



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN ESQUEMA DE EXTRACCION  
DE FLAVONOIDES GLUCOSILADOS A PARTIR 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 :**

**CARLOTA EUGENIA RODRIGUEZ BARBA**



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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: Carlota Eugenia Rodríguez Barba

FECHA: 10 de Marzo 2004

FIRMA: \_\_\_\_\_

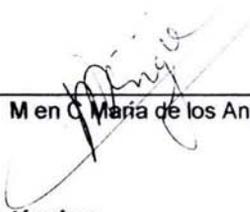
**Jurado asignado**

Presidente	Prof. Francisca Iturbe Chiñas
Vocal	Prof. María de los Angeles Valdivia López
Secretario	Prof. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
1er. Suplente	Prof. Enrique Martínez Manrique
2º. Suplente	Prof. Luz Sandra Sánchez Del Angel

**Sitio donde se desarrolló el tema**

Laboratorio 323, conjunto "E", Facultad de Química UNAM.

**Asesor del tema:**

  
M en C María de los Angeles Valdivia López.

**Supervisor técnico:**

  
Q.F.B. Bertha Julieta Sandoval Guillén.

**Sustentante:**

  
Carlota Eugenia Rodríguez Barba.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Rodolfo y María Eugenia por el amor, comprensión y apoyo que siempre me han brindado. Este logro más en mi vida es por ustedes muchas gracias, los quiero mucho.

A mis hermanos Rodolfo y Mariana por formar parte importante en mi vida, sin ustedes no habría sido la misma y esperando que esto les sirva de ejemplo para que logren alcanzar sus proyectos, que aunque a veces se ve difícil, no es imposible.

A mi abuelita Beni por el cariño, amor y cuidados que me ha brindado durante toda mi vida.

A Israel por comprenderme, apoyarme sin pedir nada a cambio y por su infinito amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora Angeles por su apoyo y consejos para la culminación de este proyecto.

A Julieta por su interés, dedicación y conocimientos en este trabajo muchísimas gracias.

A mis profesores Fanny y Juan Diego por brindarme su apoyo en la realización de este proyecto.

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>2</b>
<b>CAPITULO I. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
1.1 Los cítricos	3
1.1.1 Producción de cítricos	
1.1.2 Producción nacional y exportación	4
1.1.3 Usos del fruto	5
1.1.4 Taxonomía del limón	
1.1.5 Variedades nacionales	6
1.1.6 Morfología del fruto	
1.1.7 Composición química de los cítricos	7
1.2 Flavonoides	10
1.2.1 Flavonoides glucosilados	
1.2.2 Biosíntesis de flavonoides	12
1.2.3 Extracción	13
1.2.4 Absorción U.V.	14
1.2.5 Cromatografía de Líquidos de alta eficiencia (HPLC) para Cuantificar flavonoides	15
1.3 Alimentos funcionales	16
1.3.1 Acción de los flavonoides en los alimentos funcionales	17
<b>CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	<b>19</b>
2.1 Determinación de condiciones cromatográficas	19
2.1.1 Determinación de la composición en la fase móvil	20
2.2 Preparación de la muestra	
2.2.1 Obtención del jugo	21

2.2.2 Acondicionamiento de la cáscara	
2.3 Extracción de flavonoides glucosilados	
2.3.1 Porcentaje de recuperación en la extracción	22
2.3.2 Metodología	23
2.4 Determinación de Barridos espectrofotométricos	24
2.5 Tratamiento estadístico de los resultados	25
<b>CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>26</b>
3.1 Determinación de la composición en la fase móvil	26
3.2 Recuperación en la extracción	28
3.2.1 Cuantificación de flavonoides glucosilados (hesperidina y diosmina)	
3.2.1.1 Contenido de flavonoides glucosilados en el jugo de limón	30
3.2.1.2 Contenido de flavonoides glucosilados en cáscara de limón	37
3.3 Barrido espectrofotométrico en jugo de limón	46
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>50</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO II</b>	<b>63</b>

## INTRODUCCION

El limón ocupa dentro de los cítricos el segundo lugar en importancia, tanto por su consumo en fresco como por su uso industrial.

En nuestro país, la producción de limón mexicano está destinada principalmente a dos variedades: el limón persa o sin semilla y el limón mexicano o con semilla. En el caso del primero, su cultivo se da fundamentalmente en las entidades de la Costa del Golfo (Veracruz, Tabasco y Yucatán) la región contribuye con el 30% de la producción total. El limón persa participa con cerca de la tercera parte total nacional, su destino es fundamentalmente la exportación, lo que permite la generación de divisas para el país; mientras que para el segundo, la principal zona productora está en la Costa del Pacífico (Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero y Oaxaca), ocupando el 70% de la producción nacional y es el principal abastecedor del consumo doméstico.

Se ha establecido que en el limón hay una gran variedad de compuestos naturales, los cuales se distribuyen a través de los tejidos del fruto. Entre estos se encuentran los flavonoides glucosilados hesperidina y diosmina que son compuestos unidos a una o más moléculas de azúcar.

Los flavonoides son fitoquímicos, éstos pertenecen a un grupo de compuestos provenientes de plantas, que son considerados alimentos funcionales. Estos se definen como cualquier alimento en forma natural o procesada que además de sus componentes nutritivos contienen compuestos adicionales que favorecen a la salud. La actividad biológica de los flavonoides incluye su acción contra alergias, inflamaciones, antioxidantes, aglomeración de plaquetas, tumores y su acción inhibitoria de ciertas enzimas.

Con la realización de este proyecto se busca sentar las bases para dar un mejor aprovechamiento y mayor valor agregado en la producción del limón, ya que sólo se aprovechan ciertos componentes; como ejemplo, la cáscara es utilizada en la elaboración de aceites esenciales, extracción de pectina y bases para bebidas; la semilla se desecha o es utilizada para elaborar alimento para ganado y el jugo extraído sirve para elaborar jugos pasteurizados, concentrados, deshidratados y para helados y sólo se enfoca la utilización del fruto en estado inmaduro (coloración verde).

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo General**

- ◆ Conocer la influencia del estado de madurez en la concentración de los flavonoides glucosilados presentes en el jugo y la cáscara del limón en las variedades persa y mexicano, para aplicación en alimentos funcionales.

### **Objetivos Particulares**

- ◆ Establecer el esquema de extracción y de identificación de los flavonoides glucosilados en las dos variedades de limón y sus estados de maduración.
- ◆ Encontrar las condiciones óptimas de la cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de los flavonoides glucosilados del jugo y la cáscara de limón.
- ◆ Realizar un análisis espectrofotométrico del jugo de limón para cada variedad y estado de madurez, para obtener un perfil de los compuestos que las muestras contienen.

## CAPITULO I. ANTECEDENTES

### 1.1 LOS CÍTRICOS.

Los llamados cítricos, constituyen un género (*Citrus*) que se hace parte de la familia de las rutáceas y conforman varias especies, entre ellas: las naranjas (*Citrus sinerisis*, *Citrus aurantium*); los limones (*Citrus aurantifolia*); las mandarinas (*Citrus reticulata*, *Citrus reshni*) y los pomelos (*Citrus paradisi Maef*). Los cítricos son considerados como un conjunto de plantas que tuvieron su origen en las regiones tropicales y subtropicales de Asia y el archipiélago Malayo, propagándose luego en cultivo a diversas regiones del mundo. (Agrocadenas, 2002)

El limón no es originario de nuestro país y tampoco de nuestro continente. De acuerdo con los aportes que da la historia, se considera que fue introducido por los árabes al norte de África y al continente Europeo (principalmente a España). Con la colonización española, el limón llegó a nuestro país para ocupar un lugar importante en la citricultura nacional. (Infoaserca, 2000)

#### 1.1.1 PRODUCCION DE CÍTRICOS

A nivel mundial los cítricos son un grupo muy relevante dentro de las especies frutícolas. Los dos mayores productores 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.

De los principales productores de limas y limones México, India y Argentina, aparecen como los mayores productores en el mundo, seguidos de Irán, España, Estados Unidos, Italia, Brasil y Turquía, como se muestra en la gráfica 1. Las mayores tasas de crecimiento anual las presentan México, India, Argentina e Irán. (Agrocadenas, 2002)

## DISTRIBUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN MUNDIAL DE LIMAS Y LIMONES



Gráfica 1. Distribución de la producción mundial de limas y limones (Agrocadenas, 2002)

Dentro de las frutas que se cultivan en el mundo, los cítricos tienen un papel relevante en la dieta de los consumidores. La naranja en primer lugar, seguida de la mandarina, el limón, las limas y la toronja, entre otras. Sin lugar a dudas, uno de los cítricos de especial importancia es el limón, producto que se ha producido en los países denominados en vías de desarrollo como son los africanos y los asiáticos, por que al contar con las condiciones climatológicas idóneas y un mercado en expansión, han canalizado sus esfuerzos para hacer más productivo el sector y contribuir con la entrada de divisas. (Infoaserca, 2000)

### 1.1.2 PRODUCCIÓN NACIONAL Y EXPORTACIÓN

En nuestro país, la producción de limón mexicano está destinada principalmente a dos variedades: el limón persa o sin semilla, y el limón mexicano o con semilla. En el caso del primero, su cultivo se da fundamentalmente en las entidades de la Costa del Golfo (Veracruz, Tabasco y Yucatán), la región contribuye con el 30% de la producción total; mientras que para el segundo, la principal zona productora está en la Costa del Pacífico

(Colima, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Oaxaca), ocupando el 70% de la producción nacional.

El limón persa participa con cerca de la tercera parte del total nacional, su destino es fundamentalmente la exportación, lo que permite la generación de divisas para el país; mientras que la importancia del limón mexicano, radica en que es el principal abastecedor del consumo doméstico. (Infoaserca, 2000)

### 1.1.3 USOS DEL FRUTO

Como ya se mencionó, la comercialización del limón mexicano se realiza prácticamente en el mercado nacional. El 69.43% para el consumo en fresco, para el mercado de exportación sólo se dispone el 0.57%, mientras la industria abarca el 30%, en donde el jugo de limón es el más aprovechado.

La cáscara por ejemplo es utilizada en la elaboración de aceites esenciales, extracción de pectina y bases para bebidas. El bagazo sirve en la elaboración de alimento para ganado. La semilla por lo general es desechada o es utilizada para elaborar alimento para ganado y por último de la fruta fresca se extrae el jugo para concentrados, jugo pasteurizado, deshidratado y para helados. (Infoaserca, 2000)

### 1.1.4 TAXONOMIA DEL LIMÓN

**Familia:** *Rutaceae*

**Género:** *Citrus*

**Especie:** *Citrus limon*

**Origen:** Producto originario de Asia, fue introducido a nuestro país a partir de la colonización española.

**Porte:** Hábito más abierto (menos redondeado). El extremo del brote se conoce como "sumidad" y es de color morado. Presenta espina muy cortas y fuertes.

**Hojas:** Sin alas. Desprenden olor a limón.

**Flores:** Solitarias o en pequeños racimos. Floración más o menos continua, ya que es el cítrico más tropical.

**Fruto:** Es llamado Hesperidio de forma no esférica, su superficie es brillante y lisa, algunas especies son rugosas su color es verde y las hay con o sin semillas. (Infoagro, 2003)

### 1.1.5 VARIEDADES NACIONALES

Las variedades de limón comerciales cultivadas en México son: *limón persa o sin semilla* y *el limón mexicano o con semilla*.

El limón persa o "sin semilla", se dedica casi exclusivamente a la exportación, destacando sobremanera la producción en la zona de Martínez de la Torre, Veracruz.

El mexicano o con semilla, está destinado al abastecimiento del mercado nacional, debido a su mayor preferencia por parte de los consumidores. (Infoaserca, 2000)

### 1.1.6 MORFOLOGÍA DEL FRUTO

Las principales partes que conforman a los cítricos, son las siguientes:

**1.- El flavedo.** Es el tejido exterior que está en contacto con la epidermis y en él abundan vesículas o celdillas que contienen lípidos, aceites esenciales y cloroplastos. La cáscara de los cítricos, conocida como flavedo, es el tejido más rico en compuestos flavonoides y es la parte del fruto que rara vez es consumido.

**2.- El 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.

**3.- El endocarpio.** Es la parte comestible de los cítricos, y está formado por los carpelos o gajos que a su vez, están compuestos por vesículas que contienen el zumo y están separados por las membranas intercapilares.

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.

La pulpa y el bagazo quedan al extraer el zumo, contiene la mayor parte fibrosa y celulósica de las vesículas y por tal motivo, retienen una gran cantidad de zumo.

4.- Las **semillas**. De cubierta dura, lignocelulósica, contiene una importante cantidad de grasa. (Fennema, 1995)

En la figura 1 se encuentran esquematizadas las partes de un cítrico.

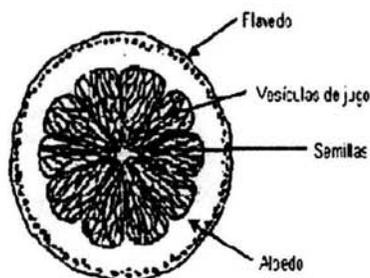


Figura 1. Partes que conforman un cítrico

### 1.1.7 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS CÍTRICOS

La composición química en los cítricos es influenciada por diversos factores tales como condiciones de crecimiento, maduración, variedad y clima.

**Carbohidratos.** En los cítricos, en especial el jugo de frutos ácidos como las limas y limones, los carbohidratos son los sólidos solubles que se encuentran en mayor proporción, seguidos de los ácidos orgánicos. Los principales azúcares en los zumos de las frutas cítricas son: sacarosa, glucosa y fructosa, con menores cantidades de galactosa. (Hirano, 1970)

De los azúcares, el contenido varía dependiendo del cítrico y va desde el 1% para el limón hasta 9% para la naranja. Las proporciones aproximadas para el limón son, para glucosa 2.4%, fructosa 2.4% y sacarosa 4.7%. (Fennema, 1995)

Existen amplias diferencias en el contenido de azúcar de diferentes jugos de cítricos. En la cascara de limón existe un 17.45% de pentosas y pentosanas expresados en términos de furfural. (Braverman, 1997)

**Ácidos Orgánicos.** Los frutos cítricos, se acostumbra clasificarlos como frutos ácidos, debido a que sus sólidos solubles están compuestos principalmente por ácidos orgánicos y azúcares; la acidez es provocada principalmente por el ácido cítrico y el ácido málico, y en menor cantidad los ácidos: tartárico, benzoico, succínico, oxálico y fórmico.

El cítrico es el ácido principal del endocarpio de todas las frutas cítricas tomando en cuenta que entre los principales ácidos de la cáscara se tiene: al oxálico, málico y el malónico con algo de cítrico que en conjunto constituyen del 30 al 50% de los aniones presentes.

Los ácidos cítrico y málico, así como sus sales, forman el principal sistema de amortiguación de los jugos cítricos; con tal sistema los jugos pueden diluirse con agua en gran medida, mostrando cambios insignificantes en su pH, razón por la cual los jugos de acidez titulable variable pueden tener valores idénticos de pH.

Además de los azúcares y los ácidos orgánicos, existen en el zumo otros componentes solubles que suman alrededor del 15% del total de sólidos solubles. (Hirano, 1970)

**Compuestos Nitrogenados.** Éste tipo de compuestos forman entre el 0.1 y 0.2% del total, la mayor parte del nitrógeno proviene de los aminoácidos (40-70%); las proteínas, el nitrógeno inorgánico y algunas bases nitrogenadas integran el resto. (Badui, 1996)

**Lípidos.** La mayor parte de los lípidos se encuentran en las semillas y en cantidades menores se encuentran en la piel, vesículas y el jugo. En este último se encuentra en porcentajes alrededor del 0.07 al 0.1% y está formado por monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos, glicolípidos y material insaponificable. En la semilla se encuentran principalmente Ácidos grasos saturados: Palmítico 20%, esteárico 4%, araquidónico 0.9% y de Ácidos grasos insaturados: linoleico 36.5%, Linolénico 0.6% y oleico 36.6%. (Fennema, 1995) (Braverman, 1997)

**Enzimas.** La pectinesterasa en frutas cítricas se encuentra en grandes concentraciones en las vesículas y disminuye en el flavedo y el albedo. Esta enzima provoca la coagulación de la materia suspendida en el jugo y la sedimentación rápida. (Fennema, 1995)

**Aceites esenciales.** El principal constituyente es la  $\delta$ -limonina que es uno de los compuestos responsables en el sabor y el aroma de los cítricos. En el aceite de limón el

aldehído que da estas características sensoriales al fruto es el *n-octil Aldehído* y *n-Nonil Aldehído*. (Fennema, 1995) (Braverman, 1997)

**Constituyentes volátiles.** Estos compuestos son asociados con el sabor y el aroma de los cuales se han encontrado 54 alcoholes, 41 aldehídos, 16 cetonas, 16 ésteres, 51 hidrocarburos y 10 ácidos. (Fennema, 1995)

**Pigmentos.** El color está dado principalmente en naranjas y mandarinas por carotenos y xantofilas, en el limón el pigmento verde consiste de dos componentes, clorofila a y clorofila b. La mayor parte de los carotenos se localizan en el flavedo (alrededor del 70%) y aumenta con la maduración al mismo tiempo que se degrada la clorofila.

