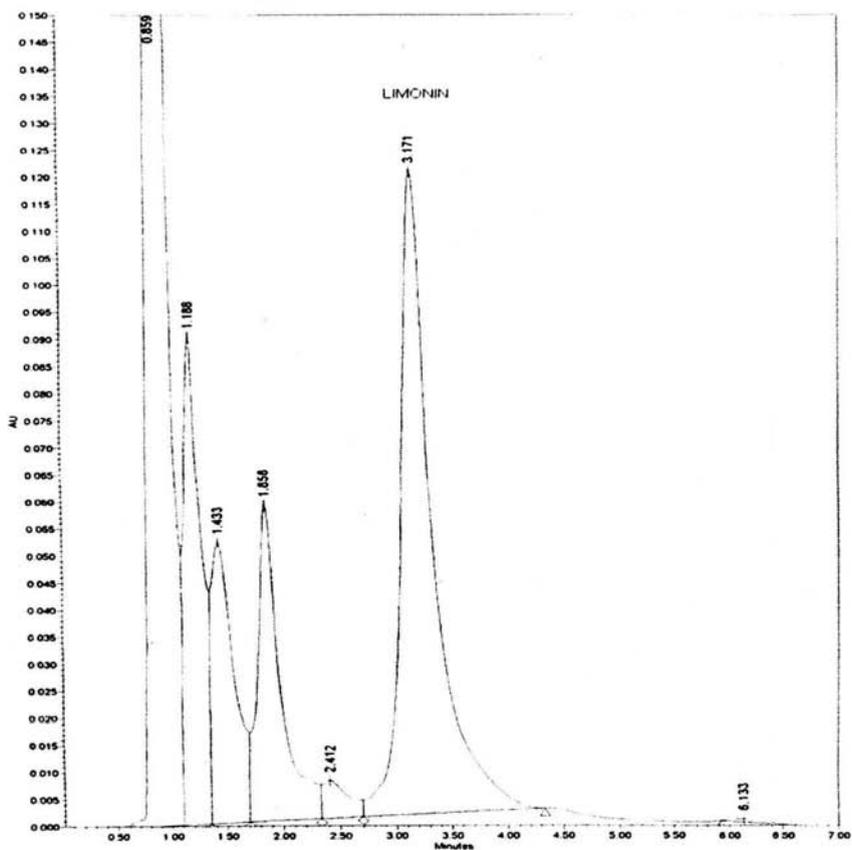
Tabla (15). Concentración de nomilin y obacunone en mg/ Kg de muestra seca.

Estos resultados indican que nomilin se encuentra en mayor concentración que obacunone algo similar a lo reportado en la literatura (Hasegawa, 1980). Sin embargo debido a que están en muy baja concentración con respecto a limonin, no se pudo contar con el mismo número de resultados (solo se contó con 12 resultados).

El limonoide de mayor concentración en la semilla de limón mexicano es limonin que concuerda con lo reportado (Yoshihiko O, 1991). Se puede ver que la cantidad total de limonoides presentes en la semilla de limón mexicano está alrededor de 6900 ppm. Constituyendo limonin el 74%, nomilin el 15.16% y obacunone el 10.27%.

