

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Semilla de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*): Obtención de concentrado de fibra dietética con poder antioxidante.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

MARTHA ELIZET HERRERA HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F

2006



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.

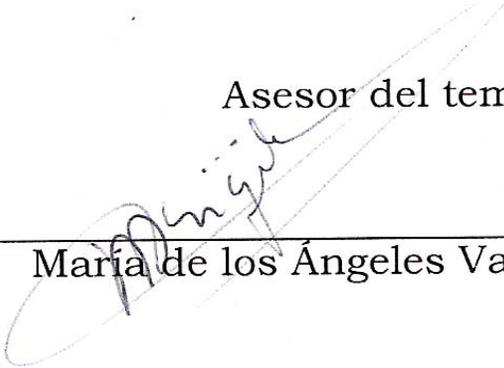
Jurado asignado:

Presidente	Prof.	Francisca Aída Iturbe Chínas
Vocal	Prof.	María de los Ángeles Valdivia López
Secretario	Prof.	Juan Diego Ortiz Palma
1 ^{er} Suplente	Prof.	Bertha Julieta Sandoval Guillén
2 ^{do} Suplente	Prof.	María de Lourdes Osnaya Suarez.

Sitio donde se desarrolló el tema.

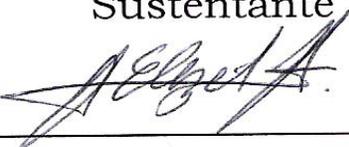
Laboratorio 323 Conjunto "E" Facultad de Química

Asesor del tema.



María de los Ángeles Valdivia López

Sustentante



Martha Elizet Herrera Hernández

Agradecimientos

A la UNAM por brindarme la oportunidad de estudiar en sus aulas y pasar los más hermosos e inolvidables días de mi vida. Por sus grandes profesores e instalaciones *“Como no te voy a querer si mi corazón azul es y mi piel dorada siempre te querré”*.

A todos mis profesores gracias por sus conocimientos compartidos, su sabiduría académica y sus consejos. Me llevo un poco de cada uno y espero usarlo para ser una mejor persona y profesionista.

A mis sinodales por la entrega, el tiempo, y la dedicación para que este proyecto saliera adelante: Francisca Aída Iturbe Chinas, Bertha Julieta Sandoval Guillén Juan Diego Ortiz Palma, y María de Lourdes Osnaya Suarez y en especial a mi asesora María de los Ángeles Valdivia López, por apoyarme y brindarme su confianza en la realización de esta tesis.

A mi querida Facultad de Química por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y de conocer a mis mejores maestros y amigos.

Al laboratorio 322 y 323 del conjunto “E” por todas las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

A todos mis amigos, los cuales fui conociendo a lo largo de mi carrera, gracias por tantas horas compartidas dentro de la facultad: Rosalba, Melibea, Mauricio magos, Vianey, Erika, Miguel A, Brenda, Griseel, Claudia, Nayeli, Carlitos, Ramses, Elizabeth (pecas), Julio, Pollo, Pollito, Roció, Lauris, Jovanny, Juan Manuel, Román, Teresita, Saray, Lidia, Chío, Erika Vanesa, Aurora y Chucho.

A Dios por ser la persona que soy.

Dedicatorias.

A MIS PADRES

Martha Mercedes Hernández Salinas y José Luis Herrera Valdez.

Este logro es por ustedes y para ustedes, gracias por darme la vida y la oportunidad de ser feliz, por enseñarme a luchar y salir adelante, por sus consejos y amor incondicional, por estar siempre a mi lado y hacer de mi una mujer integra. LOS AMO

A MIS HERMANOS

Mary Carmen y Luis Enrique Herrera Hernández.

Por su ejemplo de lucha e integridad, su dedicación para lograr sus metas, por todo el cariño que me tienen y que siempre me han mostrado, por aguantar una que otra vez mi mal genio y por ser unas personas increíbles. LOS QUIERO MUCHO

A MIS MEJORES AMIGOS

Iliana Santillan, Walter Medrano, Karina González, Raúl Chora, Lupis Pérez, y Claudia Flores por su apoyo incondicional siempre, por ayudarme a salir adelante en mis tropiezos, por brindarme siempre una sonrisa y un consejo, por todas las alegrías compartidas y algunas tristezas que nos unieron más, por brindarme siempre su amistad. LOS QUIERO MUCHO.

A ESA PERSONA ESPECIAL

Ricardo Hernández V.

Por darle a mi vida momentos maravillosos e inolvidables, por compartir a mi lado tristezas y alegrías, por tu apoyo y por brindarme la oportunidad de ser feliz. TE AMO.



ÍNDICE

	Páginas.
Introducción.	4
Objetivos.	5
✓ General	
✓ Particulares	
Capítulo I. Antecedentes.	
1.1 <i>El limón.</i>	7
1.1.1 Composición química.	8
1.1.2 Aprovechamiento y producción.	9
1.2 <i>Alimentos funcionales</i>	11
1.3 <i>Fibra dietética</i>	
1.3.1 Clasificación	12
1.3.2 Propiedades	14
1.4 <i>Antioxidantes</i>	17
1.4.1 Polifenoles	19
1.4.2 Flavonoides	21
1.4.3 Métodos para medir actividad antioxidante	23
Capítulo II Desarrollo experimental.	
<i>Diagrama general de la investigación</i>	27
2.1 <i>Obtención y acondicionamiento de la muestra.</i>	28
✓ Muestra	
✓ Análisis composicional	