**Minerales y Vitaminas.** Tiene un alto contenido de potasio (100-350 mg/mL) y bajo contenido en sodio (1-10 mg/mL). El potasio forma el 60-70% del total de las cenizas. La mayor porción de calcio y magnesio se encuentra combinado con la pectina.

En el limón se encuentran diferentes vitaminas como son: Vitamina C (ácido ascórbico) principalmente en el albedo y mesocarpo y Vitamina B<sub>1</sub> (tiamina). (Fennema, 1995) (Braverman, 1997)

**Flavonoides.** Son compuestos que caracterizan a los frutos cítricos y sus productos derivados. Se localizan tanto en el jugo como en los tejidos sólidos (cáscara, albedo, segmentos y membranas). Se distribuyen de manera no uniforme, pero es común que halla concentraciones más altas en los tejidos sólidos que en el jugo.

Existe una gran variedad de compuestos naturales que forman parte de los cítricos, los cuales generalmente se distribuyen en diferentes concentraciones a través de los tejidos de los frutos. Entre estos compuestos se encuentran los flavonoides, los cuales han llamado poderosamente la atención dentro de las industrias procesadoras de cítricos.

En general se considera que el contenido de flavonoides en los cítricos disminuye con la maduración aunque esto no ha sido demostrado claramente. Sin embargo Huent en 1962, demostró que el contenido de flavonoides en naranjas y toronjas disminuye en ciertas temporadas mientras que en otra se mantiene constante. (Reyo y Saval, 1990) (Tomás-Barberán, 2000)

## 1.2 FLAVONOIDES

Los flavonoides son un grupo de sustancias que se encuentran en la naturaleza derivados de la flavona cuya estructura se muestra en la figura 2

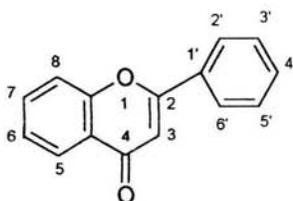


Figura 2. Estructura base de Flavonoides

Existen tres tipos de compuestos flavonoides en los cítricos: flavanonas (incluyen 3-hidroxiflavanonas o flavanoles) a la cual pertenece la hesperidina, las flavonas (incluyen las 3-hidroxiflavonas o flavonoles) la diosmina pertenece a este grupo de flavonoides y las antocianinas.

### 1.2.1 FLAVONOIDES GLUCOSILADOS

Son un grupo de flavonoides unidos a una ó más moléculas de azúcar, en el limón se han reportado la existencia de varios flavonoides glucosilados, las cuales se presentan en la tabla 1. (Vandercook, 1989)

Nombre	Estructura Química
Hesperidina	Hesperetin-7-rutinósido
Diosmina	Diosmetin-7-rutinósido
Eriocitrina	Eriocitrin-7-rutinósido
Rutinina	Rutin-7-rutinósido

Tabla 1. Flavonoides glucosilados en limón

La hesperidina es la flavonona glucosilada que se encuentra en mayor cantidad y después de su hidrólisis se obtienen como productos hesperidina, ramnosa y glucosa. Las estructuras de las principales flavonoides en el limón se muestran en las figuras 3 y 4

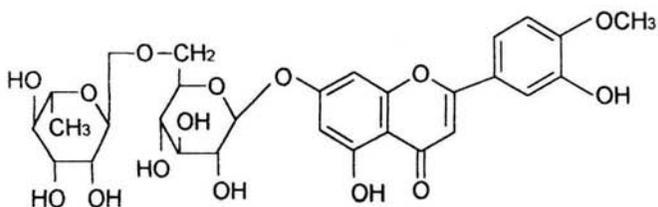


Figura 3. Estructura de la flavona diosmina

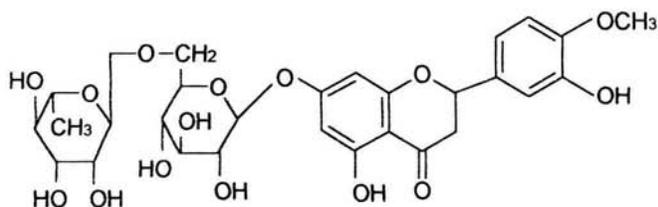


Figura 4. Estructura de la flavonona hesperidina

El contenido de flavonoides glucosilados se ve influenciado por la variedad de limón, como se muestra en la tabla 2

Variedad	Caract. del limón (Infoagro, 2003)	CÁSCARA mg/Kg cáscara seca			JUGO mg/ L jugo de limón			Ref.
		Hesperidina	Diosmina	Eriocitrina	Hesperidina	Diosmina	Eriocitrina	
Fino (clon 49)	Con semilla y cáscara delgada	5300-7900	4600-7000	2500-4100	2200-3400	390-410	1700-3300	Del Río, et al, 2004
Fino (clon 49)					204-244	10-16		Marín, et al, 2002
Vema (clon 50)	Alto contenido de zumo, sin semillas y cáscara gruesa				89-119	8-12		Marín, et al, 2002
Persa	Sin semillas y cáscara gruesa	1100						Larrañi, et al, 1996
Eureka	Sin semilla y cáscara delgada	1000	310					Vandercook y Tisserat, 1989

Tabla 2. Concentración de hesperidina, diosmina y eriocitrina en diferentes partes del limón.

### 1.2.2 BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES

Los flavonoides son sintetizados en las plantas a partir del aminoácido fenilalanina por medio de la ruta biosintética denominada "vía general fenilpropanoide". Esta importante vía genera un gran número de compuestos que tienen en común un grupo fenilo estructural. Los metabolitos secundarios derivados de esta vía incluyen, a los flavonoides, taninos, fenoles, ácidos benzóicos, estilbenos, ésteres de cinamatos y cumarinas. Una secuencia de reacciones convierte la fenilalanina a derivados de coenzima A (CoA) y

sucesivamente a ácidos cinámicos substituidos. Estos son subsecuentemente transformados a otros metabolitos. (Berhow, 1998)

Específicamente, los flavonoides se derivan de la conjugación de *p*-cumaril-CoA con tres moléculas de malonil-CoA para formar naringenin calcona, la cual es considerada la precursora de todos los flavonoides. Tres moles de malonil coenzima A (CoA) provenientes del metabolismo de glucosa se condensan por medio de la enzima calcona sintetasa para formar el anillo A de la estructura básica de los flavonoides. El anillo B y el C también vienen del metabolismo de la glucosa, pero por la vía general fenilpropanoide, a través de la fenilalanina, la cual es convertida a ácido cinámico y luego a ácido cumárico. (Lewinsohn, 1989)

Posteriormente el ácido cumárico convertido en *p*-cumaril-CoA se condensa con tres moléculas de malonil CoA, en un único paso enzimático, para formar naringenin calcona. (Merken, 2000)

La naringenin calcona se convierte rápidamente a su forma flavonona, la naringenina. La naringenina sufre modificaciones enzimáticas adicionales para dar lugar a los otros flavonoides: Las reacciones que dan lugar a los demás flavonoides son de reducción, oxidación, hidroxilación, O-metilación, C-glucosilación, O-glucosilación, sulfonación, rearreglo y polimerización. (Berhow, 1998) (Benavente-Garcia, et al,1993) (Castillo et al, 1993)

### 1.2.3 EXTRACCIÓN

La extracción y aislamiento depende de en que lugar se encuentren las flavonas. En el caso de que estos compuestos se encuentren en los aceites o ceras de la superficie, se obtienen simplemente por lavados en la superficie con un disolvente apropiado. En general se puede obtener por maceración y seguido de una extracción con algún disolvente.

Los disolventes utilizados en la extracción dependen de la polaridad de la flavona. Los disolventes poco polares son particularmente utilizados para la extracción de flavonoides y agliconas, tal como isoflavonas, dihidroflavonas y flavonoides metoxilados y los disolventes de mayor polaridad para flavonoides glucosilados. (Harborne, 1986)

En las plantas los flavonoides están en general glucosilados, por lo tanto son altamente polares. Se ubican preferentemente en las vacuolas y son hidrofílicos. Debido a eso hay que extraer y solubilizarlos en disolventes polares como agua y metanol. El lavado

con disolventes poco polares como son éter de petróleo o hexano y seguido de un lavado con diclorometano se solubilizan carotenoides, clorofila y flavonoides metoxilados. (Biblio, 2000)

#### 1.2.4 ABSORCIÓN U.V.

La espectrofotometría ha sido la técnica más usada para el análisis estructural de las flavonas por tener dos principales resonancias que en el espectro de absorción se observa como bandas de absorción características. La banda II, con máximos de absorción entre 240 y 285nm, se cree que es debido al anillo benzoico (A) de la estructura básica. La Banda I por el anillo cinamoil (B), tiene máximos de 300 a 550nm como se muestra en la figura 5 del núcleo flavona, donde se identifican los anillos A, B y C.



Figura 5. Absorción de Flavonas en UV

Mientras más sustituyentes oxigenados se encuentran en la flavona, hay una tendencia a absorber a mayores longitudes de onda.

La banda II es menos afectada por la oxigenación del anillo B, aunque las 3'4' flavonas dihidroxiladas generalmente tienden a formar dos picos en esa región, mientras que las 4'- flavonas tienden únicamente a formar un solo pico. (Harborne, 1986)

El análisis espectrofotométrico es el estudio cualitativo más rápido que se puede practicar a un jugo de fruta este proporciona un perfil de los compuestos que el jugo contenga.

Existen muchas variables asociadas con el crecimiento y proceso de los frutos cítricos, lo que dificulta la documentación exacta de la naturaleza física y química de los productos cítricos, sin embargo el análisis espectrofotométrico ha sido probado como buena herramienta para definir muchas de las características Fisicoquímicas de estos productos.

Petrus junto con Dougherty, en 1973, estudiaron los cambios durante el proceso y maduración de jugos de piña y naranja Valencia. En 1983, junto con Nagy, identificaron picos de inflexión (en un espectro realizado a jugo de naranja Valencia procedente de Florida) en longitudes de onda de 465 nm, 443 nm y 425 nm en la región visible; y de 325 nm, 280 nm y 245nm en la región ultravioleta. Los registros en la región visible, se deben principalmente a la presencia de carotenoides, los cuales se relacionaron con las notas obtenidas en un colorímetro Hunter usado por la industria en Florida para determinar las notas de color de los jugos de naranja. En un estudio de características de color de jugos de naranja, Petrus y Dougherty, en 1973, notaron que la madurez de la fruta incrementa la absorbancia en 443 nm.

Los estudios realizados en la variación de las proporciones de cada uno de los compuestos analizados por esta técnica en jugo de naranja Valencia han mostrado que la cantidad de carotenoides aumenta con la maduración, sin ser afectada por la presión de extracción del jugo. Las presiones altas de extracción causan una mayor incorporación de membranas capilares y de albedo al jugo obtenido del cítrico, entre mayor sean las concentraciones de flavonoides y los principios de acidez en el jugo, la calidad de este se ve reducida, cuando proporciones excesivas de estos constituyentes son procesadas junto con el producto. Las soluciones alcohólicas de las membranas capilares y albedo presentan grandes absorbancias a los 325 y 280 nm. (Petrus y Dougherty, 1973)

### **1.2.5 CROMATOGRAFÍA DE LIQUÍDOS DE ALTA EFICIENCIA (HPLC) PARA CUANTIFICAR FLAVONOIDES.**

En 1976, los investigadores Fisher y Wheaton fueron los primeros en analizar flavonoides por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Posteriormente, en el libro titulado "Técnicas para la identificación de flavonoides" publicado en 1982 se reconoce la popularidad en aumento de este método para el análisis de flavonoides. Sin embargo aún no estaba ampliamente estudiado y todavía se consideraba muy costoso. Ya para la década de los 90's, el HPLC se volvió uno de los

métodos más frecuentes empleados para estos análisis, apoyándose también de otras técnicas como la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas. (Markham, 1982)

Se han publicado gran variedad de condiciones cromatográficas para el análisis de las distintas subclases de flavonoides en diferentes plantas y alimentos. En los trabajos reportados se han encontrado factores en común. Las condiciones de la columna (fase estacionaria) son casi exclusivamente de fase inversa de  $C_{18}$ , con longitudes de 100 a 300mm y 4.6mm de diámetro interno. Los sistemas de elución o fase móvil, usualmente son binarios, con un disolvente polar acuoso (A) acidificado con ácido perclórico, ácido acético ó ácido fosfórico y un disolvente orgánico menos polar (B) como metanol o acetonitrilo. Como la mayoría de los flavonoides son ionizables, usualmente a la fase móvil se le controla el pH. El orden de elución de la fase más polar a la menos polar significa que los glucósidos son eluidos más rápidamente. (Bloor, 2001)

### 1.3 ALIMENTOS FUNCIONALES

La idea de los "alimentos funcionales" fue desarrollada en el Japón durante la década de 1980's, como una necesidad para reducir el alto costo de los seguros de salud que aumentaban por la necesidad de proveer cobertura a una población con mayor esperanza de vida, gracias a los avances en cuidado médico y una buena nutrición. Hasta el momento, Japón es el único país que ha formulado un proceso regulatorio específico para la aprobación de alimentos funcionales. Estos son conocidos como "alimentos para uso específico de salud" ("foods for specified health use" o FOSHU) y aquellos alimentos que son elegibles pueden portar un sello de aprobación del ministerio de salud y bienestar.

De forma progresiva se les ha dado a los alimentos una nueva connotación del término funcionalidad y como resultado, la prevención de enfermedades con base en la dieta diaria es vista cada vez más como una opción para una vida saludable. La cual ha llevado al desarrollo de productos diseñados para cubrir necesidades de salud específica.

El término alimentos funcionales ha estado sujeto a intenso debate por las diferentes opiniones que puede denotar y a pesar de no estar reconocido legalmente, este concepto está adquiriendo aceptación por parte del consumidor. Igualmente existen alrededor del concepto de alimentos funcionales diversos enfoques según el país, institución, autor y otros marcos de referencia. El nombre de alimentos funcionales es empleado con

frecuencia por los países europeos, y en los Estados Unidos se utiliza con mayor frecuencia el de nutraceuticos. En realidad no existe un acuerdo para definir en forma precisa lo que son los alimentos funcionales. Muchos consideran que se trata de un concepto aún en desarrollo y hay quienes los han considerado como productos alimentarios intermedios entre los tradicionales y los productos medicinales.

Se le llama Alimento funcional a 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. (Vasconcelos, 1998)

### 1.3.1 ACCIÓN DE LOS FLAVONOIDES EN LOS ALIMENTOS FUNCIONALES

Desde la década de los 80s se han conducido estudios reveladores que indican la existencia de diferentes clases de fitoquímicos que se presentan normalmente en los alimentos. Se cree que varios de estos tienen el potencial de interferir o bloquear las rutas bioquímicas a nivel celular que llevan al desarrollo de tumores malignos.

Estos grupos son los siguientes: flavonoides, carotenoides, cumarinas, mono- y triterpenos, lignanos, ácidos fenólicos, entre otros. En consecuencia, han proliferado las investigaciones sobre los efectos benéficos de compuestos biológicamente activos contenidos en la dieta y en las plantas usadas en la medicina tradicional.

Últimamente las compañías productoras de ingredientes y aditivos han introducido al mercado una gran variedad de productos con compuestos biológicamente activos. Sucesivamente se ha favorecido el diseño y formulación de alimentos funcionales al aumentar la disponibilidad de extractos, concentrados, aislados, y otras presentaciones de ingredientes y aditivos funcionales. De tal manera que la composición de los productos alimentarios ordinarios pueda ser modificada para el desarrollo de los alimentos nuevos con un beneficio adicional a la salud. Esto se logra de alguna de las siguientes formas:

- Agregando ingredientes biológicamente activos que normalmente no están presentes en cierto alimento y que así tenga un efecto benéfico adicional.
- Aumentando la concentración de un componente específico para alcanzar las dosis adecuadas que puedan ejercer el efecto benéfico.
- También reemplazando algún componente que esté en exceso o sea dañino, y sustituyéndolo por uno con efectos benéficos.