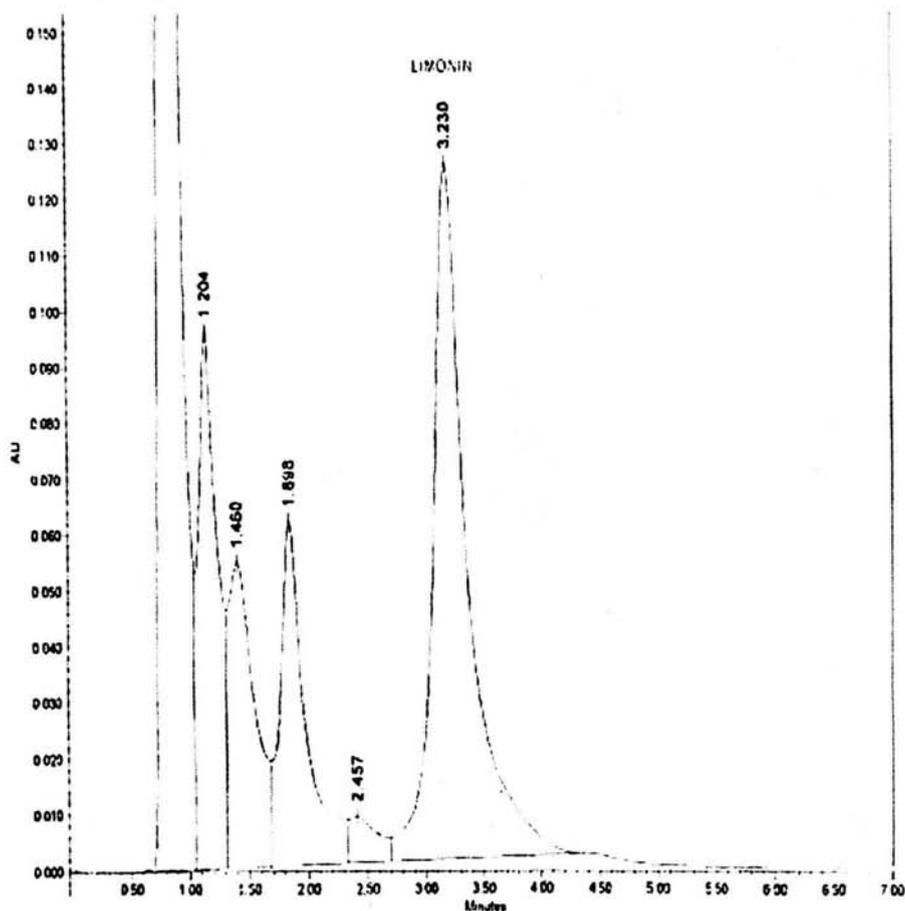
Es posible que existan más limonoides presentes en menores proporciones, por lo cual es necesario tener condiciones adecuadas para confirmar este hecho.

Se observa que existe una tendencia en los tres limonoides cuantificados. La disminución de la concentración conforme el fruto llega a su madurez comercial. Este comportamiento se debe a reacciones de biosíntesis de limonoides glucosilados a partir de limonoides aglucones, así como reacciones de degradación del fruto en general. La formación de limonoides glucosilados partiendo de los limonoides aglucones resulta ser más activa en los tejidos del cítrico que en las semillas, por eso se encuentra una mayor cantidad de limonoides aglucones a diferencia de otras partes del cítrico (Yoshihiko O, 1991).



Cromatograma (4) Perfil de limonin en semilla de limón maduro.

El cromatograma 4 muestra el perfil de limonin en un extracto de semilla de limón maduro. Se puede observar una buena resolución. También se observa que no existe una señal para los dos limonoides reportados (nomilín y obacunone), estos solo se presentaron en algunos cromatogramas.



Cromatograma (5) Perfil de limonin en semilla de limón inmaduro.

El cromatograma 5 presenta el perfil de limonin en un extracto de semilla de limón inmaduro. La mayor concentración de limonoides se presentan en este estado de madurez, sin embargo tampoco se tiene una respuesta constante de los limonoides de menor concentración (nomilín y obacunone). Al igual que en el estado maduro se observa que existen otros compuestos que no fueron identificados.

Los antecedentes recopilados muestran la gran relevancia que tiene el limón en el país. Los principales estados productores de limón son Colima y Michoacán los cuales contribuyen con una producción de 850000 toneladas anualmente durante los últimos años, lo que representa el 56.4% de la producción nacional.

Para que el limón sea comercializado en fresco debe cumplir con las características que la norma de PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA USO HUMANO - FRUTA FRESCA - LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia Swingle*) menciona. Mientras que el limón que no cumple con estas características que es el 4% de la producción nacional (43000 toneladas anualmente) se desperdicia o se procesa para obtener solo aceite esencial destilado que es el principal subproducto de exportación, así como la cáscara que se aprovecha para obtener pectina principalmente.

El limón procesado se aprovecha muy poco y no se utilizan compuestos con propiedades muy específicas como son algunos fitoquímicos presentes en las semillas. Ejemplo de estos son los limonoides que se pueden extraer y ser utilizados .

Estos fitoquímicos pueden ser aprovechados adicionándolos en un alimento convencional, en forma de un concentrado a partir de un alimento, píldoras, cápsulas o como presentaciones farmacéuticas.