2.2	<i>Fracción rica en fibra.</i>	28
2.3	<i>Análisis de la fibra dietética total</i>	
2.4	<i>Análisis de la fibra dietética soluble e insoluble</i>	29
2.5	<i>Análisis de propiedades funcionales</i>	
2.5.1	Capacidad de retención de agua (CRA).	
2.5.2	Capacidad de retención de aceite (CRG).	
2.5.3	Capacidad de hinchazón	30
2.5.4	Índice de emulsificación	
2.6	<i>Polifenoles.</i>	
2.6.1	Método de extracción	
2.6.2	Cuantificación de polifenoles totales	30
2.7	<i>Evaluación de la actividad antioxidante.</i>	31
2.7.1	Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH.	
2.7.2	Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS	
2.7.3	Blanqueo del β -Caroteno	32
2.7.4	Inhibición de la oxidación lipídica (liposomas)	
2.8	<i>Caracterización de polifenoles totales</i>	
2.8.1	Identificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia.	
2.8.2	Identificación y cuantificación de flavonoides glucosilados.	33
2.9	<i>Cuantificación de ácido ascórbico.</i>	33

Análisis Estadístico

**Capítulo III. Resultados y Discusión.**

3.1	<i>Muestra.</i>	35
3.2	<i>Fracción rica en fibra</i>	
3.3	<i>Análisis de la fibra dietética total.</i>	37
3.4	<i>Análisis de la fibra dietética soluble e insoluble.</i>	38
3.5	<i>Análisis de las propiedades funcionales.</i>	41
	3.5.1 Capacidad de retención de agua (CRA)	42
	3.5.2 Capacidad de retención de grasa (CRG)	
	3.5.3 Capacidad de hinchazón	43
	3.5.4 Índice de emulsificación	44
3.6	<i>Contenido de polifenoles.</i>	
3.7	<i>Evaluación de la actividad antioxidante.</i>	45
	3.7.1 Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH	46
	3.7.2 Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS	47
	3.7.3 Blanqueo del β -Caroteno	48
	3.7.4 Inhibición de la oxidación lipídica (liposomas)	50
3.8	<i>Identificación de polifenoles.</i>	52
	3.8.1 Cuantificación de flavonoides glucosilados.	56
3.9	<i>Cuantificación de ácido ascórbico.</i>	59

Conclusiones*Bibliografía**Apéndice.**Anexo.*



INTRODUCCIÓN.

Actualmente existe la necesidad de consumir productos naturales para mantener una buena salud y extender los años de vida, por tal motivo estos productos -denominados científicamente alimentos funcionales- han tomado cada vez mayor importancia entre los consumidores, debido a que están formados por un componente natural o procesado, que además de sus elementos nutritivos, contienen ingredientes adicionales que favorecen a la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona; entre ellos destaca la presencia de la fibra dietética y antioxidantes, los cuales proporcionan beneficios a la salud potencialmente importantes, como la actividad anticancerígena, antiviral, antiinflamatoria y antialérgica.

La industria del limón genera toneladas de “desperdicio”, debido a que se limita al consumo del jugo, siendo la semilla la que menor valor comercial posee. Al respecto, el Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en el año 2000 reportó que nuestro país alcanzó una producción de 2,800,000 toneladas de limón mexicano (con semilla), de las cuales solo 1,260,000 toneladas son consumidas en forma de jugo o pulpa, mientras que las 140,000 toneladas de semilla, y 1,400,000 toneladas de bagazo, son prácticamente desechadas.

Analizando las estadísticas anteriores y con el propósito de conocer el potencial que tiene la semilla como fuente de ingrediente funcional, se propone el estudio de fibra dietética, evaluando sus propiedades funcionales y su actividad antioxidante.

El presente estudio tiene la finalidad de ayudar a incrementar el valor comercial del fruto y abrir la posibilidad de entrar en el mercado altamente competitivo mediante el desarrollo de nuevos productos.



OBJETIVOS.

GENERAL:

Obtener una fracción rica en fibra dietética total con actividad antioxidante a partir de semillas desengrasadas de limón mexicano, para conocer sus propiedades como alimento funcional y la posibilidad que representa utilizarla como complemento, en el desarrollo de nuevos productos.

PARTICULARES:

- ✓ Establecer condiciones para la obtención del concentrado de fibra dietética total a través de un método físico.
- ✓ Caracterizar la fibra dietética soluble y la fibra dietética insoluble para obtener valores individuales de la fibra dietética total y así conocer sus propiedades fisiológicas.
- ✓ Conocer la concentración de compuestos fenólicos presentes en la fibra dietética total y evaluar la capacidad antioxidante como parámetro de eficiencia al inhibir la auto-oxidación.
- ✓ Conocer el perfil y la cantidad de compuestos con actividad antioxidante para identificar sus características individuales y sus propiedades dentro de la fibra dietética.

CAPITULO I

ANTECEDENTES



1.1 EL LIMÓN

Los cítricos constituyen el género *Citrus*, son parte de la familia de las rutáceas y la conforman varias especies, entre ellas: las naranjas (*Citrus sineresis*, *Citrus aurantium*); los limones (*Citrus aurantifolia*); las mandarinas (*Citrus reticulata*, *Citrus reshni*) y los pomelos (*Citrus paradisi* Maef). Estas especies han sufrido numerosas modificaciones debido a la selección natural e hibridaciones tanto naturales como producidas por el ser humano. La dispersión de los cítricos desde sus lugares de origen, se debe fundamentalmente a los grandes movimientos migratorios (Infoagro, 2003).