Con lo anterior se observa la enorme gama de posibilidades para la creación de nuevos productos, diseñados específicamente para proporcionar a largo plazo un beneficio a la salud. Proporcionándoles un carácter saludable diferente al que se reconocía tradicionalmente

Las frutas cítricas son ricas fuentes de flavonoides cítricos, incluyendo los compuestos diosmina y hesperidina que son encontrados en naranjas, toronjas y limón. Estos compuestos favorecen también los efectos del ácido ascórbico (Vitamina C).

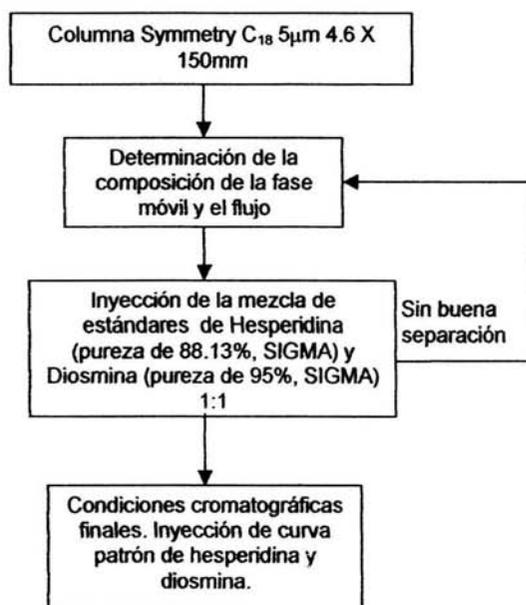
La actividad biológica de los flavonoides incluye su acción contra alergias, inflamaciones, antioxidantes, hepatoxinas, aglomeración de plaquetas, microorganismos, úlceras, virus y tumores y su acción inhibitoria de ciertas enzimas.

Por ejemplo: los flavonoides bloquean la enzima de conversión de angiotensina (ECA) que causa aumento de la presión arterial; previenen la "gomosidad" de las plaquetas y por lo tanto su aglomeración; protegen el sistema vascular y fortalecen a los pequeños capilares que llevan oxígeno y otros nutrientes esenciales a todas las células. Además de todo lo anterior los flavonoides bloquean las enzimas que producen estrógeno. Los resultados de estudios llevados a cabo usando ratas han demostrado que la diosmina y la hesperidina inhiben carcinogenesis por reducción de los niveles de poliaminas, presentes en toda célula, la familia de éstas incluyen putrescina y espermidina y sus derivados, que cumplen una importante función en el crecimiento y proliferación celular. (Vasconcelos, 1998) (Dillard, 2000)

## CAPITULO II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 2.1 DETERMINACIÓN DE CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Para establecer la fase móvil en la cual se obtuviera la mejor separación, se utilizó una Columna Symmetry 4.6 X 150mm con un tamaño de partícula de 5 $\mu$ m, y una fase móvil binaria entre Tetrahidrofuranio (THF) – Agua a diferentes porcentajes y un flujo de 0.8 mL/min basado en estudios anteriores (Arana, 2002). Debido a que no se obtuvo la separación esperada de los dos flavonoides (hesperidina y diosmina) se siguió el esquema 1 para la optimización de las condiciones cromatográficas.



Esquema 1

### 2.1.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN EN LA FASE MÓVIL

Las condiciones cromatográficas para el análisis de flavonoides glucosilados está basada en el trabajo realizado por El Shafae, 2001

Siguiendo el esquema 1 la columna que se utilizó para determinar las condiciones cromatográficas optimas fue una Symmetry C<sub>18</sub> 5 $\mu$ m 4.6X150mm. Se manejaron diferentes porcentajes de Metanol- H<sub>2</sub>O, los cuales fueron 40-60, 50-50 y 60-40 respectivamente, ya que estos disolventes son miscibles entre sí, y permiten el manejo fácil para el cambio de la polaridad en la fase en un sistema isocrático, hasta obtener una buena separación de los compuestos en estudio. Por reportes anteriores de Arana, 2002 se utilizó inicialmente un flujo de 0.8mL/min.

Se inyectaron la mezcla de estándares, la hesperidina con una pureza de 88.13% marca SIGMA y la diosmina con un 95% de pureza también SIGMA, los cuales se disolvieron en Dimetilformamida y se sonicaron por cinco minutos.

El equipo utilizado para el análisis cromatográfico fue el siguiente:

- Cromatógrafo de líquidos de alta presión, Beckman System Gold Programmable Solvent Module 126
- Programmable Detector Module 166. Detector UV/Vis

### 2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de la variedad de limón mexicano con semilla del estado de Colima fueron adquiridas en el mercado de la Merced (4 Kg de cada estado de maduración) y para la variedad de limón persa o sin semilla (2 Kg en sus dos estados de maduración).

El segundo lote de variedad de limón mexicano o con semilla provienen de Michoacán también en dos estados de maduración.

El estado de madurez se determinó a partir de el color del fruto y textura del fruto de acuerdo a lo establecido en la NORMA NMX - FF - 087 - SCFI - 2001 Productos alimenticios no industrializados para uso humano - fruta fresca - Limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*). Las características principales para el estado inmaduro el color verde y la textura rugosa en la cáscara y para el estado maduro color amarillo y la textura lisa en la cáscara. (Ver ANEXO I)

### 2.2.1 OBTENCIÓN DEL JUGO

Se procedió a lavar las muestras, una vez limpias y secas se partieron con un cuchillo.

La obtención del jugo fue realizada de forma manual con un exprimidor de jugo, se almacenó en frasco de plástico en congelación y de esos mismos frutos se separó la cáscara.

Se tomaron cinco muestras de cada uno de los lotes los cuales son los siguientes:

1. Lote adquirido en el mercado de la Merced de la variedad de limón mexicano proveniente de Colima.
2. Lote procedente del estado de Michoacán variedad de limón mexicano o con semilla.
3. Lote adquirido en el mercado de la Merced de la variedad de limón persa o sin semilla.

### 2.2.2 ACONDICIONAMIENTO DE LA CÁSCARA

A las muestras de cáscara se les disminuyó el tamaño de partícula con una licuadora, se secaron en un horno a 65°C por ocho horas, posteriormente se molieron y por último se tamizaron con una malla 30 (0.589mm) para obtener una muestra homogénea.

A las muestras se les realizaron dos extracciones y se inyectaron cada una por triplicado, para así obtener el mismo número de lecturas tanto en el jugo como la cáscara.

### 2.3 EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES GLUCOSILADOS

La extracción de los compuestos flavonoides, está basada en el trabajo desarrollado por García, 1988. El principio para la separación de éstos, es su polaridad.

Siguiendo el esquema 2, se tiene que la dilución con metanol ayuda a precipitar las pectinas para posterior separación por medio de una centrifugación.

La adición de agua en el sobrenadante, facilita la separación entre los carotenos de las flavonas metoxiladas y los flavonoides glucosilados.

La extracción con hexano se emplea para separar los carotenos del medio; una vez aislados, se adicionan 30mL de agua, con el objeto de aumentar la polaridad del medio y

facilitar la separación entre los compuestos flavonoides. Se agrega 50mL de diclorometano por duplicado para extraer las flavonas metoxiladas, por lo que en el medio quedan los flavonoides glucosilados.

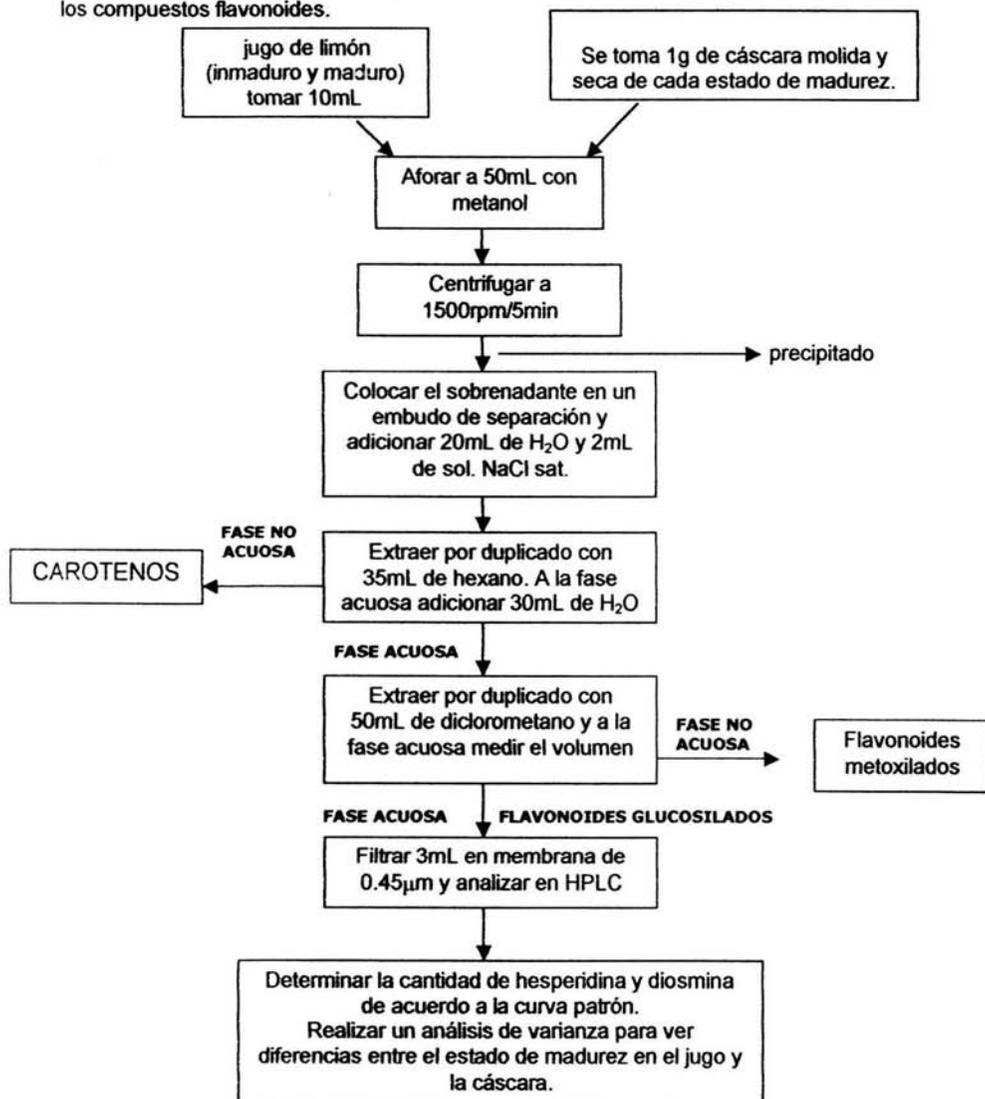
### **2.3.1 PORCIENTO DE RECUPERACIÓN EN LA EXTRACCIÓN**

Para conocer la recuperación de los flavonoides en la extracción se tomaron tres muestras de jugo de limón del lote de la variedad mexicano o con semilla de Colima y se agregaron 10mg de hesperidina para que al final de la extracción se obtuvieran aproximadamente 0.1mg de hesperidina por mililitro de jugo de limón. Por otro lado se tomaron otras tres muestras de jugo de limón del mismo lote y se realizó la extracción normal, cada una se inyectó por triplicado en el HPLC.

El % de recuperación se obtendrá de la diferencia de los datos que se obtengan de la extracción del jugo adicionando 10mg de hesperidina y los resultados de la extracción del jugo solamente.

### 2.3.2 METODOLOGÍA

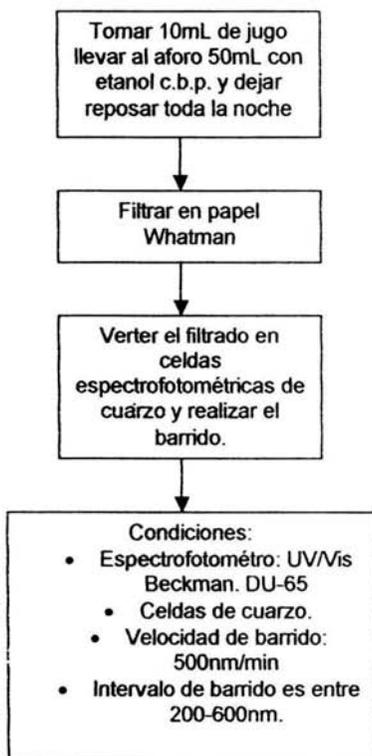
En el esquema 2 se presentan en forma resumida la metodología para la extracción de los compuestos flavonoides.



Esquema 2

## 2.4 DETERMINACIÓN DE BARRIDOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS

En el esquema 3, se presenta la metodología general para determinar los barridos espectrofotométricos.



Esquema 3

## **2.5 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

El análisis de los resultados se realizó con el método de cálculo SPSS (8.0 para Windows).

El coeficiente de variación es el cociente entre la desviación tipo de una distribución de datos y su media aritmética, el resultado se presenta en porcentaje, se trata de un índice de dispersión utilizado para la comparación de dos o más datos.

### **CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

Este proyecto consta de dos partes fundamentales, por lo que los resultados y discusión, se presentan en el siguiente orden: optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis de flavonoides glucosilados, porcentaje de recuperación de la extracción, cuantificación en las muestras de jugo y cáscara de limón y barridos espectrofotométricos del jugo de limón.

#### **3.1 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN EN LA FASE MÓVIL**

De acuerdo a las características de los dos compuestos a separar son hidrofílicos por el tipo de estructura que confieren a los flavonoides y a lo reportado por El-Shafae, 2001 la fase móvil en la cual se obtuvo la separación de los flavonoides glucosilados fue la fase binaria Metanol / H<sub>2</sub>O con una proporción (50:50), la elución de los compuestos era lenta y esto traía como consecuencia que el tiempo de corrida fuera de 45min y picos ensanchados.

Como no se obtuvieron las mejores condiciones de separación se implementaron datos de estudios previos realizados por Bloor, 2001 y Vandercook, 1989, donde las condiciones cromatográficas utilizadas para los flavonoides son sistemas de elución o fase móvil, usualmente binarios, con un disolvente polar acuoso (A) acidificado con ácido fosfórico y disolvente orgánico menos polar (B) como metanol y como la mayoría de los flavonoides son ionizables, a la fase móvil se le controla el pH ya sea 2.3 o 7.

El flujo inicial que se probó fue de 0.8mL/min, para que la interacción de los compuestos con la fase móvil fuera más rápida y el tiempo de corrida disminuyera se aumentó el flujo a 1mL/min.

Las condiciones finales donde se obtuvo la mejor separación de los flavonoides glucosilados (hesperidina y diosmina) y tiempo de corrida de 15min fueron las siguientes:

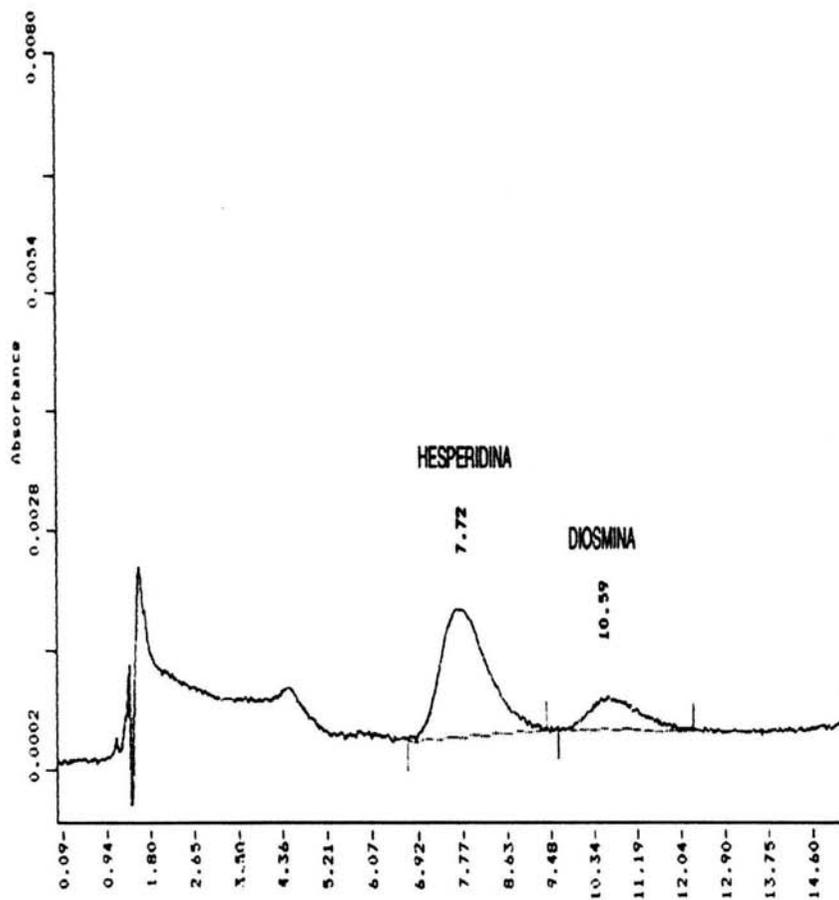
Columna Symmetry C<sub>18</sub> 4.6 X 150mm con 5µm de diámetro

Detector UV/Vis λ 325nm

Fase móvil MeOH – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.01M pH 7 (50:50) isocrático

Flujo de 1mL/min y Loop 20µL

Los resultados finales se observan en el cromatograma 1.