Para ello es necesario realizar investigaciones, en donde se vea la forma de hacer extracciones a gran escala, observar los beneficios del consumo de estos compuestos , así como pruebas de toxicidad, entre otras cosas.

Esta investigación es la base para aprovechar el gran potencial que tiene la semilla de limón mexicano considerado como un desecho.

CONCLUSIONES.

- Las condiciones óptimas de secado fueron 50°C por 12 horas al vacío, encontrando que no existe diferencia con respecto al estado de madurez del cítrico .
- Se encontró que a 50°C por 14 horas Soxhlet con hexano se extrajo la mayor cantidad de grasa. Se estableció que existe diferencia significativa en el porcentaje de grasa en la semilla de limón debido a el estado de madurez.
- Es necesario la purificación del extracto a través de un sep-pak para eliminar compuestos que interfieren en la cuantificación de los limonoides.
- Para la cuantificación de los limonoides fue necesario la optimización de las condiciones cromatográficas realizando cambios en la fase móvil y longitud de onda. Columna: C-18 waters 4µm 3.9X150mm, fase móvil Acetonitrilo-Agua(50:50), flujo 1ml/min, volumen de inyección 20µl, detector UV λ 207nm.
- La concentración de limonin fue de 5443.37 ppm para las semillas de limón inmaduro y 4794.53 ppm para las semillas de limón maduro. Se estableció que si existe diferencia significativa en la concentración con respecto a el estado de madurez del cítrico.
- Para los otros dos limonoides (nomilin y obacunone) se pudo observar que estos limonoides están presentes en la semilla de limón. Para nomilin en la semilla de limón inmaduro fue 1074.72 ppm, en la semilla de limón maduro 927.37 ppm y para obacunone en la semilla de limón inmaduro fue 708.27 ppm, en la semilla de limón maduro fue 655.65 ppm.
- Las proporciones encontradas para los limonoides cuantificados: Limonin 74%, Nomilin 15.16% y Obacunone 10.27%.

BIBLIOGRAFIA.

1. Agrocadenas, (2002). "Producción mundial de cítricos"
http://www.agrocadenas.gov.co/citricos_descripción
2. American Institute for Cancer Research (1996). Dietary phytochemicals in cancer prevention and treatment. Proceedings of the American Institute for Cancer Research's Sixth Annual Research Conference. Washington, D.C., Aug. 31-Sep. 1, 1995. Adv. Exp. Med. Biol., Vol. 401. Plenum Publishing Corp., New York, NY.
3. Braverman J. B. ,(1980). Introducción a la bioquímica de los alimentos Edit Manual Moderno, 100,101 162-166, USA.
4. Berhow A., Hasegawa S. and Manners D., (2000). Citrus limonoids Functional Chemicals in Agriculture and Food. American Chemical Society. 134-138, 173-190, 212 y 2226.
5. Dillar, C. J., and German B.,(2000). Fitochemicals: Nutraceuticals, and Human Health Journal Science Food Agric., 1744-1756.
6. Fennema, O. R. ,(1995). Fruit Science and Technology Edit. Acribia 39-49, 669. España
7. Fisher, James F., (1973). J. Agric. Food Chem. 23, 1199-1201.
8. Fisher, James F. ,(1978). J. Agric. Food Chem. 26, 479-499.
9. Fong Chi H., (1993). Limonoids and their glucosides in Valencia orange seeds during fruit growth and development. Journal Agric. Food Chem.41, 112-115.
10. Grosse, R., (2000). Extracción del aceite esencial de naranja cajera Citrus. Editorial Alambra 521-525 España.