El limón proviene de un árbol llamado limonero, se cultiva en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, sobre todo en Italia, España, Portugal y Estados Unidos; alcanza entre 3 y 6 metros de altura y está cubierto de follaje, la flor tiene cinco sépalos, numerosos estambres y un solo pistilo, los pétalos son blancos por el haz y rosados por el envés, la flor exhala un aroma agradable. El fruto está conformado por:

- El flavedo: (8-10%) tejido exterior que está en contacto con la epidermis. Abundan vesículas o celdillas que contienen lípidos, aceites esenciales y cloroplastos.
- Albedo:(15-30%) se encuentra debajo del flavedo, es un tejido esponjoso, blanco y celulósico, constituye la mayor parte de la corteza, el mismo tejido forma el corazón o eje central del fruto, y ambos contienen los vasos que proporcionan agua y materiales nutritivos.
- Endocarpio:(45-55%) parte comestible de los cítricos, está formado por los carpelos o gajos, que están separados por las membranas intercapilares, contiene la mayor parte fibrosa y celulósica de las vesículas y retienen una gran cantidad de zumo.
- Semillas: (0.4%) de cubierta dura lignocelulósica, están situadas dentro de dos filas en el endocarpio, justo alrededor del eje central, cada segmento contiene algunas semillas. Contienen una considerable cantidad de proteína que algunas veces llega al 16% en base seca, tienen una alta cantidad de aceite, el cual es utilizado comercialmente (ver tabla 1). Cuando está seca posee entre 30 y 35% de aceite y ocasionalmente llega a 50% (Braverman, 1997 y Fennema, 1995).



Tabla 1. Composición química de la semilla fresca.

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/100g)
AGUA	44.6 - 39.0
GRASA	19.5 - 25.5
PROTEÍNA CRUDA	10.6 - 8.6
FIBRA	4.6 - 7.2
COMPUESTOS NO NITROGENADOS	18.7 - 17.2
CENIZAS	1.7 - 2.3

Fuente: Braverman, 1997.

1.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química del limón es influenciada por diversos factores como son sus condiciones de crecimiento, maduración, variedad y clima. Sus principales componentes están detallados a continuación.

MACROCOMPONENTES

Carbohidratos: en el jugo del limón, los carbohidratos son los sólidos solubles que se encuentran en mayor proporción, seguidos por los ácidos orgánicos. Los azúcares del limón están conformados por glucosa (2.4%), fructosa (2.4%) y sacarosa (4.7%), dentro de los ácidos orgánicos se encuentran el ácido cítrico, málico y en menor cantidad tartárico, benzoico, succínico, oxálico y fórmico. 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.

Lípidos: la mayor parte de los lípidos se encuentran en la semilla, en cantidades menores en la cáscara, vesículas y el jugo. En la semilla se encuentran principalmente: ácidos grasos saturados: palmítico 20%, estéarico 4%, araquidónico 0.9% y ácidos grasos insaturados: linoléico 36.5%, linolénico 0.6% y oleico 36.6%. Dentro de los aceites esenciales, el principal constituyente es la δ -limonina que es uno de los compuestos responsables en el sabor y aroma del limón (Fennema, 1995).



Compuestos Nitrogenados: la mayor parte del nitrógeno (40-70%) proviene de los aminoácidos de las proteínas

MICROCOMPONENTES

Minerales y Vitaminas: el limón tiene un alto contenido de potasio (100-350mg/mL) y bajo contenido en sodio (1-10mg/mL), el potasio forma del 60 al 70% del total de las cenizas, y la mayor proporción de calcio y magnesio se encuentran combinados con la pectina. Posee diferentes vitaminas como son: Vitamina C (ácido ascórbico), principalmente en el albedo y mesocarpio, y la Vitamina B1 (tiamina).

OTROS COMPUESTOS

Pigmentos: en el limón, el pigmento verde se debe a dos componentes: la clorofila *a* y la clorofila *b*, la mayor parte de los carotenos se localizan en el flavedo (alrededor del 70%), y en general todos los pigmentos aumentan con la maduración.

Enzimas: la Pectinesterasa en frutas cítricas se encuentra en grandes concentraciones en las vesículas, y disminuye en el flavedo y el albedo.

Flavonoides: son componentes que caracterizan a los frutos cítricos y sus productos derivados, se localizan tanto en el jugo como en los tejidos sólidos, se distribuyen de manera no uniforme, pero es común que haya concentraciones más altas en los tejidos sólidos que en el jugo. En general se considera que el contenido de flavonoides en cítricos disminuye con la maduración (Fennema, 1995).

1.1.2 PRODUCCIÓN Y APROVECHAMIENTO DEL LIMÓN.

En nuestro país, la producción de limón está destinada principalmente a dos variedades: el limón persa o sin semilla (*Citrus latifolia*) y el limón mexicano o con semilla (*Citrus aurantifolia*). 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; y principalmente se exporta, mientras que para el limón mexicano, la principal zona productora se encuentra en la costa del Pacífico (Colima, Michoacán,



Jalisco, Guerrero, Oaxaca), ocupando el 70% de la producción nacional, y es básicamente reservado para autoconsumo. Durante 1999, las exportaciones totales mexicanas de limones y limas a nivel global, registraron un valor de 70 millones de dólares, de los cuales más del 90% correspondieron al limón sin semilla (persa). El principal mercado de destino fue Estados Unidos, absorbiendo el 79% del total en dicho año (55 millones de dólares) (SIAP 2001).