Cromatograma 1. Perfil de estandar (Hesperidina y diosmina)

En el cromatograma 1 se pueden apreciar 2 picos, el primero corresponde a la hesperidina con tiempo de retención de 7.72 min. y la diosmina con tiempo de 10.59 min.

### **3.2 RECUPERACIÓN EN LA EXTRACCIÓN**

La recuperación de la hesperidina se realizó para conocer la cantidad de la flavonona glucosilada que se estaba extrayendo con la metodología empleada.

Se pusieron diez miligramos de hesperidina tomando en cuenta la cantidad de disolventes que intervienen durante la extracción y lo que se esperaba obtener al final de ésta de acuerdo a lo reportado por Marín, et al, 2001, el cual menciona que la concentración de hesperidina en el jugo de limón variedad Fino (clon 49) es de 0.104 mg/mL de jugo.

Se obtuvieron dos resultados, el primero de la extracción con el estándar interno fue de 0.2186 mg/ mL de jugo promedio y el segundo de la extracción del jugo solamente es de 0.1286 mg/ mL jugo promedio. Si realizamos la diferencia entre ellos el resultado es de 0.09 mg Hesp. / mL de jugo, en relación con una concentración de hesperidina del 0.10 mg/ mL jugo, lo cual es nuestro. 100%, entonces se obtuvo una recuperación de hesperidina del 90%.

Esto indica que, con el método de extracción empleado, se pudo obtener la mayor cantidad de flavonoides glucosilados presentes en el jugo y cáscara de limón.

#### **3.2.1 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES GLUCOSILADOS (HESPERIDINA Y DIOSMINA)**

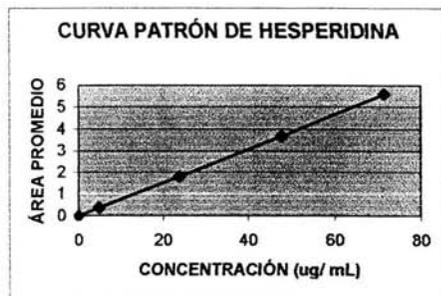
Una vez conocidas las condiciones cromatográficas y conociendo la recuperación en la extracción, se procedió a cuantificar los flavonoides glucosilados en las muestras de jugo y cáscara de limón, para evaluar la diferencia entre los estados de madurez.

Los resultados en el jugo y cáscara, mostraron que cada una de las muestras presentó dos registros. Los tiempos de retención de éstos fueron constantes, por lo cual se puede decir que el jugo de limón y la cáscara solo presentaron dos flavonoides glucosilados las cuales se identificaron como hesperidina y diosmina.

Para cuantificar a la hesperidina y la diosmina se realizó una curva patrón con los estándares. Esta determinación se llevó a cabo por triplicado y los resultados se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Curva patrón de hesperidina

Concentración( $\mu\text{g/mL}$ )	Área promedio	%CV
4.8	0.366	5.68
23.8	1.795	3.29
47.6	3.663	5.41
71.4	5.590	4.07



Gráfica 2. Curva Patrón de HESPERIDINA

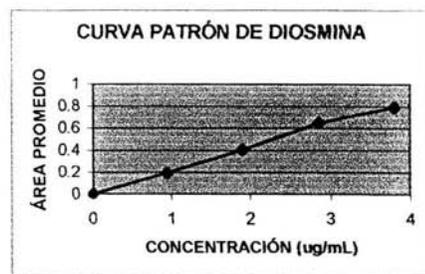
Ordenada = -0.0241

Pendiente = 0.0781

Correlación=0.9998

Tabla 4. Curva patrón de diosmina

Concentración( $\mu\text{g/mL}$ )	Área promedio	%CV
0.95	0.193	5.97
1.90	0.403	6.21
2.85	0.645	7.44
3.80	0.787	2.65



Gráfica 3. Curva Patrón de DIOSMINA

Ordenada = 0.0004

Pendiente = 0.2133

Correlación 0.9975

### 3.2.1.1 CONTENIDO DE FLAVONOIDES GLUCOSILADOS EN JUGO DE LIMÓN

Se analizaron tres lotes de limón, para cada uno de los limones seleccionados. Se tomaron cinco muestras por cada estado de madurez. Se realizaron tres extracciones por muestra y se inyectaron por duplicado en el HPLC (n = 30 por cada estado de madurez)

En la tabla 6 se muestran los resultados promedio de los dos flavonoides glucosilados que se registraron al analizar el jugo de limón de cada lote.

Lote	Variedad	HESPERIDINA				DIOSMINA			
		Inmaduro (ppm)	%CV	Maduro (ppm)	%CV	Inmaduro (ppm)	%CV	Maduro (ppm)	%CV
1	Limón mexicano o con semilla de Colima	197.58	5.96	70.98	8.62	21.44	4.20	17.01	4.65
2	Limón mexicano o con semilla de Michoacán	255.80	2.68	130.10	5.37	13.05	10.50	7.80	6.98
3	Limón persa o sin semilla	127.88	4.57	48.75	3.99	17.83	5.58	9.70	8.88

Tabla 5. Promedios de las concentraciones de hesperidina y diosmina en las muestras de jugo de limón de los tres lotes analizados. Los resultados se encuentran expresados en mg flavonoide glucosilado por litro de jugo de limón.

#### • HESPERIDINA

Se puede apreciar que el lote de limón mexicano o con semilla de Michoacán presenta la mayor concentración de hesperidina, le sigue el lote de la misma variedad pero de Colima y por último el lote de la variedad de limón persa o sin semilla que presentó la menor cantidad de hesperidina. Respecto al estado de madurez los tres lotes analizados presentaron la mayor concentración en el jugo de limón inmaduro.

De acuerdo a lo reportado por Marín, et al, 2001 e Infoagro, 2000, el jugo extraído manualmente de la variedad de limón Fino (clon 49), el cual contiene semillas y cáscara delgada, la concentración de hesperidina se encuentra en el intervalo de 204 - 244ppm. Los resultados de los lotes del limón mexicano o con semilla de Colima y el lote de limón

persa o sin semilla están por debajo de lo reportado y el lote de limón mexicano de Michoacán la concentración de hesperidina está por arriba de lo que se reporta.

Los dos lotes de limón mexicano antes mencionados a pesar de ser la misma variedad difieren entre sí ya que existen algunos factores que afectan la cantidad de los flavonoides en el fruto como son el lugar de procedencia, tipo de cultivo y clima. Esto se puede explicar ya que, Colima presenta un clima cálido, tropical lluvioso con una temperatura máxima de 39°C y una mínima de 16°C. Es seco en otoño, invierno y primavera. El bajo contenido de manganeso de los suelos agrícolas ha beneficiado el cultivo de cítricos, fundamentales para la economía del estado, en comparación con el estado de Michoacán que presenta sequía entre seis y ocho meses, la temperatura más alta se registra en la costa, la cual es de 29°C. (Careaga y Gerez, 1984)

Para el lote de la variedad persa o sin semillas, la concentración de hesperidina que se obtuvo fue mayor a lo reportado por Marin, et al, 2002 e Infoagro, 2000 para la variedad de limón Verna (clon 50) el cual tiene un elevado valor de zumo, el fruto es prácticamente sin semillas y de cáscara gruesa, el intervalo de concentración de la flavonona es de 89 a 119ppm. El valor reportado difiere del obtenido, ya que algunos factores que afectan la cantidad de los flavonoides en el fruto depende de la variedad de limón, estado de madurez, así como manejo de la muestra, lugar de procedencia y almacenamiento.

Respecto a la madurez del fruto es importante recordar que las muestras de limón se seleccionaron con base al color y textura de la cáscara de acuerdo a lo establecido en la NORMA NMX – FF- 087 – SCFI – 2001 Productos alimenticios no industrializados para uso humano – fruta fresca – Limón mexicano (*Citrus aurantifolia Swingle*). (Ver ANEXO I) El limón mexicano debe presentar coloración uniforme, pasando del verde al amarillo conforme avanza su madurez fisiológica.

Para comprobar la influencia del estado de madurez en las muestras del jugo de limón analizadas, se llevó a cabo el análisis de varianza donde se mostró que si existe diferencia significativa, lo que indica que el estado de madurez del fruto si influye en la concentración de hesperidina, siendo el estado inmaduro el que contiene mayor cantidad de esta flavonona. (Ver ANEXO II)

Esta diferencia se puede explicar de acuerdo a que en los cítricos la acumulación de los flavonoides mayoritarios está en función del crecimiento del fruto. Los niveles de la flavonona hesperidina son construidos rápidamente cuando el fruto comienza la fase de

crecimiento o desarrollo. La acumulación de los flavonoides en el jugo de limón es muy alta en frutos que han completado su desarrollo y disminuyen debido al incremento en el contenido de agua en las vesículas de el jugo, ya que las paredes del fruto incrementan su permeabilidad. (Vandercook y Tisserat, 1989)

#### • DIOSMINA

Para la segunda flavona glucosilada, el lote de limón mexicano o con semilla procedente del estado de Colima presenta la mayor concentración en comparación con los lotes de Michoacán y la variedad persa o sin semilla. Respecto al estado de madurez, la cantidad de diosmina está en mayor concentración en estado inmaduro que en el maduro, para los tres lotes estudiados.

De acuerdo a lo reportado por Marín, et al, 2002 e Infoagro, 2000 en el jugo extraído manualmente de la variedad de limón Fino (clon 49) con semillas, la concentración de diosmina está entre 10 y 16ppm. Respecto a lo reportado, la variedad de Michoacán el contenido de este flavonoide se encuentra dentro del intervalo y para el lote del estado de Colima la concentración fue mayor.

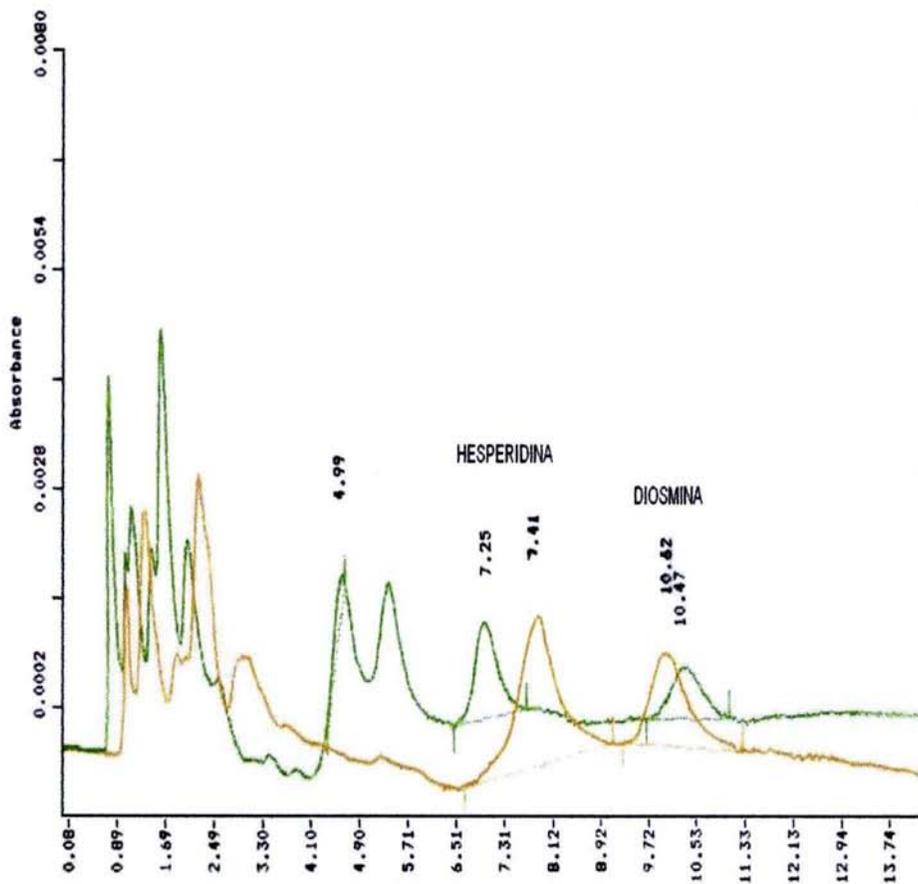
Para la variedad de limón Verna (clon 50) sin semillas, la concentración de diosmina reportado se encuentra entre 8 y 12ppm. Para el lote de la variedad persa o sin semilla, el contenido de diosmina que se obtuvo fue mayor a lo reportado.

Para comprobar la influencia del estado de madurez en el contenido de diosmina en las muestras del jugo de limón analizadas, se llevó a cabo el análisis de varianza donde se mostró que si existe diferencia significativa, lo que indica que el estado de madurez del fruto si influye en la concentración de diosmina. (Ver ANEXO II)

En general el contenido de diosmina es mayor en frutos inmaduros que en los maduros ya que existen diversas reacciones como la biosíntesis de los compuestos flavonoides. La concentración de la flavonona hesperidina es alta desde el desarrollo del fruto y es el precursor de la flavona diosmina. Esto indica que en la síntesis, la diosmina se produce después de la hesperidina y llega a su máxima concentración cuando el fruto ha completado su crecimiento antes de ser cosechado. Después intervienen reacciones de degradación en el fruto cuando ha sido cultivado. (Marín, et al, 2002)