11. Grosso S.G., y Ramírez C., (2001). "Origen, naturaleza y características de los propóleos colombianos". Programa de Biología de Facultad-Química Educación Ibagué Tolima Colombia. www.beekeeping.com/articulos/salamca
12. Hasegawa Shin. and Raymond D., (1980). Limonoid in citrus seeds: Origin and Relative Concentration. J. Agric. Food Chemistry 28, 922-925.
13. Hasler, C. M., Huston, R. L. and Caudill, E. M., (1998). Two Decades of Nutrition Labeling Dekror, M., ed Nutrition International inc, Dayton, N. J. USA.
14. Hideaki Otha. ,(1992). Limonoids in seeds of citrus Hanaju. Phytochemistry. 31, 3905-3907.
15. Hideaki O. and Shin H., (1995). Limonoids in Pummelos (*Citrus grandis* (L.) Osbeck). Journal of Food Science. 60 ,1284-1285.
16. Infoagro, (2003). "El cultivo del limón".
www.infoagro.com.
17. Infoaserca, (1995). El limón persa y el limón mexicano. La complementaridad del mercado, Revista claridades agropecuarias 3-7
www.infoaserca.gob.mx/claridades/
18. Kimball Dan A., (1995). Citrus processing quality control and technology. Published by Van Nostrand Reinhold 140-151. New York, USA
19. Manners. Gary D., (1999). A new normal phase liquid chromatographic method for the analysis of limonoids in citrus. Phytochemical Analysis 10 ,76-81.
20. OCPI,(1987). Procedimiento para la obtención de la limonina contenida en las semillas de cítricos. www.ocpi.cu/doc/1987/135952
21. Praloran J. C. ,(1977). "Los agrios" Colección: Agricultura Tropical. Editorial Blume. 352,356.

22. Primo Y, (1982). Química agrícola III alimentos. Edit. Alhambra España.
23. Quijano, C. E. M., (2000). Análisis de productos obtenidos de los desechos derivados de la extracción del jugo de cuatro especies de cítricos que se cultivan en Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán.
24. Red Iberoamericana,(1994). Sustancias fitoquímicas de aplicaciones industriales. Proyectos CYTED www.redhucyt.oas.org
25. Rouseff, R. L. and Nagy S.,(1982). Distribution of limonoids in citrus seeds. *Phytochemistry* 21 ,85-90.
26. Russell L. and Rouseff R. L., (1980). Determination of limonin and related limonoids in citrus juices by HPLC *Analytical Chemistry*. 52 1223-1228.
27. SAGARPA, (2001). La cadena productiva del limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*) <http://www.siea.sagarpa.gob.mx/cadenas/limon>
28. Terres A. Ronneberg. (1995). Limonoid glucoside β -glucosidase activity in lemon seeds. *Phytochemistry* 39 , 1305-1307.
29. Vasconcelos J.A., (1998). Alimentos funcionales Conceptos y beneficios para la salud. Departamento de Ciencias de Alimentos y Nutrición , Universidad Chapman, Orange. California, USA www.madrimasd.org
30. Yoshihiko Ozaki, (1991). Limonoid glucosides in Citrus seeds. *Journal of Agric. Biology Chem.* 55, 137-141.

NORMA NMX-FF-087-SCFI-2001

PRODUCTOS ALIMENTICIOS NO INDUSTRIALIZADOS PARA USO HUMANO - FRUTA FRESCA - LIMÓN MEXICANO (*Citrus aurantifolia Swingle*) - ESPECIFICACIONES (CANCELA A LA NMX-FF-087-1995-SCFI)

NON INDUSTRIALIZED FOOD PRODUCTS FOR HUMAN USE - FRESH FRUIT - MEXICAN LIME (*Citrus aurantifolia Swingle*) - SPECIFICATIONS

1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Esta norma mexicana establece las especificaciones mínimas de calidad que debe cumplir el limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*) de la familia Rutaceae, para ser comercializado en estado fresco y en territorio nacional, después de su acondicionamiento y envasado. Se excluye el limón mexicano para procesamiento industrial.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de esta norma se deben consultar las siguientes normas mexicanas vigentes:

NMX-FF-006-1982 - Productos alimenticios no industrializados para uso humano – Fruta fresca - Terminología. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación 10 de junio de 1982.

NMX-FF-009-1982 - Productos alimenticios no industrializados para uso humano – Fruta fresca - Determinación del tamaño en base al diámetro ecuatorial. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación 10 de junio de 1982.

NMX-FF-012-1982 - Productos alimenticios no industrializados para uso humano – Fruta fresca - Determinación del contenido de jugo en frutas cítricas en base al peso. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación 10 de junio de 1982.

NMX-Z-012/1-1987 - Muestreo para la inspección por atributos - Parte 1: Información general y aplicaciones. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de octubre de 1987.