Dentro de las 2,800,000 toneladas de limón mexicano, producidas en nuestro país en el año 2000, se generaron 1,540,000 toneladas de residuos totales, incluyendo la cáscara, el bagazo y las semillas. Esta cantidad representa el 55% del total del fruto producido en ese año que no fue aprovechado.

Según datos de la FAO en el periodo 1990-2000 se produjo un total de 95 millones de toneladas de limones y limas en el mundo, de las cuales México ocupa el primer lugar como productor con el 11.3%, seguido por India (10.5%), Estados Unidos (9.2%), Argentina (9.2%) e Irán (8.4%). Sin embargo de esta producción se consume solo el 45% del fruto en forma de jugo o pupa, generando millones de toneladas (52.25) de sobrantes (cáscara, bagazo y semilla). Se debe tener en cuenta que el limón es uno de los productos de mayor aprovechamiento integral: la cáscara es utilizada en la elaboración de aceites esenciales, pectina y bases para bebidas, la pulpa es destinada principalmente a la preparación de mermelada, del bagazo y la semilla se extrae aceite, mientras que el resto es utilizado como alimento para ganado como menciona Grigelmo 1999, se extrae jugo de la fruta fresca y se procesa en sus diversos tipos: pasteurizado, concentrado, congelado y deshidratado. También se derivan algunos productos utilizados por la industria farmacéutica como el vinagre, el alcohol y el ácido cítrico (Del Río et al, 2003 e Infoagro, 2003).



1.2 ALIMENTOS FUNCIONALES.

El interés del consumidor por ingerir dietas saludables y su creciente rechazo por los alimentos procesados, ha sido la vía para diseñar los “alimentos funcionales”.

No existe un acuerdo para definir en forma precisa lo que son “alimentos funcionales”, se trata de un concepto que podría ser clasificado como un producto intermedio, entre los alimentos tradicionales y la medicina según Vasconcellos, 1998.

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

Los alimentos funcionales, los productos alimentarios y los suplementos de dieta, que proveen un posible beneficio fisiológico en el control o la prevención de enfermedades, representan una oportunidad para el desarrollo de nuevos productos.

La base de los componentes a que se refiere la definición es eminentemente de origen vegetal o fitoquímica, aunque como excepción, también están incluidos los suplementos prebióticos (*Hasler et al, 1998*).

1.3 FIBRA DIETÉTICA.

En la antigüedad la parte del alimento que no contenía nutrientes se daba por perdida; la fibra es la parte no digerible del alimento, consiste desde el punto de vista químico en celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina y gomas, mientras que físicamente consiste en las paredes celulares de las plantas, tallos, semillas, cáscara y hojas. Lo que había sido denigrado como “desechos indigeribles” es ahora aclamado, como fibra dietética, la cual es parte necesaria de una dieta sana (*Brian, 1992*).

A la fibra dietética se le atribuyen propiedades tan diversas como: ser un regulador intestinal, al actuar como laxante; representa un factor preventivo del cáncer de colon: es un absorbente de ácidos biliares y retarda la absorción



intestinal, también favorece la disminución del colesterol y de la glucosa en la sangre. Debido a lo anterior, la fibra dietética es considerada como un producto nutraceútico (*Bach, 2001*).

Puede utilizarse en formulaciones de alimentos: para la modificación de la textura y el incremento de la estabilidad, mediante su adición en la elaboración de productos (*Borroto y Rodríguez, 1995*).

Los nutriólogos recomiendan una ingesta de 20-30g de FD al día (*Bach, 2001*).

1.3.1 CLASIFICACIÓN DE LA FIBRA DIETÉTICA.

La fibra dietética no tiene por que ser necesariamente fibrosa por naturaleza, tanto los materiales insolubles de las paredes celulares de las plantas (celulosa, hemicelulosa y lignina), como algunos polisacáridos solubles (pectina y gomas), son considerados componentes de la fibra dietética (*Fennema, 1995*).

La Fibra Dietética se clasifica en: fibra dietética insoluble en agua y fibra dietética soluble en agua, ambas fracciones se caracterizan por poseer efectos fisiológicos totalmente distintos (ver tabla 2) (*Bach, 2001*).

Fibra dietética soluble (FDS): Incluye pectinas, gomas, mucílagos y ciertos tipos de hemicelulosa solubles, se caracteriza porque gran parte de ella sufre un proceso de fermentación en el colon, con producción de hidrógeno, metano, dióxido de carbono y ácidos grasos de cadena corta (Periago y López, 1992).

Gomas: son moléculas de alto peso molecular, constituídas por polímeros hidrolíticos de unidades monosacáridas y derivados, unidos por enlaces glucosídicos, formando largas cadenas que pueden estar unidas por un solo tipo de monosacárido o por distintos (*Borroto y Rodríguez, 1995*).



Pectina: es una molécula muy compleja, son galacturonoglicanos, con contenidos variables de grupos metiléster, tiene la propiedad única de formar geles extensibles en presencia de azúcar y ácido. La pectina comercial, se obtiene de la peladura de los cítricos y las manzanas, la pectina de la piel de limón y limas, es la más fácil de aislar y es de la mejor calidad.

Carragenatos: son mezclas de varios galactanos, parecidos entre sí, con grupos semiéster sulfato unidos a las unidades de azúcar, se extraen a partir de algas rojas, se disuelven en agua y forman soluciones de alta viscosidad, la gelificación puede producirse en soluciones acuosas, a concentraciones tan bajas como 0.5%, cuando las soluciones se enfrían en presencia de iones potasio, se forma un gel rígido y frágil.