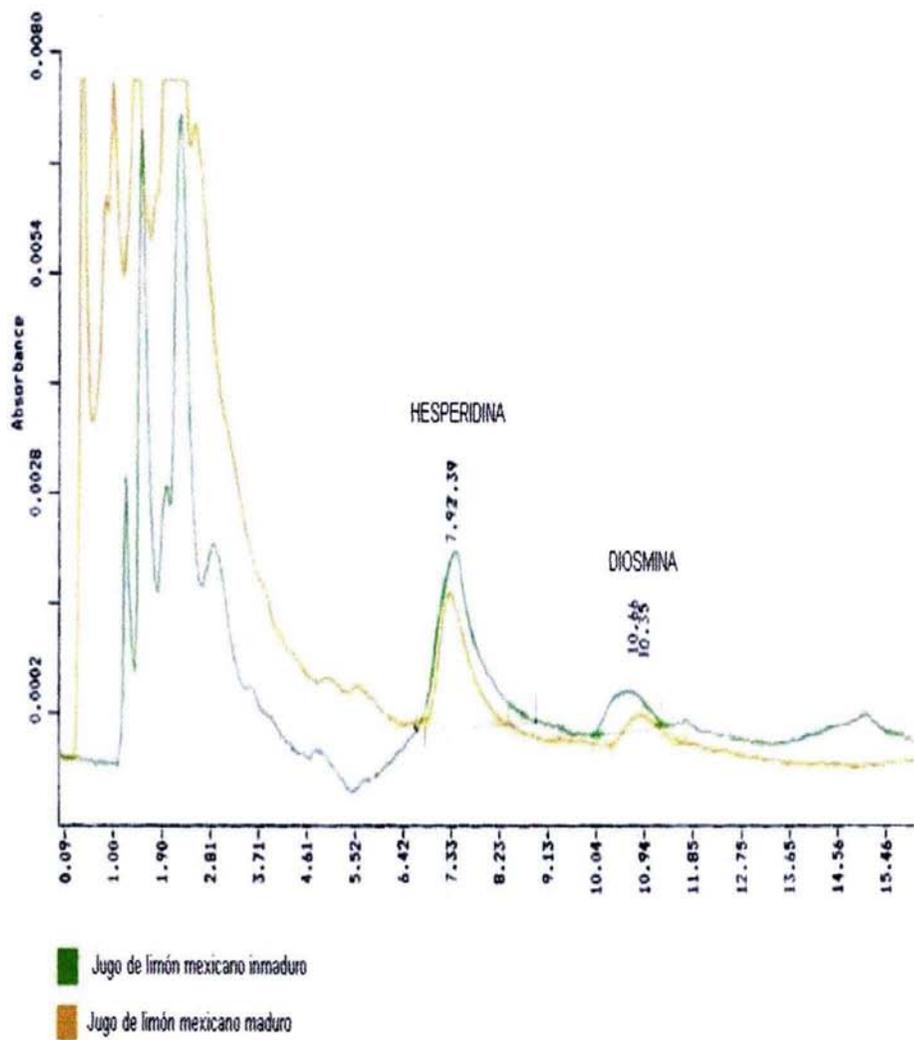
En los tres lotes estudiados (Cromatogramas 2, 3 y 4) se presentan dos registros en común los cuales corresponden a la hesperidina y la diosmina siendo la primera la que presentó la mayor respuesta. En la bibliografía Vandercook y Tisserat, 1988 hacen mención de cuatro flavonoides glucosilados encontrados en el jugo de limón los cuales se

identifican como eriocitrina, hesperidina, rutinina y diosmina, si se observa el cromatograma 2 es el único que presenta claramente los cuatro registros, ésto se puede deber a que esta variedad de limón cultivada en Colima presenta mayor contenido de los otros dos flavonoides glucosilados por lo cual se pudieron registrar en el cromatograma. Y solo se presentaron en el estado maduro ya que la eriocitrina es sintetizada a partir de hesperidina y diosmina a la par de la inactivación de la enzima 4'- O- metiltransferasa, mientras que la activación de la enzima glucosiltransferasa, produce la eriocitrina. (Del Río, et al, 2004)

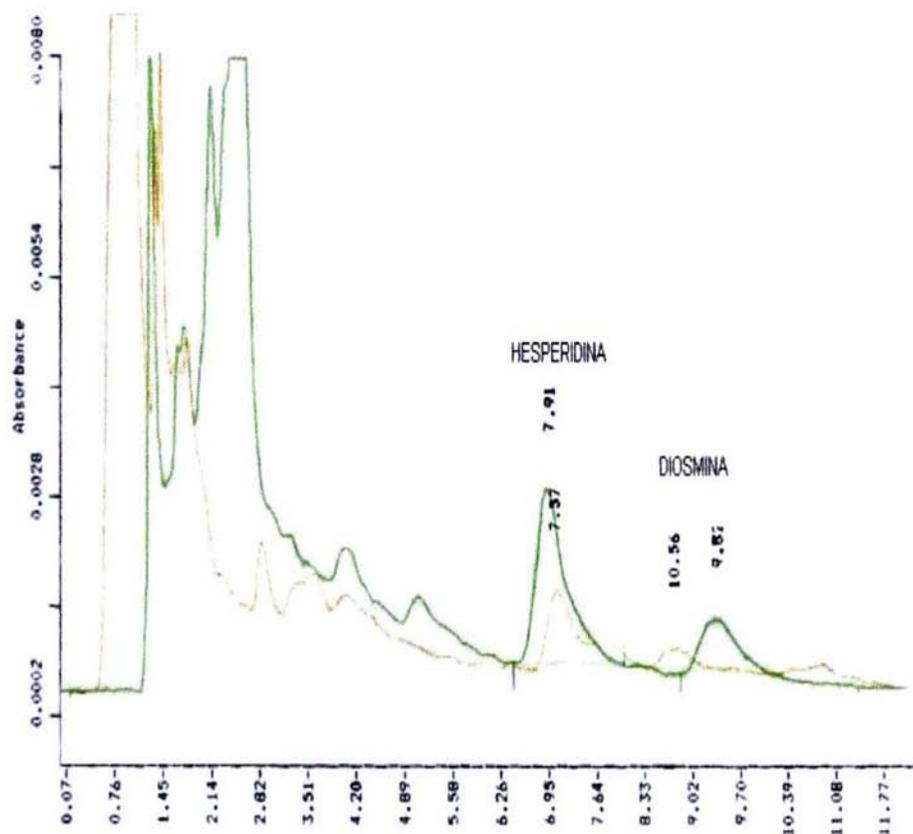


- Jugo de limón mexicano maduro
- Jugo de limón mexicano inmaduro

Cromatograma 2. Perfil de flavonoides glucosilados de jugo de limón de Colima



Cromatograma 3. Perfil de flavonoides glucosilados de jugo de limón de Michoacán



■ Jugo de limón persa inmaduro

■ Jugo de limón persa maduro

Cromatograma 4. Perfil de flavonoides glucosilados de jugo de limón persa

### 3.2.1.2 FLAVONOIDES GLUCOSILADOS EN CÁSCARA DE LIMÓN

De igual manera que en el jugo se analizaron tres lotes de limón, para cada limón seleccionado. Se tomaron cinco muestras por estado de madurez, se realizaron dos extracciones por muestra y se inyectaron por triplicado en el HPLC (n = 30 para cada estado de madurez).

Lote	Variedad	HESPERIDINA				DIOSMINA			
		Inmaduro (ppm)	%CV	Maduro (ppm)	%CV	Inmaduro (ppm)	%CV	Maduro (ppm)	%CV
1	Limón mexicano o con semilla de Colima	3750	6.57	2840	4.66	245	2.89	73	4.09
2	Limón mexicano o con semilla de Michoacán	3850	2.99	2860	6.41	366	5.46	41	10.00
3	Limón persa o sin semilla	5040	4.49	2620	9.24	322	6.51	146	5.90

Tabla 6. Promedios de las concentraciones de hesperidina y diosmina en las muestras de cáscara de limón de los tres lotes analizados. Los resultados están expresados en mg de flavonoides glucosilados por Kilogramo de cáscara seca.

#### • HESPERIDINA

En la tabla 6 se muestran los resultados promedios de cada uno de los flavonoides glucosilados que se registraron al analizar la cáscara de limón de cada lote. Se puede apreciar que el lote de limón persa o sin semilla presenta la mayor concentración de hesperidina, ésto se puede deber a que la cáscara es más gruesa en esta variedad que en la de limón mexicano o con semilla. Entre los lotes de la variedad de limón mexicano o con semilla no presentaron diferencia entre sí.

Respecto al estado de madurez, la cantidad de este flavonoide se comporta igual que en el caso del jugo, se encuentra en mayor concentración en estado inmaduro que en el maduro para los tres lotes estudiados.

En la literatura (Vandercook y Tisserat, 1989) e (Infoagro, 2000) se menciona que en la cáscara de la variedad de limón Eureka, el cual es sin semillas y cáscara delgada, la concentración de hesperidina es de 1000ppm, los resultados obtenidos están por encima de lo reportado . De acuerdo a Larrauri, 1996 reportó para la variedad de limón Persa de La Habana, la cual tiene como características un elevado valor de zumo, prácticamente sin semillas y de cáscara gruesa y presenta una concentración de hesperidina de 1101ppm, nuevamente los resultados obtenidos fueron mayores a los datos de la bibliografía.

Cabe mencionar que la concentración de hesperidina reportada por Vandercook y Tisserat, 1989 y Larrauri, 1996 difieren entre sí, debido a una característica particular del fruto la cual es el tipo de cáscara, entre más gruesa sea mayor cantidad de flavonoides glucosilados existirán en el limón. La característica existente en la cáscara se vio reflejada en los resultados obtenidos.

Para comprobar la influencia del estado de madurez en las muestras de la cáscara de limón analizadas se llevó a cabo el análisis de varianza, donde se mostró que si existe diferencia significativa, lo que indica que el estado de madurez del fruto si influye en la concentración de hesperidina. (Ver ANEXO II)

Esta diferencia se puede explicar de acuerdo a que los frutos cítricos generalmente se dejan madurar en el árbol, ya que su respiración progresa lentamente. Cuando el cítrico es separado de la planta, no recibe más agua ni nutrientes y la fotosíntesis cesa. Sin embargo, prosigue la respiración del tejido, así como diversas reacciones, entre las que influyen la degradación de la clorofila, de enzimas, sustancias pécticas y compuestos fenólicos (flavonoides). (Cheffer, 1976)

Marín y Del Río, 2001 encontraron que la proporción de diosmina y hesperidina es modificada cuantitativamente cuando el proceso de desarrollo del fruto es completado, es decir, cuando el fruto comienza la fase de envejecimiento la cantidad de estos compuestos van disminuyendo. De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo observar como afecta la última fase al fruto cosechado ya que existe una degradación o disminución de los compuestos flavonoides en el limón.

#### • DIOSMINA

Para la segunda flavona glucosilada, el lote de limón mexicano o con semilla procedente de Michoacán presenta la mayor concentración de diosmina. Le sigue el lote de la variedad de limón persa o sin semilla. Por último el lote de Colima es el que presentó la menor cantidad de diosmina. Respecto al estado de madurez los tres lotes siguen la misma tendencia que con la hesperidina, presentando mayor concentración la cáscara de limón inmaduro que la de limón maduro.

En 1989 Vandercook y en el 2000, Infoagro reportan que la concentración de diosmina en cáscara de la variedad de limón Eureka es de 310ppm. Los valores encontrados en las muestras analizadas de los lotes variedad de limón persa o sin semilla y la variedad de limón mexicano o con semilla de Michoacán en su estado inmaduro fueron mayores a lo reportado y para el lote de Colima fue menor la concentración a lo de la bibliografía.

Un estudio reciente realizado por Del Río et al, 2003 reporta para la variedad de limón Fino (49) una concentración de hesperidina entre 5300 y 7900ppm. Los valores que se obtuvieron en el lote variedad de limón persa o sin semilla coinciden con lo reportado, mientras que para los lotes de la variedad mexicano o con semilla los resultados fueron menores. Para la diosmina se menciona una concentración de 4600 a 7000ppm, los resultados de los tres lotes fueron muy inferiores a lo reportado. La eriocitrina fue un nuevo registro con una concentración inferior respecto a la cantidad de hesperidina y diosmina, esto se debe a que los dos flavonoides principales en el limón son los precursores de este nuevo compuesto.

Los valores reportados difieren entre los obtenidos, ya que como se ha mencionado, algunos factores afectan la cantidad de los flavonoides en el fruto. Depende de la variedad de limón, estado de madurez así como, lugar de procedencia, el clima, almacenamiento y formas de cultivo.

Para comprobar la influencia del estado de madurez en las muestras de cáscara de limón analizadas, se llevó a cabo el análisis de varianza donde se obtuvo una F calculada mayor que la F reportada en tablas estadísticas, esto indica que si existe influencia en el contenido de flavonoides glucosilados de acuerdo al estado de madurez del fruto. (Ver ANEXO II)

Reyo y Saval, 1990 y Tomas – Barberan, 2000 reportan que los flavonoides son compuestos que caracterizan a los frutos cítricos y sus productos derivados. Se localizan tanto en el jugo como en los tejidos sólidos (cáscara, albedo, segmentos y membranas).

Se distribuyen de manera no uniforme, pero es común que haya concentraciones altas en los tejidos sólidos que en el jugo. La diosmina y hesperidina presentan una distribución heterogénea en tres tejidos del fruto (flavedo, albedo y jugo). Cuando los flavonoides están presentes en el cítrico éstos se encuentran en mayor concentración en el flavedo y albedo que en el jugo. La alta proporción observada en el flavedo y albedo es de 5800ppm y en el jugo una concentración de 430ppm del limón (cv. Laphitos). Esta distribución se da por la composición de acuerdo a su polaridad existente en el albedo y flavedo por lo cual, las altas proporciones de diosmina y hesperidina se localizan en esta parte del fruto. Esto se observó en el análisis realizado, ya que el contenido de flavonoides glucosilados fue mayor en la cáscara que en el jugo para todos los lotes analizados.

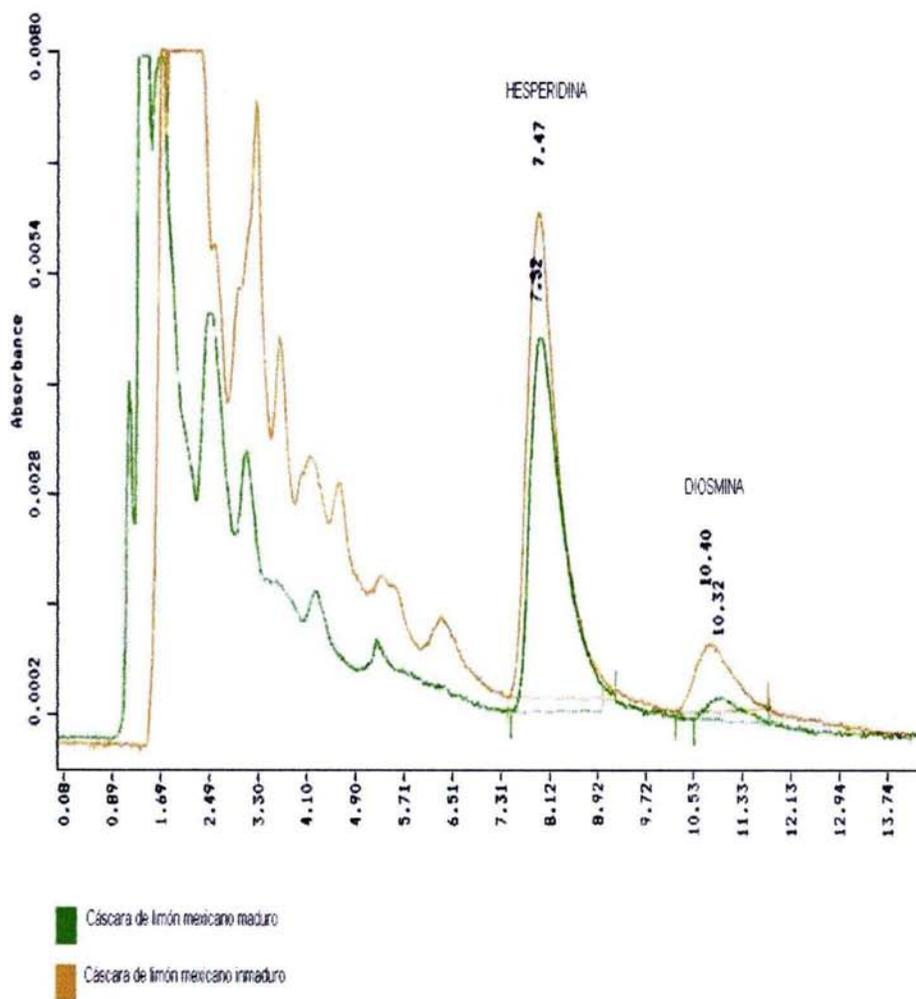
Los Cromatogramas 6 y 7 presentaron cuatro registros, los cuales corresponden al igual que en el jugo a la eriocitrina, hesperidina, rutenina y diosmina de acuerdo a lo reportado por Vandercook y Tisserat, 1989. Estos registros solo se presentaron en el estado maduro ya que el fruto sufre reacciones de biosíntesis de flavonoides glucosilados las cuales se pudieron llevar a cabo a partir de la activación de la glucosiltransferasa para producir la eriocitrina en el fruto maduro.