NMX-Z-012/2-1987 - Muestreo para la inspección por atributos - Parte 2: Método de muestreo, tablas y gráficas. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de octubre de 1987.

NMX-Z-012/3-1987 Muestreo para la inspección por atributos - Parte 3: Regla de cálculo para la determinación de planes de muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de julio de 1987.

NMX-Z-012/3-1987 Muestreo para la inspección por atributos - Parte 3: Regla de cálculo para la determinación de planes de muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de julio de 1987.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se aplican las definiciones indicadas en la norma mexicana NMX-FF-006 (véase 2 Referencias), así como la que se indica a continuación:

3.1 Limón mexicano

Lima de jugo ácido, de forma oval u oval a esférica, perteneciente a la familia Rutaceae del género Citrus y especie aurantifolia, con semilla, de cáscara delgada, de color verde al amarillo conforme avanza su madurez.

4 CLASIFICACIÓN DEL PRODUCTO

4.1 Clasificación

El limón mexicano objeto de la aplicación de esta norma se clasifica en tres grados de calidad como se indica a continuación:

Extra
Primera
Segunda

5 ESPECIFICACIONES

El limón mexicano objeto de la aplicación de esta norma debe cumplir con las especificaciones que se indican a continuación:

5.1 Mínimas

- a) Estar enteros;
- b) Tener consistencia firme;
- c) Ser de forma y color característicos de la especie;
- d) Estar sanos;
- e) Estar exentos de daños causados por plagas;
- f) Estar limpios, exentos de materia extraña;
- g) Exentos de humedad exterior anormal;
- h) Exentos de cualquier olor extraño; y
- i) Presentar un estado de madurez adecuado para su comercialización, distribución y consumo.

5.2 Madurez y color

5.2.1 Madurez

El limón mexicano debe presentar un grado de madurez fisiológica o punto sazón mínimo, el cual se determina de la siguiente manera:

Por el contenido de jugo, que no debe ser menor de 45 % en peso. Lo anterior se verifica de acuerdo a lo indicado en la norma mexicana NMX-FF-012 (véase 2 Referencias).

5.2.2 Color

El limón mexicano debe presentar coloración uniforme, pasando del verde al amarillo conforme avanza su madurez fisiológica. Lo anterior se verifica visualmente de acuerdo a lo indicado en la figura 1.

Las tolerancias aplicables a los diferentes grados de calidad respecto a la coloración deben ser las siguientes: Grado Extra 5 %, Primera 10 % y Segunda 20 %, en número o en peso de los limones que no presenten el color característico del conjunto en el envase o lote.

5.3 Tamaño

El tamaño de los limones mexicanos debe cumplir con lo indicado en la tabla 1. Lo anterior se verifica de acuerdo a lo indicado en la norma mexicana NMX-FF-009 (véase 2 Referencias).

TABLA 1. Tamaño

Código	Intervalo (mm)	Unidades de producto por kilogramo
1 ^a		
2	31,1 - 34,0	41 - 36
3	34,1 - 37,0	35 - 30
4	37,1 - 39,0	29 - 24
5	39,1 >	Menos de 24

^a Para la presente norma, no se admiten calibres inferiores a 31 mm, por lo que se suprime el código de calibre número 1.

Para los limones de los grados de calidad Extra, Primera y Segunda se permiten tolerancias de 5 %, 10 % y 15 %, respectivamente, en número o peso de frutas que no satisfagan los requisitos de tamaño indicados en el envase o lote, siempre y cuando se ajusten al tamaño inmediato superior o inferior de la tabla 1

NOTA 1.- Las tolerancias se calculan de acuerdo al método indicado en el inciso 7.1.

FIGURA 1. Gráfica de colores del limón



5.4 Defectos y daños

El producto objeto de la aplicación de esta norma, según el grado de calidad, debe cumplir con las especificaciones para la presencia de defectos y daños que se indican a continuación, además de dar cumplimiento con lo indicado en el inciso 5.1.

5.4.1 Grado extra

No deben tener defectos, salvo aquellos muy leves en la cáscara, que no afecten el aspecto general del producto, su calidad, conservación y presentación en el envase.