Alginatos: es una sal, la mayoría de las veces sódica, de un ácido poliurónico, se obtiene a partir de las algas pardas, las soluciones de los alginatos sódicos son muy viscosas, se forman por unidades monoméricas, de ácido β -D-manopiranosilurónico y ácido α -L-gulopiranosilurónico (Fennema, 1995).

La Fibra dietética insoluble (FDI): Formada por la celulosa, lignina y hemicelulosa, apenas sufre procesos fermentativos, tiene un efecto más marcado en la regulación intestinal, con reducción de tiempo, en el tránsito de los alimentos y aumento de la excreción (Bach, 2001).

Celulosa: es el principal carbohidrato estructural de las plantas, está ampliamente distribuido y es el compuesto orgánico más abundante de la Tierra. Asimismo es una forma compuesta de unidades de glucosa, es un homopolímero de alto peso molecular, lineal e insoluble, formado por D(+)-glucosa que posee enlaces β -(1-4) glucosídicos (Brian, 1992).



Hemicelulosa: son polímeros de las pentosas, sobre todo D-xilanos, los cuales son polímeros de la D-xilosa con enlace β (1-4), posee cadenas laterales de arabinosa y otros azúcares (ác glucurónico y galactosa), lo que confiere distintas propiedades químicas.

Lignina: sustancia intracelular propia de los vegetales, tiene una estructura y naturaleza amorfa y compleja, se encuentra asociada con polisacáridos, ácidos urónicos y proteínas, es la parte hidrofóbica de la fibra dietética (Bach, 2001).

Tabla 2. Clasificación de fibra dietética.

FIBRA DIETÉTICA	
SOLUBLE EN AGUA	INSOLUBLE EN AGUA
GOMAS	CELULOSA
PECTINAS	HEMICELULOSA
MUCÍLAGOS	LIGNINA DE KLASON

Fuente: Brian, 1992.

1.3.2 PROPIEDADES.

Las variedades de fibras, se diferencian entre sí por su composición y sus propiedades fisicoquímicas, éstas se determinan por lo general *in vitro* y sólo sirven para dar una idea de su comportamiento *in vivo*, ya que en este medio, están sometidas a un entorno fisiológico muy complejo, y a una serie de mecanismos que pueden modificarlo (Fibra-Salud, 2004).

Se puede resumir las propiedades más importantes de la fibra de la siguiente forma:



1. Capacidad de absorción y retención de agua

Todas las fibras son capaces en un medio acuoso de captar agua hasta cierto límite, la fibra está condicionada sobre todo por su grado de solubilidad. Además, intervienen el tamaño y la conformación de las partículas e incluso el valor del pH y la concentración de los electrólitos del medio. La absorción de agua se produce por fijación a la superficie de la fibra o por adherencia en el interior de la estructura macromolecular (*Fibra-Salud, 2004*).

Las fibras solubles presentan una estructura de polisacárido, que permite la fijación de agua. La solubilidad de los distintos tipos de fibra confiere a ésta unas propiedades diferentes:

- **Las fibras insolubles** (fibrosas) la celulosa, hemicelulosa y sobre todo la lignina, que es la más hidrofóbica de todas las moléculas, captan poca agua y forman mezclas de baja viscosidad, a medida que la planta va madurando y se va haciendo más rica en lignina, va perdiendo progresivamente contenido en agua.

- **Las fibras solubles** (gelificantes) son totalmente diferentes. En contacto con el agua forman un retículo donde queda atrapada el agua, gelificándose la mezcla. De este grupo forman parte las gomas, los mucílagos y las pectinas, así como algunas hemicelulosas solubles.

2. Fijación de sustancias orgánicas e inorgánicas

La fibra dietética pasa a través del intestino, donde desarrolla su capacidad de hidratación y de adsorción (fijación), la cual es variable en sustancias orgánicas e inorgánicas. Estas sustancias, que pueden quedar simplemente atrapadas en el interior de la estructura química de la fibra, o bien “ligadas” por enlaces químicos a ésta, son las siguientes:

A. Proteínas, hidratos de carbono y grasas: Son los principios inmediatos que ingresan con los alimentos y son hidrolizados en el intestino para poder absorberse. Con la acción de la fibra, estas sustancias verán retrasada su



absorción y aumentada ligeramente su excreción con las heces, la pérdida de proteínas, hidratos de carbono y grasa que saldrán al exterior con las heces no es importante desde el punto de vista nutricional, sin embargo, puede ser de gran utilidad para el control de algunas enfermedades como la diabetes y la hipercolesterolemia. Las fibras con mayor capacidad para atrapar en su interior a estas sustancias son las viscosas, es decir, las solubles como las pectinas, gomas y mucílagos.

B. Sales biliares: Las células hepáticas producen, a partir del colesterol, ácidos biliares, cuyas sales son secretadas con la bilis. En el tubo digestivo, las sales biliares desarrollan una **acción emulsionante** sobre las moléculas grasas procedentes de la alimentación y una acción transportadora de ácidos grasos hasta la mucosa intestinal para que puedan ser absorbidos. Determinados tipos de fibra, especialmente la lignina y algunas solubles (pectinas, gomas y mucílagos) son capaces de secuestrar las sales biliares y eliminarlas con las heces.

C. Minerales y vitaminas: Se ha comprobado que la lignina y las fibras ricas en ácidos urónicos, como las hemicelulosas ácidas, las pectinas y algunas gomas, son capaces de fijar determinados minerales como el calcio, el fósforo, el zinc, el magnesio y el hierro, y algunas vitaminas en las que puede alterar su absorción (*Fibra-Salud, 2004*).