Estudios recientes realizados por Del Río, et al, reporta altas concentraciones de eriocitrina (4600-7000ppm) en la cáscara de limón variedad Fino (clon 49) lo cual concuerda con el registro que se obtuvo en los cromatogramas 6 y 7, aunque en este trabajo no fue cuantificado. (Del Río, et al, 2004)

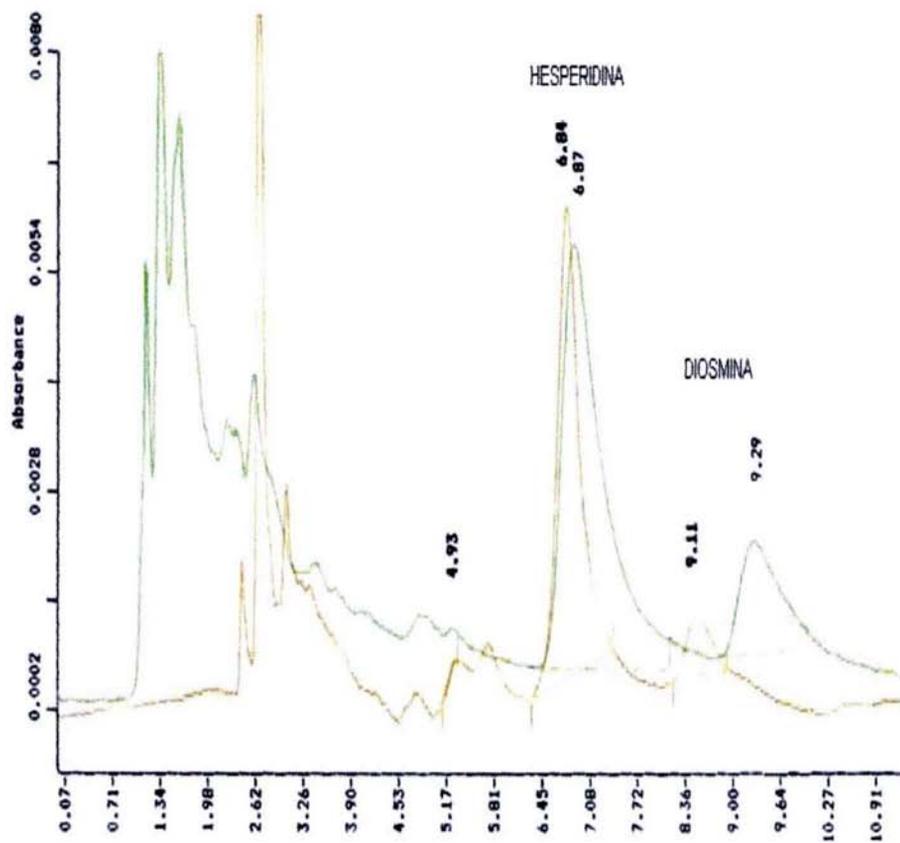
Una característica importante que predominó fue el grosor de la cáscara esto se vio reflejado en estas dos respuestas también, ya que la cáscara de limón persa que es más gruesa que la del limón mexicano presentó mayor concentración.

Los tres lotes estudiados presentaron dos registros, el primero de mayor absorción corresponde a la hesperidina seguida de la diosmina. La cáscara tiene un mayor contenido de estos compuestos que el jugo y se puede notar una mayor respuesta en los cromatogramas.

En el cromatograma 6 los tiempos de retención fueron menores, en este caso se inyectaron la mezcla de estándares para corroborar que se trataba de los compuestos flavonoides.



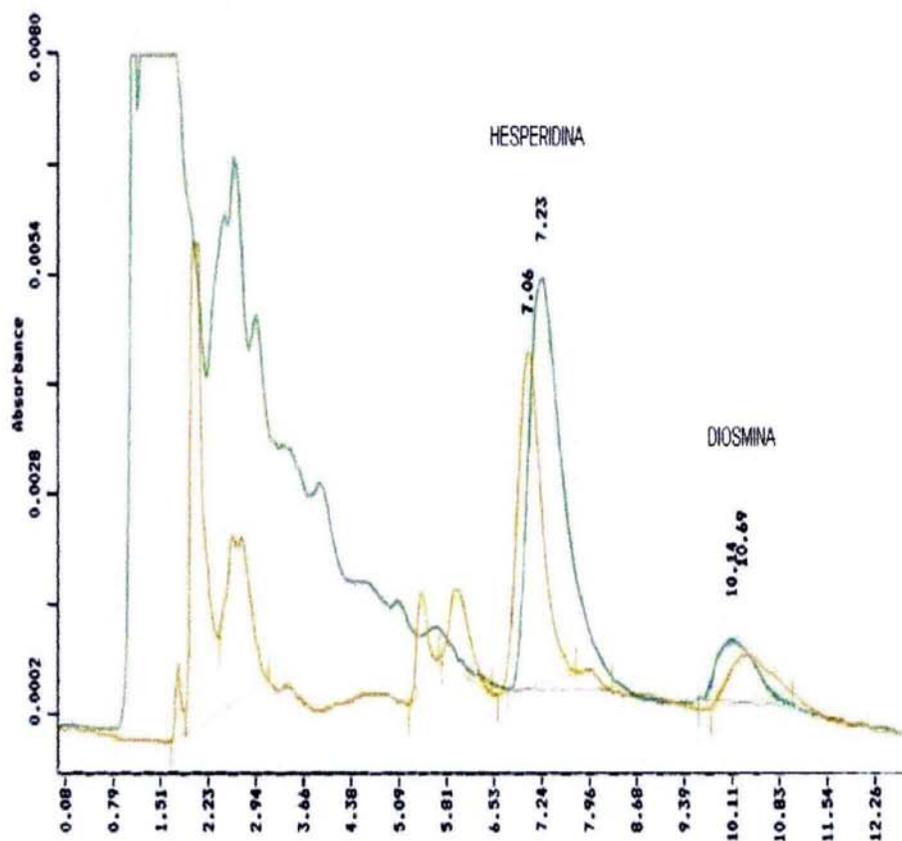
Cromatograma 5. Perfil de flavonoides glucosilados de cáscara de limón de Colima



■ Cáscara de limón mexicano inmaduro

■ Cáscara de limón mexicano maduro

Cromatograma 6. Perfil de flavonoides glucosilados de cáscara de limón de Michoacán



- Cáscara de limón persa inmaduro
- Cáscara de limón persa maduro

Cromatograma 7. Perfil de flavonoides glucosilados de cáscara de limón persa

Los principales estados productores de limón mexicano son Colima y Michoacán los cuales participaron en el 2000, respectivamente con 556.2 miles de Toneladas y 334.2 miles de Toneladas de producción y con 18.8 Toneladas/ Hectáreas y 11.8 Toneladas/ Hectáreas de rendimiento, lo que significa que entre estos dos estados participan con el 56.4% de la producción nacional.

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 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 realizadas por los Estados Unidos. (SAGARPA, 2001)

De la fruta fresca que será procesada se extrae el jugo: el cual es pasteurizado, concentrado, base para helados o deshidratado. (Infoaserca, 2000)

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

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 obtienen 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)

Como se puede observar la producción del limón es muy alta en el país, pero muy poco aprovechada, ya que sólo es comercializado el fruto con ciertas características las cuales están estipuladas en la NORMA NMX-FF-087-SCFI-2001 y los frutos que no cumplen con la norma son desechados ó para uso industrial.

Por tal motivo en la actualidad se están desarrollando investigaciones enfocadas a la evaluación de los productos agrícolas, así como la búsqueda de alternativas para su aprovechamiento, en este proyecto se enfocó principalmente a la cáscara, la cual es rica en flavonoides glucosilados, los cuales son considerados componentes biológicamente activos y que juegan un papel importante como antiinflamatorios, anticancerígenos y

antioxidantes, por mencionar algunas funciones y que se caracterizan por la gran dificultad de ser obtenidos por vía sintética.

Los resultados del estudio dieron como resultado concentraciones considerables de flavonoides en la cáscara de limón mexicano o con semilla (*Citrus aurantifolia Swingle*), de hesperidina se encontró hasta 3850 mg/Kg en cáscara seca y de diosmina 366 mg/Kg e cáscara seca.

Basado en los resultados descritos y tomando en consideración el peso de cáscara fresca que se obtiene anualmente el cual es de 12900 Ton (SAGARPA, 2001) esto es un potencial para obtener 49.665 Ton de hesperidina y 4.721 Ton de diosmina anualmente.

Con los datos anteriores se observa el gran potencial que presenta la cáscara de limón como ingrediente funcional y que el destino de esta parte del fruto puede ser para la realización de nuevos productos en la industria de alimentos.

Actualmente la hesperidina y diosmina son ampliamente utilizadas en la industria farmacéutica, una prueba de esto es el medicamento Daflon (Laboratorios Servier; Suiza) – 750mg el cual contiene 300mg de hesperidina y 300mg de diosmina.

### 3.3 BARRIDO ESPECTROFOTOMÉTRICO EN JUGO DE LIMÓN

Con los barridos espectrofotométricos de cada una de las muestras de jugo de limón en los dos estados de madurez en estudio, se permite obtener una huella digital. Los lotes analizados fueron el de la variedad de limón mexicano o con semilla de Colima y la variedad de limón persa o sin semilla y los resultados se muestran en la tabla 7.

FLAVONOIDES GLUCOSILADOS	Absorción de flavonas		Absorción de polifenoles y flavonas	
	$\lambda_1$	Abs <sub>1</sub>	$\lambda_2$	Abs <sub>2</sub>
Jugo de limón mexicano o con semilla inmaduro	268.0	0.768	315.5	0.663
Jugo de limón mexicano o con semilla maduro	268.0	0.555	314.5	0.450
Jugo de limón persa o sin semilla inmaduro	270.5	0.657	317.0	0.798
Jugo de limón persa o sin semilla maduro	266.5	0.381	315.0	0.316
Promedio	268.3		315.5	
%CV	0.618		0.342	

Tabla 7. Resultados de los promedios en  $\lambda$  absorbencia y coeficiente de variación para los barridos espectrofotométricos del jugo de limón en sus dos variedades y estados de madurez.

Para facilitar el análisis de cada uno de los componentes químicos que se pueden observar en la realización de los barridos espectrofotométricos, se dividirá la información de acuerdo a los máximos de absorbencias a manera de tener un mejor punto de comparación.

En la gráfica 4 se presenta a manera de resumen los cuatro barridos que corresponden a cada una de las muestras.

El primer máximo de absorbencia a los 233nm corresponde a la Vitamina C (Ácido ascórbico). Esta Vitamina disminuye con la maduración del fruto y en el mismo proceso de extracción del jugo y que esta Vitamina se oxida rápidamente a temperatura ambiente.

Al analizar el barrido espectrofotométrico se observa que el jugo de limón mexicano inmaduro es el que presenta una mayor cantidad de Vitamina C, el siguiente valor corresponde a su estado maduro, la variedad de limón persa inmaduro se encuentra en tercer lugar y por último el limón persa maduro. Las variaciones en el contenido de Vitamina C se ve afectada durante la maduración ya que existe una síntesis activa de ácido ascórbico a partir de glucosa.

El siguiente máximo de absorbencia corresponde a los 280nm en donde absorbe la mayor cantidad de flavonas.

Este tipo de compuestos disminuyen durante la maduración del fruto. Al realizar la extracción del jugo puede aumentar la proporción de los compuestos ya que al ejercer presión durante este proceso cierta cantidad del albedo pueden pasar al jugo por que esta parte del fruto tiene gran cantidad de flavonoides. Los resultados en el barrido espectrofotométrico de la variedad de limón mexicano inmaduro presentó una mayor absorción de estas flavonas, el siguiente corresponde a la variedad de limón persa inmaduro, le sigue la variedad de limón agrío o mexicano maduro de Colima y por último la variedad de limón persa maduro, de alguna forma esta respuesta concuerda con los análisis cromatográficos con la concentración alta de flavonoides glucosilados en el estado inmaduro de las dos variedades.

El máximo de absorbencia que se presenta en el barrido espectrofotométrico a 327nm es el que corresponde a los polifenoles y flavonas. Se sabe que la proporción de este tipo de compuestos disminuye conforme se da la etapa de envejecimiento del fruto. (Marín et al, 2002)

Como se observa en la gráfica, el limón mexicano inmaduro presenta la mayor cantidad de polifenoles y flavonas, si se observa el análisis esto corresponde a lo

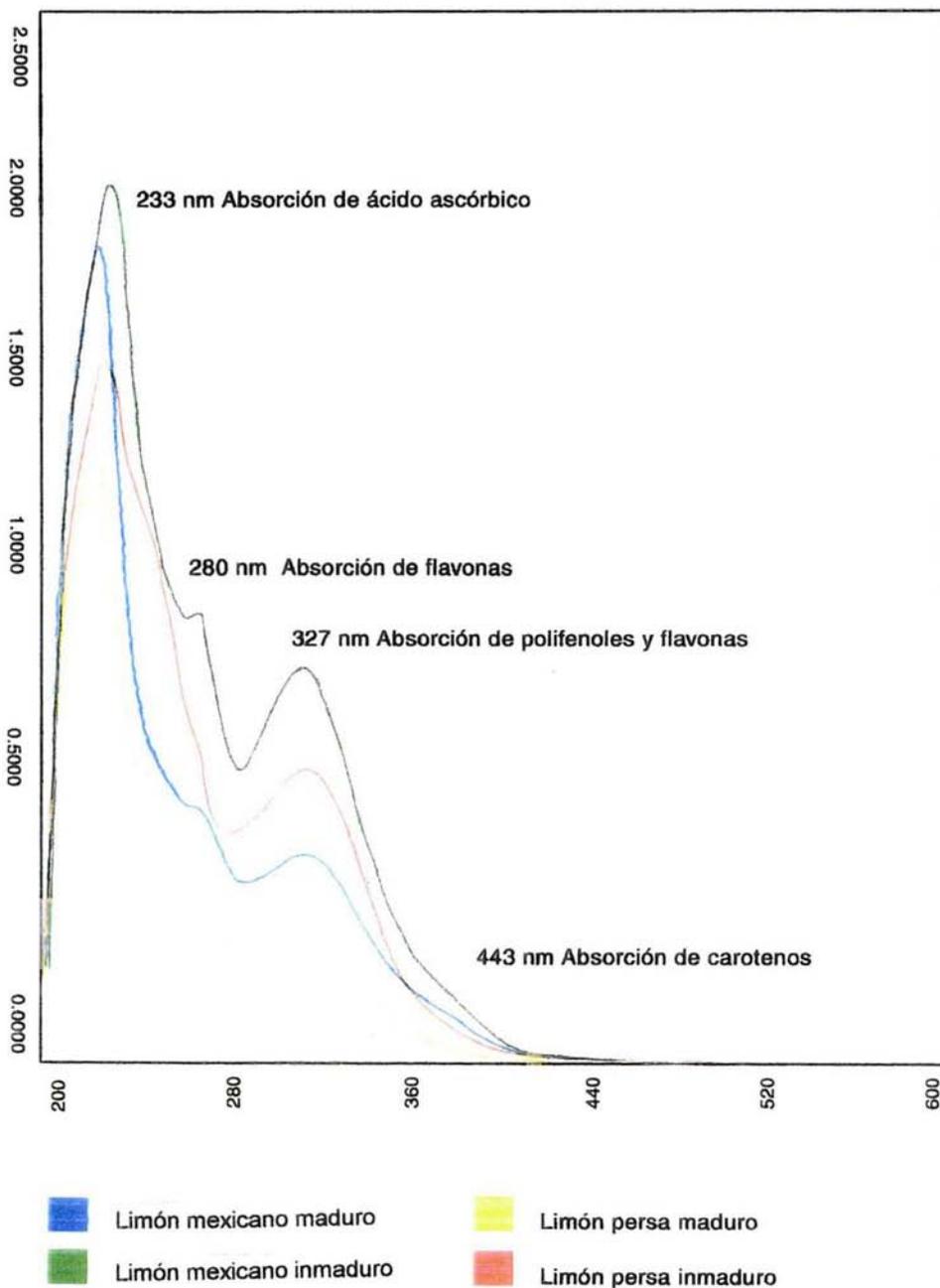
encontrado en el análisis cromatográfico de estos compuestos, por lo tanto la respuesta de esta técnica se ve justificada. El segundo máximo de absorbencia corresponde a la variedad de limón persa inmaduro. Los dos últimos máximos de absorbencias corresponden al estado maduro del limón, primero es la variedad mexicano y el siguiente a la variedad persa. Con el análisis por HPLC la respuesta de esta técnica se ven reflejados con los resultados obtenidos.

El último registro obtenido en el barrido espectrofotométrico corresponde a los carotenos a 443nm. Por lo general, el paso de verde a amarillo en los frutos agrios, corresponden al desenmascaramiento de los pigmentos carotenoides debido a la destrucción de la clorofila en la fase de envejecimiento del fruto. (Cheffer, 1976)

El pico que tiene el máximo de absorbencia corresponde a la variedad limón mexicano maduro, el siguiente máximo es el estado inmaduro por último el limón persa no presento señal entre sus dos estados de madurez.