En cada lote o envase, se permite tolerancia de 5 % en número o en peso de limones que no reúnan todos los requisitos para este grado pero que satisfagan los de la categoría "Primera". Para esta tolerancia del 5 % se deben excluir las especificaciones de color y tamaño.

NOTA 2.- Las tolerancias se calculan en porcentaje del lote o del envase, en número o en términos de peso como se indica en el inciso 7.1.

5.4.2 Grado primera

Pueden presentar daños leves en la cáscara, tales como rozaduras cicatrizadas que cubran un área no mayor a 1 cm².

En cada lote o envase, se permite tolerancia de 10 % en número o en peso de limones que no reúnan todos los requisitos para este grado pero que satisfagan los de la categoría "Segunda". En este 10 % de tolerancia, se deben excluir las especificaciones de color y tamaño.

5.4.3 Grado segunda

Este grado comprende los limones que no pueden clasificarse en los grados de calidad superiores pero que satisfacen las especificaciones mínimas establecidas en la presente norma.

Se permiten los siguientes daños, siempre y cuando conserven sus características esenciales en lo que respecta a su estado de conservación y presentación:

Daños en la cáscara debidos a quemaduras de sol, rozaduras cicatrizadas y aquellos provocados por plagas también cicatrizados, que cubran un área no mayor a 2 cm², que no afecten el interior del fruto.

En cada lote o envase, se permite tolerancia de 10 % en número o en peso de limones que no reúnan todos los requisitos para este grado, excluyendo totalmente los limones afectados por pudrición o cualquier otro deterioro que los haga impropios para su consumo. En este 10 % de tolerancia, se deben excluir las especificaciones de color y tamaño.

6 MUESTREO

Para efectuar la verificación de las especificaciones del producto objeto de la aplicación de esta norma, el muestreo debe realizarse de común acuerdo entre el proveedor y el comprador, recomendándose el empleo de uno de los sistemas de muestreo contemplados en las normas mexicanas NMX-Z-012/1, NMX-Z-012/2 y NMX-Z-012/3 (véase 2 Referencias).

7 MÉTODOS DE PRUEBA

Para verificar la calidad, tamaño y madurez del producto objeto de la aplicación esta norma se deben aplicar los métodos de prueba indicados en las normas mexicanas NMX-FF-009 y NMX-FF-012 (véase 2 Referencias); así como, el cálculo de tolerancias para color y tamaño se determinan de acuerdo a lo indicado en el método de prueba que se indica a continuación:

7.1 Cálculo de porcentajes

Cuando se conoce el número de unidades contenidas en el envase, el cálculo de porcentajes se debe determinar con base a un conteo de las frutas. Cuando las unidades contenidas en el envase se desconocen, el cálculo se debe determinar con base al peso neto de las frutas muestreadas en relación al peso neto del envase o por otro método equivalente.

8 MARCADO, ETIQUETADO, ENVASE Y EMBALAJE

8.1 Marcado o etiquetado

Cada envase debe llevar, mediante impresión o etiqueta, en letras agrupadas en el mismo lado, con caracteres legibles, indelebles y visibles desde el exterior, los siguientes datos:

8.1.1 Nombre y domicilio o identificación reconocida del productor, emparador o exportador

8.1.2 Nombre del producto

8.1.3 Origen del producto

- Región y país de origen del producto.

8.1.4 Identificación

- Grado de calidad;

- Código de tamaño o intervalo de tamaño correspondiente;

- Número de unidades contenidas en el envase, y

- Contenido neto en kilogramos (kg) al envasar.

8.2 Envase

8.2.1 El producto de cada envase debe ser homogéneo, compuesto por limones del mismo origen, grado de calidad, tamaño y color.

8.2.2 La parte visible del producto en el envase debe ser representativa de todo el contenido.

8.2.3 Los envases deben estar exentos de cualquier materia y olor extraños.

8.2.4 Los envases deben satisfacer las características de calidad, higiene y ventilación para asegurar la manipulación, el transporte y la conservación adecuada del producto.

8.2.5 El uso de materiales, especialmente papel, cartón o sellos, que lleven especificaciones comerciales está permitido, siempre y cuando la impresión o el etiquetado se realice con tintas o pegamentos no tóxicos.

8.3 Embalaje

El embalaje debe ser de un material que garantice el buen manejo y conservación del producto.