3. Absorción de lípidos.

Los efectos sobre la absorción de lípidos pueden deberse a interferencias en los procesos de **emulsificación** y **lipólisis de la grasa** dietaria, provocando una disminución en la solubilización y absorción de colesterol y otros lípidos, que a su vez ocasiona un efecto hipocolesterolémico. Por tanto, el incremento en la ingesta de fibra dietética, particularmente de alimentos que contengan polisacáridos gelantes o mucilaginosos, puede interferir con la circulación enterohepática de los ácidos biliares incrementando la excreción de esteroides (*Fibra-Salud, 2004*).



1.4 ANTIOXIDANTES.

Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de inhibir o retardar el comienzo de la oxidación causada por materiales autooxidables independientemente de su mecanismo de acción. Existen literalmente cientos de compuestos, tanto naturales como sintéticos, con propiedades antioxidantes. Los principales antioxidantes utilizados habitualmente en los alimentos son los fenoles mono o polihídricos con varias sustituciones en el anillo. Para que su eficiencia sea máxima, a menudo los antioxidantes primarios se combinan con otros antioxidantes fenólicos o con agentes secuestrantes de metales.

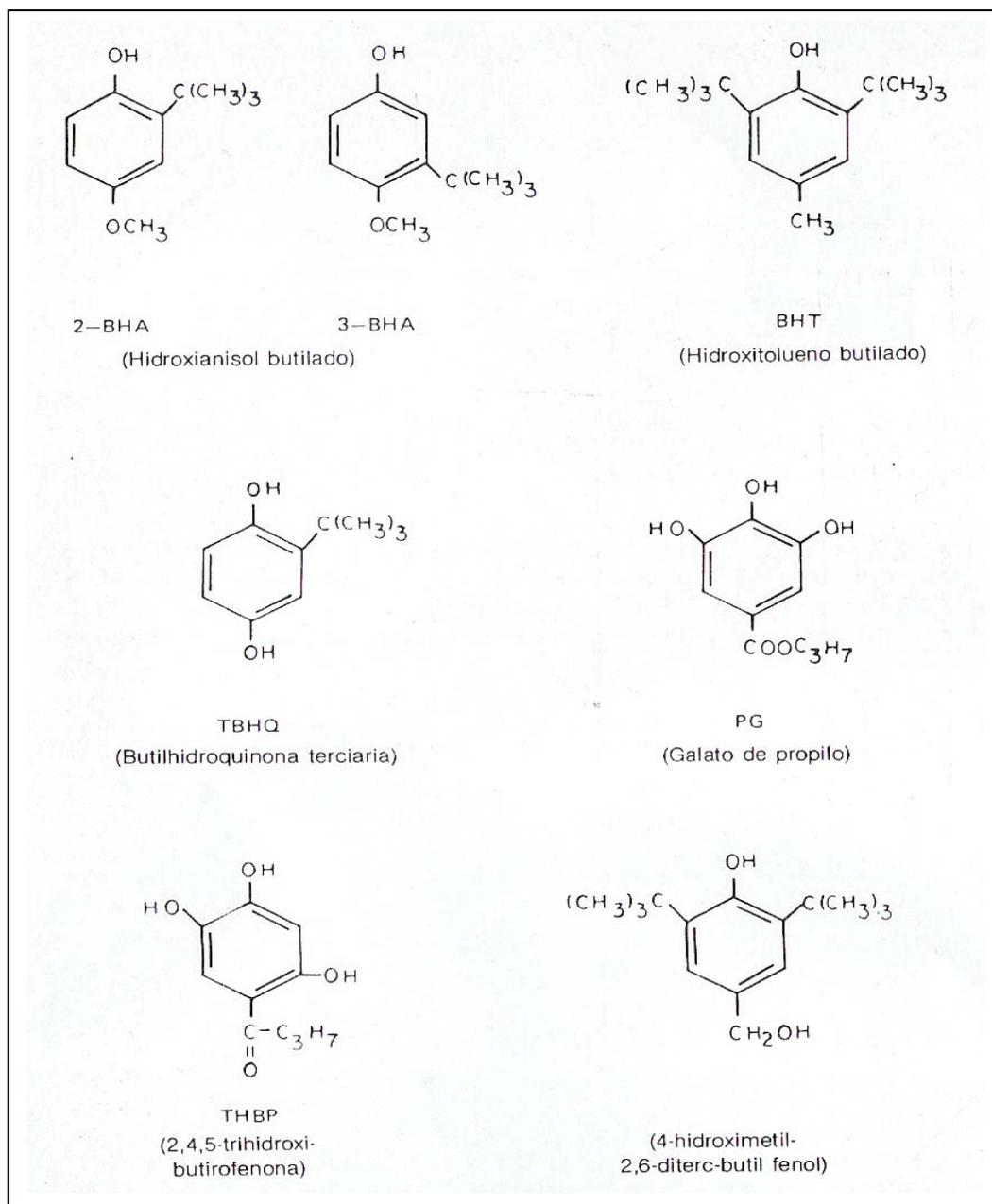
Actualmente se clasifican en dos tipos; los sintéticos y los naturales. Dentro de los primeros se encuentra el BHA, BHT, TBHQ y PG (ver figura 1), para el caso de los antioxidantes naturales se tienen a los tocoferoles, el ácido ascórbico, los carotenoides y los compuestos fenólicos. Con respecto a estos los antioxidantes fenólicos ocupan una situación privilegiada. Son excelentes donadores de electrones o de hidrógeno y además sus radicales intermedios son relativamente estables debido a la deslocalización por resonancia y a la falta de posiciones apropiadas para ser atacados por el oxígeno molecular.