Al realizar el análisis espectrofotométrico al jugo de limón de las dos variedades nacionales en cada estado de madurez, se pudo obtener de manera cualitativa un perfil característico de los compuestos de cada muestra. Como se puede observar en la gráfica

4.



Gráfica 4. Barridos espectrofotométricos del jugo de limón de la variedad mexicano o con semilla de Colima y de la variedad de limón persa o sin semilla.

## CONCLUSIONES

- En la determinación de la composición de la fase móvil la acidificación de la fase móvil y control de pH son pasos fundamentales para optimizar las condiciones de análisis cromatográfico de flavonoides glucosilados ya que influyen disminuyendo el tiempo de corrida y mejorando la resolución.
- Los flavonoides glucosilados encontrados en la cáscara y jugo de limón fueron la hesperidina y diosmina. La hesperidina fue la que presentó mayor concentración.
- Se estableció que el estado de madurez influye en el contenido de los flavonoides glucosilados en el limón. El contenido más alto se dio en el estado inmaduro que el maduro, por lo tanto estos compuestos podrían utilizarse como parámetro de madurez.
- En los barridos espectrofotométricos, se confirmó un perfil característico del jugo de limón. Este perfil varía dependiendo del estado de madurez y variedad de limón lo cual permite utilizarlo como un método cualitativo de manera rápida para evaluar el cítrico.
- La concentración más alta de flavonoides glucosilados se presentó en la cáscara de la variedad de limón persa o sin semilla, lo que indica que la utilización de esta variedad no sólo puede ser enfocada a la exportación, sino también como fuente rica de estos compuestos biológicamente activos y que pueden ser aplicados a los alimentos funcionales.

- La variedad de limón mexicano o con semilla no sólo puede ser utilizada para obtener los subproductos aceite esencial y pectina, sino también como fuente importante de hesperidina y diosmina , la cual tiene una concentración de 3850 mg/Kg cáscara seca y 366 mg/Kg cáscara seca respectivamente.
- La cáscara de limón representa un gran potencial como ingrediente funcional y esta parte del fruto puede ser destinado para la realización de nuevos productos en la industria de alimentos. Ya que anualmente se puede obtener 49.665 Ton de hesperidina y de diosmina 4.721 Ton de las 12900 Ton de cáscara fresca que se obtiene al año en México.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Agrocadenas, (2002). "Producción mundial de cítricos".  
[www.agrocadenas.gov.co/citricos/](http://www.agrocadenas.gov.co/citricos/)
2. Arana R.A., (2002). "Estudio cromatográfico de compuestos flavonoides para evaluar autenticidad en jugo de naranja y toronja", UNAM, FQ, Tesis de Licenciatura
3. Badui D.S., (1996). "Química de alimentos", Ed. Alhambra, México, 282 y 283
4. Benavente-García O., Castillo J. and Del Río J.A., Conesa J.A., (1993). "Changes in Neodiosmin levels during the development of *C. aurantium* leaves and fruits. Postulation of a Neodiosmin biosynthetic pathway", *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1916-1919
5. Berhow M.A., (1998). "Flavonoid accumulation in tissue and cell culture, *Advances in Experimental Medicine and Biology, Flavonoids in the living system*", Plenum Press, New York USA, 439
6. Biblio, (2000). *Compuestos aromáticos*  
[www.biblio.edu](http://www.biblio.edu)
7. Bloor S.J., (2001). "Overview of methods for analysis and identification of flavonoids, en *Methods in enzymology: Flavonoids and other polyphenols*, Ed. Packer L. Academic Press, 335
8. Braverman J.B.S., (1997). "Citrus products chemical composition and chemical Technology", Ed. Interscience Publishers LTD., USA, 29-166
9. Careaga A. y Gerez V., (1989). "Guía turística, histórica y geográfica de México", Editorial Promexa, México, 117,118 y 150

10. Castillo J., Benavente O., and Del Río J.A., (1993). "Hesperidin 7-O-Glucoside and Prunin in citrus species (*C. aurantium* and *C. paradisi*). A study of their quantitative distribution in inmadure fruits and as immediate precursors of Neohesperidin and Naringin in *C. aurantium*", *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1920-1924
11. Cheffer J.C., (1976). *Introducción a la Bioquímica y tecnología de los Alimentos*, Ed. Acribia, Zaragoza, España, 135-146
12. Del Río J.A., Fuster M.D., Gómez P., Porras I., García-Lidón A. and Ortuño A., (2004). "*Citrus limon*: a source of flavonoids of pharmaceutical interest", *Food Chemistry*, 84, 457-461.
13. Dillard C.J. and German B., (2000). "Phytochemicals: nutraceuticals and human health", *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1744-1756
14. El-Shafae A.M. and El-Domiaty M.M., (2001). "Improved LC methods for the determination of diosmina and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations", *J. Pharm. and Biomed. Analysis*, 26, 539-545
15. Fennema O.R., (1995). "*Fruit science and technology*", Ed. Acribia, España, 39-49, 669
16. García A.P., (1998). "Liquid Chromatographic methodology for the characterization of orange juice", *J. AOAC*, 71 (3), 469
17. Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L. J. D. and Singla, A. K., (2001). "Chemistry and Pharmacology of the citrus Bioflavonoid Hesperidin", *Phytotherapy Research*, 15, 655 - 669
18. Harborne J.B., (1986). "*The flavonoids*", Ed. Academic Press, New York, 46-48
19. Hirano S., (1970). "Relations of fruit size of satsuma mandarin to the sugar and acid contents", *J. Japanese Society for Horticultural Sci.*, 48 (2), 162-168

20. Infoagro , (2003). "El cultivo de limón"  
[www.infoagro.com](http://www.infoagro.com)
21. Infoaserca, (2000). "Claridades agropecuarias"  
[www.infoaserca.gob.mx/claridades/](http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/)
22. Larrauri J.A., Rupérez P., Bravo L. and Saura-Calixto F., (1996). "High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity", *Food Research International*, 29 (8), 757- 762
23. Lewinsohn E., Britsch L., Mazur Y. and Gressel J., (1989). "Flavanone glycoside Biosynthesis in citrus", *Plant Physiology*, 1323-1328
24. Manthey J.A. and Grohmann K., (1996). "Concentrations of Hesperidin and other orange peel flavonoids in citrus processing Byproducts", *J. Agric. Food Chem.*, 44,811-814
25. Marín F.R. and Del Río J.A., (2001). "Selection of Hybrids and edible citrus species with a high content in the diosmin functional compound. Modulating effect of plant growth regulators on contents", *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3356- 3362
26. Marín F.R., Martínez M., Uribesalvo T., Castillo S. and Frutos M.J., (2002). "Changes in nutraceutical composition of lemon juices according to different industrial extraction system", *Food Chem.*, 78, 319-324
27. Markham K.R., (1989). "Techniques of flavonoid identification. Biological techniques series", Ed. Academic Press, Londres, 438- 442
28. Merken H.M. and Beecher G.R., (2000). " Measurement of Food flavonoids by High Performance Liquid Chromatography: a Review", *J. Agric. Food Chem.*, 48 (3), 577-599
29. Petrus, D.R. and Dougherty, M.H., (1973). " Visible and ultraviolet analysis of orange juice", *J. of Food Science*, 38, 659

30. Reyo A., y Savaí S., (1990). "Los flavonoides en la tecnología de cítricos", *Tecnología Alimentaria*, 25 (4), 5-13
31. SAGARPA, (2001). "Análisis del limón".  
[www.infoaserca.gob.mx/estudios/analisis-limon.pdf](http://www.infoaserca.gob.mx/estudios/analisis-limon.pdf)
32. Tomás-Barberán F.A., (2000). "Review: flavanones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence and dietary burden", *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1073-1080
33. Vandercook C.E. and Tisserat B., (1989). "Flavonoid changes in developing lemons grown in vivo and in vitro", *Phytochemistry*, 28 (3), 799-803
34. Vasconcelos J.A., (1998). *The world of food science*.  
[www.madrimasd.org](http://www.madrimasd.org)

**ANEXO I**  
**NORMA MEXICANA PARA LIMÓN FRESCO**

**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.

### **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 <sup>a</sup>		
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

<sup>a</sup> 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 cm<sup>2</sup>.

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 cm<sup>2</sup>, 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, empacador 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.

## **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 DE VARIANZA

Descripción  
**Jugo de limón mexicano inmaduro**  
 HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1	3	185.9700	4.8935	2.8253	173.8138	198.1262	181.70	191.31
2	3	214.2267	3.8414	2.2179	204.6840	223.7693	210.52	218.19
3	3	186.6133	12.8897	7.4419	154.5936	218.6331	174.66	200.27
4	3	198.7767	13.9093	8.0305	164.2241	233.3292	186.19	213.71
5	3	202.1900	1.6933	.9776	197.9837	206.3963	200.27	203.47
Total	15	197.5553	13.2744	3.4274	190.2042	204.9064	174.66	218.19

Análisis de Homogeneidad y Variación  
 HESPERIDINA

Nivel estadístico	g.	l.	g.	l.	2	Sig.
2.431	4	10	116			

ANOVA  
 HESPERIDINA

	Suma de Cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	1664.557	4	416.139	5.186	.016
Dentro de los grupos	802.365	10	80.236		
Total	2466.922	14			

Prueba Duncan  
 HESPERIDINA

N	Contenido para $\alpha = .05$
LOTE	1 2
1	3 185.9700
3	3 186.6133
4	3 198.7767 198.7767
5	3 202.1900 202.1900
2	3 214.2267
Sig.	.065 .071

Descripción  
DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1	3	21.6233	.2714	.1567	20.9493	22.2974	21.31	21.78
2	3	21.2367	.9784	.5649	18.8062	23.6671	20.14	22.02
3	3	20.5333	.4884	.2820	19.3201	21.7466	20.14	21.08
4	3	22.8800	2.0992	1.2120	17.6653	28.0947	21.55	25.30
5	3	20.9267	.4884	.2820	19.7134	22.1399	20.38	21.32
Total	15	21.4400	1.2401	.3202	20.7532	22.1268	20.14	25.30

Análisis de Homogeneidad y Variación  
DIOSMINA

Nivel estadístico	g.	l.	g.	l.	2	Sig.
6.506	4	10	10	10	10	.008

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F calculada	Sig.
Entre grupos	9.702	4	2.426	2.050	.163
Dentro de los grupos	11.829	10	1.183		
Total	21.532	14			

Prueba Duncan  
DIOSMINA

Contenido para $\alpha = .05$		
Lote	1	2
3	20.5333	
5	20.9267	20.9267
2	21.2367	21.2367
1	21.6233	21.6233
4		22.8800
Sig.	.279	.067

Descripción  
Jugo de limón mexicano maduro  
HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1	3	68.1767	2.8859	1.6662	61.0076	75.3457	65.19	70.95
2	3	62.3400	2.4775	1.4304	56.1855	68.4945	60.70	65.19
3	3	71.1633	2.4230	1.3989	65.1443	77.1824	68.39	72.87
4	3	75.2167	3.5248	2.0351	66.4605	83.9729	72.87	79.27
5	3	77.9900	3.2000	1.8475	70.0408	85.9392	74.79	81.19
Total	15	70.9773	6.1812	1.5960	67.5543	74.4004	60.70	81.19

Análisis de homogeneidad y Variación

HESPERIDINA

Nivel estadístico	g.1.	g.2	Sig.
.205	4	10	.930

ANOVA

HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	448.894	4	112.223	13.049	.001
Dentro de los grupos	86.004	10	8.600		
Total	534.898	14			

Prueba Duncan

HESPERIDINA

		Contenido para $\alpha = .05$			
Lote	N	1	2	3	4
2	3	62.3400			
1	3		68.1767		
3	3		71.1633	71.1633	
4	3			75.2167	75.2167
5	3				77.9900
Sig.		1.000	.241	.121	.274

Descripción

DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1	3	17.5633	.7000	.4042	15.8244	19.3023	16.86	18.26
2	3	17.8667	.4788	.2764	16.6773	19.0560	17.33	18.25
3	3	16.0000	.3568	.2060	15.1137	16.8863	15.69	16.39
4	3	17.2500	.7544	.4355	15.3760	19.1240	16.39	17.80
5	3	16.3933	1.3111	.7570	13.1363	19.6503	14.98	17.57
Total	15	17.0147	.9915	.2560	16.4656	17.5637	14.98	18.26

Análisis de Homogeneidad y Variación

DIOSMINA

Nivel estadístico	g.1.	g.2	Sig.
1.516	4	10	.270

ANOVA

DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Suma de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	7.494	4	1.873	2.988	.073
Dentro de los grupos	6.269	10	.627		
Total	13.763	14			

Prueba Duncan  
DIOSMINA

Contenido para $\alpha = .05$		
Lote	1	2
3	16.0000	
5	16.3933	16.3933
4	17.2500	17.2500
1		17.5633
2		17.8667
Sig.	.094	.059

Descripción

- ANÁLISIS ENTRE LOS DOS ESTADOS DE MADUREZ DEL JUGO DE LIMÓN MEXICANO

HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
inmaduro	15	197.5553	13.2744	3.4274	190.2042	204.9064	174.66	218.19
maduro	15	70.9773	6.1812	1.5960	67.5543	74.4004	60.70	81.19
Total	30	134.2663	65.1700	11.8984	109.9315	158.6012	60.70	218.19

Análisis de Homogeneidad y Variación

HESPERIDINA

Nivel estadístico	g. 1	g. 2	Sig.
9.692	1	28	.004

ANOVA

HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	120164.926	1	120164.926	1120.859	.000
Dentro de los grupos	3001.820	28	107.208		
Total	123166.746	29			

$$F_{\text{tablas}} = 4.20$$

Conclusión:  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$  por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que el estado de madurez influye en el contenido de Hesperidina del jugo de limón mexicano

Descripción

DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
inmaduro	15	21.4400	1.2401	.3202	20.7532	22.1268	20.14	25.30
maduro	15	17.0147	.9915	.2560	16.4656	17.5637	14.98	18.26
Total	30	19.2273	2.5063	.4576	18.2914	20.1632	14.98	25.30

Análisis de Homogeneidad y Variación

DIOSMINA

Nivel estadístico	g.	l.	1	g.	l.	2	Sig.
.070	1	28	1	28	1	28	.793

ANOVA

DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Medias de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	146.877	1	146.877	116.520	.000
Dentro de los grupos	35.295	28	1.261		
Total	182.172	29			

$$F_{\text{tablas}} = 4.20$$

Conclusión:  $F_{\text{calculada}} > F_{\text{tablas}}$  por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que el estado de madurez influye en el contenido de Diosmina del jugo del limón mexicano.