9 BIBLIOGRAFÍA

NOM-008-SCFI-1993 - Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993.

NMX-FF-087-1995-SCFI - Productos alimenticios no industrializados para uso humano - Fruta Fresca - Limón mexicano - Especificaciones. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 25 de agosto de 1995.

CODEX STAN 217-1999 - Codex Standard for Mexican Limes.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

10 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana es equivalente a la norma internacional CODEX STAN 217-1999.

México, D. F. a
DIRECTOR GENERAL DE NORMAS

MIGUEL AGUILAR ROMO

ANEXO II

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA SEMILLA DE LIMON INMADURO Y SEMILLA DE LIMON MADURO

LIMONIN								
	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza de la media al 95%		Minimo	Maximo
					Límite inferior	Límite superior		
Inmaduro	26	5888.5773	219.9976	43.1451	5799.7184	5977.4362	5476.35	6358.00
Maduro	24	5509.4938	221.3177	45.1763	5416.0395	5602.9480	5107.36	5918.00
Total	50	5706.6172	290.3193	41.0573	5624.1094	5789.1250	5107.36	6358.00

Análisis de Homogeneidad y variabilidad LIMONIN

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
.249	1	48	.620

ANOVA LIMONIN

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F _{calculada}	Sig.
Entre grupos	1793430.210	1	1793430.210	36.843	.000
Dentro de los grupos	2336548.330	48	48678.090		
Total	4129978.540	49			

$$F_{\text{tablas}} = 4.08$$

Conclusión: $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$, por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que el estado de madurez del limón influye en la concentración de Limonin en las semillas.

LOTES DE SEMILLA DE LIMÓN INMADURO
LIMONIN

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza de la media al 95%		Minimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1.00	9	5846.2789	214.7829	71.5943	5681.1821	6011.3757	5476.35	6146.44
2.00	9	5812.4811	232.1944	77.3981	5634.0007	5990.9615	5560.18	6111.78
3.00	8	6021.7712	168.8035	59.6811	5880.6480	6162.8945	5861.25	6358.00
Total	26	5888.5773	219.9976	43.1451	5799.7184	5977.4362	5476.35	6358.00

Análisis de homogeneidad y variabilidad
LIMONIN

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
1.551	2	23	.233

ANOVA
LIMONIN

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F calculada	Sig.
Entre grupos	210143.096	2	105071.548	2.417	.111
Dentro de los grupos	999829.990	23	43470.869		
Total	1209973.087	25			

$$F_{tablas} = 3.42$$

Conclusión: $F_{calculada} < F_{tablas}$, por lo tanto no existe diferencia significativa en los lotes de semilla de limón inmaduro

Prueba Duncan
LIMONIN

	N	alfa = 0.05
LOTE		1
2.00	9	5812.4811
1.00	9	5846.2789
3.00	8	6021.7712
Sig.		.059

LOTES DE SEMILLA DE LIMÓN MADURO
LIMONIN

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza para la media al 95%		Minimo	Maximo
					Límite inferior	Límite superior		
1.00	9	5686.7811	104.5870	34.8623	5606.3884	5767.1738	5542.00	5918.00
2.00	9	5309.6022	109.3976	36.4659	5225.5118	5393.6926	5107.36	5427.32
3.00	6	5543.4000	242.4625	98.9849	5288.9512	5797.8488	5207.12	5800.97
Total	24	5509.4938	221.3177	45.1763	5416.0395	5602.9480	5107.36	5918.00

Análisis de Homogeneidad y variabilidad
LIMONIN

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
8.134	2	21	.002

ANOVA
LIMONIN

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F _{calculada}	Sig.
Entre grupos	649384.684	2	324692.342	14.289	.000
Dentro de los grupos	477190.559	21	22723.360		
Total	1126575.243	23			

$$F_{\text{tablas}} = 3.47$$

Conclusión: $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$, por lo tanto existe diferencia entre los lotes de semilla de limón maduro, debido a que el número de muestras tomadas en el tercer lote difiere de los otros dos.

Prueba Duncan
LIMONIN

	N	alfa = 0.05	
		1	2
LOTE			
2.00	9	5309.6022	
3.00	6		5543.4000
1.00	9		5686.7811
Sig.		1.000	.076