Los tocoferoles son los antioxidantes distribuidos más ampliamente en la naturaleza y constituyen el principal antioxidante de los aceites vegetales. Se conocen siete estructuras del tocoferol, todas derivadas del metil tocol (ver figura 2), y en los aceites vegetales predominan las formas α , γ y δ . Como antioxidantes, los tocoferoles ejercen su máxima eficacia a niveles relativamente bajos, y si se utilizan a concentraciones muy altas, pueden actuar como pro-oxidantes.

Entre algunas de las características de los antioxidantes destacan las siguientes: la potencia se usa para impedir la rancidez en un sistema lipídico, la cual depende de la facilidad de donar protones; la solubilidad debe ser adecuada en la fase lipídica para actuar sobre los radicales libres; la concentración inadecuada acarrea problemas de estabilidad cuando hay excesos o deficiencias, los antioxidantes, deben añadirse antes de los primeros indicios de la auto-oxidación, debido a que son de tipo preventivo y no tienen efecto en las grasas oxidadas (*Baduí, 1996 y Fennema, 1995*).



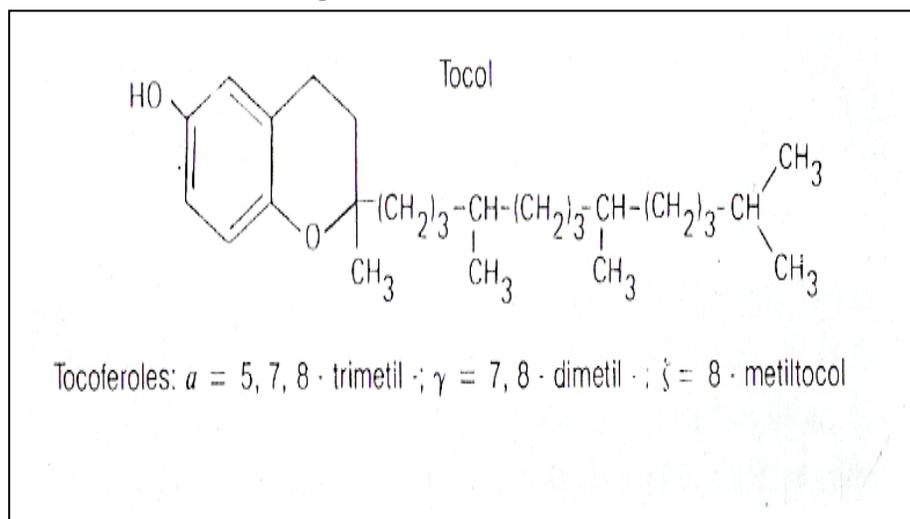
Figura 1. Principales antioxidantes sintéticos en alimentos.



Fuente: Fennema, 1995



Figura 2. Estructura del tocol.



Fuente: Fennema, 1995

1.4.1 POLIFENOLES

Son metabolitos secundarios que son derivados de fosfatos, pentosas y fenilpropanoides en plantas, los compuestos fitoquímicos son considerados importantes por su morfología y fisiología, tienen un papel en la reproducción y protección contra patógenos y depredadores, y muchos contribuyen al color y las características sensoriales de las frutas y vegetales, los efectos benéficos de los compuestos fenólicos, se atribuyen a la actividad antioxidante que tienen (Nagendran, 2005).

La estructura general de los compuestos fenólicos consta de uno o más anillos aromáticos y uno o más sustituyentes hidroxilo.

Los ácidos fenólicos, constituyen dos grupos: los *ácidos hidroxibenzóicos* y los *ácidos hidroxicinámicos*.

- ✓ **Los ácidos hidroxibenzóicos** incluyen al ácido gálico, p-hidroxibenzóico, protocatequino y vainillinico, su estructura comúnmente tiene C₆ – C₁. (ver figura 3).

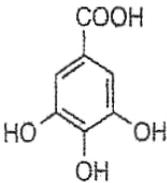
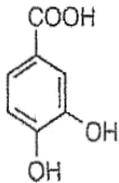
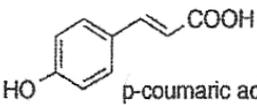
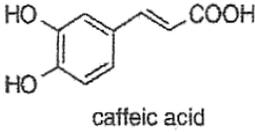
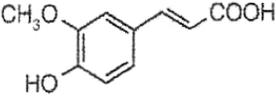
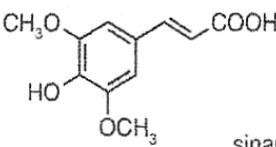


- ✓ **Los ácidos hidroxicinámicos** incluyen al ácido caféico, ferúlico, p-cumárico y al sináptico, su estructura está conformada por C₆ – C₃. (ver figura 3).

Los ácidos hidroxicinámicos constituyen la mayor parte del contenido de fenoles en cítricos, pero muy pocos se encuentran como ácidos libres, el ácido ferúlico es generalmente el ácido hidroxicinámico mayoritario, mientras que los ácidos cumárico, sináptico y caféico, se encuentran en menores cantidades.

Taninos: son compuestos de alto peso molecular, son un grupo muy importante dentro de los fenoles, se dividen en taninos condensados e hidrolizables (Nagendran, 2005).