Descripción

Cáscara de limón mexicano inmaduro

HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	2	3.7800	.1980	.1400	2.0011	5.5589	3.64	3.92
2	2	3.8300	4.243E-02	3.000E-02	3.4488	4.2112	3.80	3.86
3	2	3.3900	.2828	.2000	.8488	5.9312	3.19	3.59
4	2	4.0750	9.192E-02	6.500E-02	3.2491	4.9009	4.01	4.14
5	2	3.6850	.1626	.1150	2.2238	5.1462	3.57	3.80
Total	10	3.7520	.2686	8.494E-02	3.5598	3.9442	3.19	4.14

ANOVA

HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	.493	4	.123	3.957	.082
Dentro de los grupos	.156	5	3.118E-02		
Total	.649	9			

Prueba Duncan  
HESPERIDINA

		Contenido para $\alpha = .05$	
Lote	N	1	2
3	2	3.3900	
5	2	3.6850	3.6850
1	2	3.7800	3.7800
2	2	3.8300	3.8300
4	2		4.0750
Sig.		.062	.087

Descripción  
DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	2	.2470	.0000	.0000	.2470	.2470	.25	.25
2	2	.2470	1.414E-02	1.000E-02	.1199	.3741	.24	.26
3	2	.2500	.0000	.0000	.2500	.2500	.25	.25
4	2	.2485	2.121E-03	1.500E-03	.2294	.2676	.25	.25
5	2	.2370	1.414E-02	1.000E-02	.1099	.3641	.23	.25
Total	10	.2459	8.266E-03	2.614E-03	.2400	.2518	.23	.26

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	gl	Media de cuadrados	F calculada	Sig.
Entre grupos	2.104E-04	4	5.260E-05	.650	.651
Dentro de los grupos	4.045E-04	5	8.090E-05		
Total	6.149E-04	9			

Prueba Duncan  
DIOSMINA

		Contenido para $\alpha = .05$	
Lote	N	1	
5	2	.2370	
1	2	.2470	
2	2	.2470	
4	2	.2485	
3	2	.2500	
Sig.		.220	

Descripción  
**Cáscara de limón mexicano maduro**  
**HESPERIDINA**

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	2	2.6950	.2051	.1450	.8526	4.5374	2.55	2.84
2	2	3.0400	.1697	.1200	1.5153	4.5647	2.92	3.16
3	2	2.8950	.1202	8.500E-02	1.8150	3.9750	2.81	2.98
4	2	2.8000	.1131	8.000E-02	1.7835	3.8165	2.72	2.88
5	2	2.7900	7.071E-02	5.000E-02	2.1547	3.4253	2.74	2.84
Total	10	2.8440	.1630	5.156E-02	2.7274	2.9606	2.55	3.16

ANOVA  
**HESPERIDINA**

	Suma de cuadrados	gl.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	.136	4	3.404E-02	1.651	.295
Dentro de los grupos	.103	5	2.062E-02		
Total	.239	9			

Prueba Duncan  
**HESPERIDINA**

	N	Contenido para $\alpha = .05$
Lote		1
1	2	2.6950
5	2	2.7900
4	2	2.8000
3	2	2.8950
2	2	3.0400
Sig.		.070

Descripción  
**DIOSMINA**

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	2	7.350E-02	4.950E-03	3.500E-03	2.903E-02	.1180	.07	.08
2	2	7.500E-02	2.828E-03	2.000E-03	4.959E-02	.1004	.07	.08
3	2	7.350E-02	9.192E-03	6.500E-03	-9.0903E-03	.1561	.07	.08
4	2	6.800E-02	7.071E-03	5.000E-03	4.469E-03	.1315	.06	.07
5	2	7.000E-02	9.899E-03	7.000E-03	-1.8943E-02	.1589	.06	.08
Total	10	7.200E-02	6.074E-03	1.921E-03	6.766E-02	7.634E-02	.06	.08

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	6.700E-05	4	1.675E-05	.316	.856
Dentro de los grupos	2.650E-04	5	5.300E-05		
Total	3.320E-04	9			

Prueba Duncan  
DIOSMINA

N		Contenido para $\alpha = .05$
Lote		1
4	2	6.800E-02
5	2	7.000E-02
1	2	7.350E-02
3	2	7.350E-02
2	2	7.500E-02
Sig.		.390

Descripción

- ANÁLISIS ENTRE LOS DOS ESTADOS DE MADUREZ DE LA CÁSCARA DE LIMÓN MEXICANO

HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%	Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior	
inmaduro	103.7520		.2686	8.494E-02	3.5598	3.9442	3.19 4.14
maduro	102.8440		.1630	5.156E-02	2.7274	2.9606	2.55 3.16
Total	203.2980		.5135	.1148	3.0577	3.5383	2.55 4.14

Análisis de homogeneidad y variación

HESPERIDINA

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
2.139	1	18	.161

ANOVA  
HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	4.122	1	4.122	83.504	.000
Dentro de los grupos	.889	18	4.937E-02		
Total	5.011	19			

$$F_{tablas} = 4.41$$

Conclusión:  $F_{calculada} > F_{tablas}$ , por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que el estado de madurez influye en el contenido de Hesperidina de la cáscara de limón mexicano.

Descripción  
DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
inmaduro	10	.2459	8.266E-03	2.614E-03	.2400	.2518	.23	.26
maduro	10	7.200E-02	6.074E-03	1.921E-03	6.766E-02	7.634E-02	.06	.08
Total	20	.1589	8.949E-02	2.001E-02	.1171	.2008	.06	.26

Análisis de homogeneidad y variación  
DIOSMINA

Nivel estadístico	g.l.	g.l. 2	Sig.
.073	1	18	.790

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F calculada	Sig.
Entre grupos	.151	1	.151	2874.336	.000
Dentro de los grupos	9.469E-04	18	5.261E-05		
Total	.152	19			

F<sub>tablas</sub> = 4.41

Conclusión:  $F_{calculada} > F_{tablas}$  por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que el estado de madurez influye en el contenido de Diosmina de la cáscara de limón mexicano.

JUGO LIMON PERSA

Descripción  
Jugo de limón persa inmaduro  
HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1	3	123.2300	2.5919	1.4964	116.7914	129.6686	120.88	126.01
2	3	122.1633	5.7650	3.3284	107.8423	136.4844	116.40	127.93
3	3	135.3967	1.4780	.8533	131.7251	139.0683	133.69	136.25
4	3	132.6233	5.3674	3.0988	119.2901	145.9566	129.21	138.81
5	3	126.0067	3.8987	2.2509	116.3217	135.6916	121.52	128.57
Total	15	127.8840	6.4516	1.6658	124.3112	131.4568	116.40	138.81

Análisis de Homogeneidad y variación

HESPERIDINA

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
1.367	4	10	.313

ANOVA

HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	410.435	4	102.609	5.955	.010
Dentro de los grupos	172.292	10	17.229		
Total	582.727	14			

Prueba Duncan

HESPERIDINA

		Contenido para $\alpha = .05$		
Lote	N	1	2	3
2	3	122.1633		
1	3	123.2300		
5	3	126.0067	126.0067	
4	3		132.6233	132.6233
3	3			135.3967
Sig.		.304	.079	.432

Descripción

DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	18.2633	.4041	.2333	17.2594	19.2673	18.03	18.73
2	3	16.8567	.6199	.3579	15.3168	18.3965	16.39	17.56
3	3	19.2033	1.3057	.7539	15.9597	22.4469	18.03	20.61
4	3	17.9533	.8879	.5127	15.7476	20.1591	17.33	18.97
5	3	16.8600	1.8309	1.0571	12.3117	21.4083	15.69	18.97
Total	15	17.8273	1.3288	.3431	17.0915	18.5632	15.69	20.61

Análisis de Homogeneidad y Variación

DIOSMINA

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
2.957	4	10	.075

ANOVA

DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	11.932	4	2.983	2.333	.126
Dentro de los grupos	12.786	10	1.279		
Total	24.718	14			

Prueba Duncan  
DIOSMINA

N			Contenido para $\alpha = .05$	
Lote		1	2	
2	3	16.8567		
5	3	16.8600		
4	3	17.9533	17.9533	
1	3	18.2633	18.2633	
3	3		19.2033	
Sig.		.186		.225

Descripción  
Jugo de limón persa maduro  
HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	46.4067	2.9560	1.7067	39.0635	53.7499	44.70	49.82
2	3	48.1133	4.4952	2.5953	36.9466	59.2801	43.42	52.38
3	3	49.1800	4.4800	2.5865	38.0511	60.3089	44.70	53.66
4	3	51.7400	2.7897	1.6106	44.8100	58.6700	48.54	53.66
5	3	48.3267	3.9105	2.2577	38.6125	58.0408	44.06	51.74
Total	15	48.7533	3.6818	.9506	46.7144	50.7923	43.42	53.66

Análisis de Homogeneidad y Variación  
HESPERIDINA

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
.170	4	10	.949

ANOVA  
HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	45.602	4	11.401	.791	.557
Dentro de los grupos	144.179	10	14.418		
Total	189.781	14			

Prueba Duncan  
HESPERIDINA

N			Contenido para $\alpha = .05$	
Lote		1		
1	3	46.4067		
2	3	48.1133		
5	3	48.3267		
3	3	49.1800		
4	3	51.7400		
Sig.		.145		

Descripción  
DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	8.8900	.0000	.0000	8.8900	8.8900	8.89	8.89
2	3	8.7367	.5888	.3399	7.2741	10.1992	8.19	9.36
3	3	9.9067	.7125	.4114	8.1368	11.6766	9.13	10.53
4	3	10.6800	.5369	.3100	9.3462	12.0138	10.06	10.99
5	3	11.3133	1.3568	.7833	7.9429	14.6837	10.53	12.88
Total	15	9.9053	1.2220	.3155	9.2286	10.5820	8.19	12.88

Análisis de Homogeneidad y variación  
DIOSMINA

Nivel estadístico	g.	l.	1	g.	l.	2	Sig.
4.879	4	10					.019

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F calculada	Sig.
Entre grupos	14.938	4	3.734	6.259	.009
Dentro de los grupos	5.967	10	.597		
Total	20.905	14			

Prueba Duncan  
DIOSMINA

	N	Contenido para $\alpha = .05$	
Lote		1	2
2	3	8.7367	
1	3	8.8900	
3	3	9.9067	9.9067
4	3		10.6800
5	3		11.3133
Sig.		.107	.059

Descripción

- ANÁLISIS ENTRE LOS DOS ESTADOS DE MADUREZ DEL JUGO DE LIMÓN PERSA

HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
inmaduro	15	127.8840	6.4516	1.6658	124.3112	131.4568	116.40	138.81
maduro	15	48.7533	3.6818	.9506	46.7144	50.7923	43.42	53.66
Total	30	88.3187	40.5713	7.4073	73.1691	103.4683	43.42	138.81

Análisis de Homogeneidad y variación  
HESPERIDINA

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
3.191	1	28	.085

ANOVA  
HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F calculada	Sig.
Entre grupos	46962.468	1	46962.468	1702.181	.000
Dentro de los grupos	772.508	28	27.590		
Total	47734.977	29			

$F_{tablas} = 4.20$

Conclusión:  $F_{calculada} > F_{tablas}$  por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que el estado de madurez influye en el contenido de Hesperidina del jugo de limón persa

Descripción  
DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
inmaduro	15	17.8273	1.3288	.3431	17.0915	18.5632	15.69	20.61
maduro	15	9.9053	1.2220	.3155	9.2286	10.5820	8.19	12.88
Total	30	13.8663	4.2194	.7704	12.2908	15.4419	8.19	20.61

Análisis de Homogeneidad y variación  
DIOSMINA

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
.038	1	28	.848

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F calculada	Sig.
Entre grupos	470.686	1	470.686	288.873	.000
Dentro de los grupos	45.623	28	1.629		
Total	516.308	29			

$F_{tablas} = 4.20$

Conclusión:  $F_{calculada} > F_{tablas}$  por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que el estado de madurez influye en el contenido de Diosmina del jugo de limón persa.

Descripción  
**Cáscara de limón persa inmaduro**  
**HESPERIDINA**

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Minimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1	2	5.0150	.2475	.1750	2.7914	7.2386	4.84	5.19
2	2	4.7250	3.536E-02	2.500E-02	4.4073	5.0427	4.70	4.75
3	2	5.0350	.3182	.2250	2.1761	7.8939	4.81	5.26
4	2	5.3650	.1485	.1050	4.0308	6.6992	5.26	5.47
5	2	5.0750	.1485	.1050	3.7408	6.4092	4.97	5.18
Total	10	5.0430	.2627	8.308E-02	4.8551	5.2309	4.70	5.47

ANOVA  
**HESPERIDINA**

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	.413	4	.103	2.486	.172
Dentro de los grupos	.208	5	4.157E-02		
Total	.621	9			

Prueba Duncan  
**HESPERIDINA**

	Contenido para $\alpha = .05$	
Lote	1	2
2	4.7250	
1	5.0150	5.0150
3	5.0350	5.0350
5	5.0750	5.0750
4		5.3650
Sig.	.159	.159

Descripción  
**DIOSMINA**

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Minimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1	2	.2930	.0000	.0000	.2930	.2930	.29	.29
2	2	.3050	1.131E-02	8.000E-03	.2034	.4066	.30	.31
3	2	.3300	9.899E-03	7.000E-03	.2411	.4189	.32	.34
4	2	.3350	2.828E-03	2.000E-03	.3096	.3604	.33	.34
5	2	.3450	2.828E-03	2.000E-03	.3196	.3704	.34	.35
Total	10	.3216	2.115E-02	6.687E-03	.3065	.3367	.29	.35

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	gl.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	3.782E-03	4	9.456E-04	19.537	.003
Dentro de los grupos	2.420E-04	5	4.840E-05		
Total	4.024E-03	9			

Prueba Duncan  
DIOSMINA

N			Contenido para $\alpha = .05$	
Lote		1	2	
1	2	.2930		
2	2	.3050		
3	2		.3300	
4	2		.3350	
5	2		.3450	
Sig.		.145	.090	

Descripción  
Cáscara de limón persa maduro  
HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior		
1	2	2.3450	.1202	8.500E-02	1.2650	3.4250	2.26	2.43
2	2	2.5450	.2192	.1550	.5755	4.5145	2.39	2.70
3	2	2.8700	2.828E-02	2.000E-02	2.6159	3.1241	2.85	2.89
4	2	2.8650	2.121E-02	1.500E-02	2.6744	3.0556	2.85	2.88
5	2	2.4550	.1485	.1050	1.1208	3.7892	2.35	2.56
Total	10	2.6160	.2467	7.801E-02	2.4395	2.7925	2.26	2.89

ANOVA  
HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	gl.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	.462	4	.115	6.728	.030
Dentro de los grupos	8.580E-02	5	1.716E-02		
Total	.548	9			

Prueba Duncan  
HESPERIDINA

N			Contenido para $\alpha = .05$	
Lote		1	2	
1	2	2.3450		
5	2	2.4550		
2	2	2.5450	2.5450	
4	2		2.8650	
3	2		2.8700	
Sig.		.197	.061	

Descripción  
DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Minimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	2	.2300	1.414E-02	1.000E-02	.1029	.3571	.22	.24
2	2	.2350	2.828E-03	2.000E-03	.2096	.2604	.23	.24
3	2	.2465	9.192E-03	6.500E-03	.1639	.3291	.24	.25
4	2	.2620	7.071E-03	5.000E-03	.1985	.3255	.26	.27
5	2	.2580	7.071E-03	5.000E-03	.1945	.3215	.25	.26
Total	10	.2463	1.470E-02	4.650E-03	.2358	.2568	.22	.27

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	1.554E-03	4	3.884E-04	4.948	.055
Dentro de los grupos	3.925E-04	5	7.850E-05		
Total	1.946E-03	9			

Prueba Duncan  
DIOSMINA

	N	Contenido para $\alpha = .05$		
Lote		1	2	3
1	2	.2300		
2	2	.2350	.2350	
3	2	.2465	.2465	.2465
5	2		.2580	.2580
4	2			.2620
Sig.		.130	.053	.150

Descripción  
• ANÁLISIS ENTRE LOS DOS ESTADOS DE MADUREZ DE LA CÁSCARA DE LIMÓN  
PERSA  
HESPERIDINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%		Minimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
inmaduro	10	5.0430	.2627	8.308E-02	4.8551	5.2309	4.70	5.47
maduro	10	2.6160	.2467	7.801E-02	2.4395	2.7925	2.26	2.89
Total	20	3.8295	1.2695	.2839	3.2354	4.4236	2.26	5.47

Análisis de Homogeneidad y variación  
HESPERIDINA

Nivel estadístico	g.l.	1	g.l.	2	Sig.
.064	1	18	18	18	.803

ANOVA  
HESPERIDINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	29.452	1	29.452	453.548	.000
Dentro de los grupos	1.169	18	6.494E-02		
Total	30.620	19			

F<sub>tablas</sub> = 4.41

Conclusión: F<sub>calculada</sub> > F<sub>tablas</sub>, por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que el estado de madurez influye en el contenido de Hesperidina de la cáscara de limón persa.

Descripción  
DIOSMINA

	N	Media	Desviación estándar	Error	Intervalo de confianza al 95%	Mínimo	Máximo
					Limite inferior	Limite superior	
inmaduro	10	.3216	2.115E-02	6.687E-03	.3065	.3367	.29 .35
maduro	10	.2463	1.470E-02	4.650E-03	.2358	.2568	.22 .27
Total	20	.2840	4.250E-02	9.504E-03	.2641	.3038	.22 .35

Análisis de Homogeneidad y variación  
DIOSMINA

Nivel estadístico	g.l. 1	g.l. 2	Sig.
2.529	1	18	.129

ANOVA  
DIOSMINA

	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F <sub>calculada</sub>	Sig.
Entre grupos	2.835E-02	1	2.835E-02	85.472	.000
Dentro de los grupos	5.971E-03	18	3.317E-04		
Total	3.432E-02	19			

F<sub>tablas</sub> = 4.41

Conclusión: F<sub>calculada</sub> > F<sub>tablas</sub>, por lo tanto existe diferencia significativa, esto quiere decir que los estados de madurez influye en el contenido de Diosmina de la cáscara de limón persa