Figura 3. Estructura de ácidos fenólicos.

Ácidos Fenólicos	Estructuras
Ácidos hidroxibenzóicos	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>gallic acid</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>protocatechuic acid</p> </div> </div>
Ácidos hidroxicinámicos	<div style="display: grid; grid-template-columns: 1fr 1fr; gap: 10px;"> <div style="text-align: center;">  <p>p-coumaric acid</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>caffeic acid</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>ferulic acid</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>sinapic acid</p> </div> </div>

Fuente: Nagendran, 2005



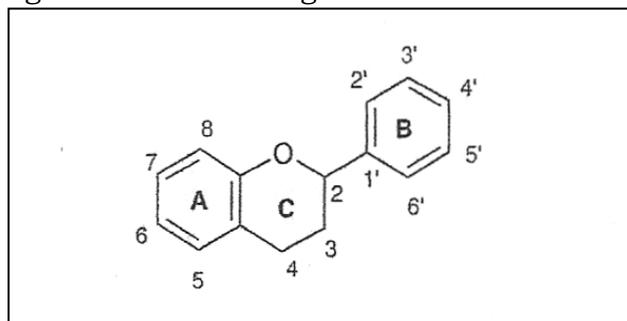
Los diversos radicales fenoxi que se forman por los grupos fenoles, actúan como antioxidantes cuando contrarrestan la oxidación de otros componentes presentes en el medio (Nagendran, 2005).

1.4.2 FLAVONOIDES

Los compuestos fenólicos más ampliamente distribuidos en la naturaleza son los flavonoides, los cuales se encuentran de manera ubicua en los alimentos vegetales (Robards et al, 1999).

Los flavonoides tienen un alto peso molecular, están formados por quince átomos de carbono, esencialmente por dos anillos aromáticos y tienen una estructura base de $C_6 - C_3 - C_6$ con un oxígeno formando un heterociclo. Ver figura 4.

Figura 4. Estructura general de los flavonoides.

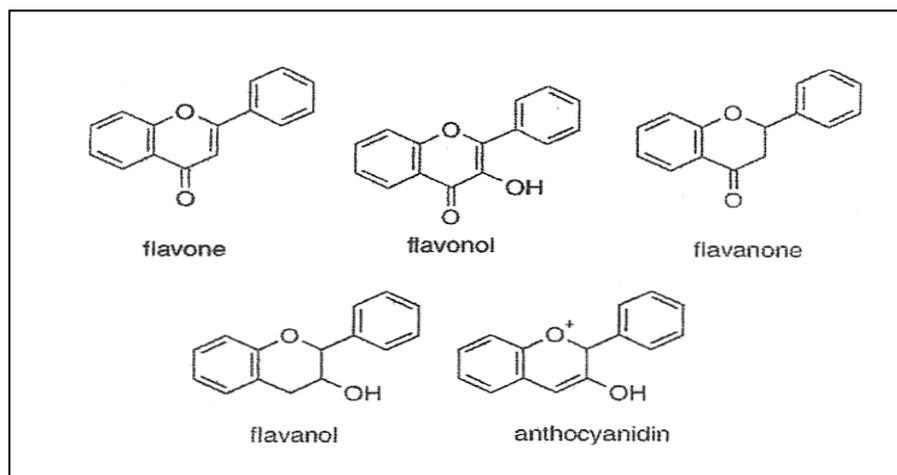


Fuente: Nagendran, 2005.

Dentro de los flavonoides se encuentran los flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y antocianidinas, la diferencia entre estos compuestos esta dada por la distribución de las dobles ligaduras, la presencia de grupos OH y oxígeno, los cuales se ubican en la parte central de la estructura base (C_3), que es el lugar en donde se localiza el heterociclo (ver figura 5) Nagendran, 2005.



Figura 5. Flavonoides.



Fuente: Nagendran, 2005.

En términos de la composición de flavonoides, los cítricos son excepcionales, ya que algunos flavonoides se encuentran únicamente en ellos, su patrón es específico para cada especie, existen tres tipos de compuestos flavonoides en los cítricos: Las Flavanonas (Hesperidina), las Flavonas (Diosmina), y las Antiocianinas.

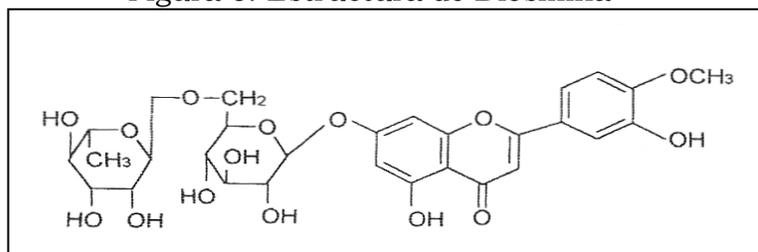
Las flavonas de los cítricos generalmente se encuentran como glucósidos, mientras que en otras plantas, raramente se da esta estructura (Bocco et al, 1998).

Los cítricos contienen un buen número de flavonas polimetoxiladas, como un grupo menor dentro de los flavonoides, la concentración de éstas es alta en el flavedo y son fácilmente aisladas del aceite esencial de los cítricos, pero también se han identificado en el jugo.

Los Flavonoides Glucosilados; son un grupo de flavonoides unidos a una o más moléculas de azúcar (ver figura 6 y 7), en el limón se han reportado la existencia de varios flavonoides glucosilados: Hesperidina, Diosmina, Eriocitrina, y Rutinina (Bocco et al, 1998).

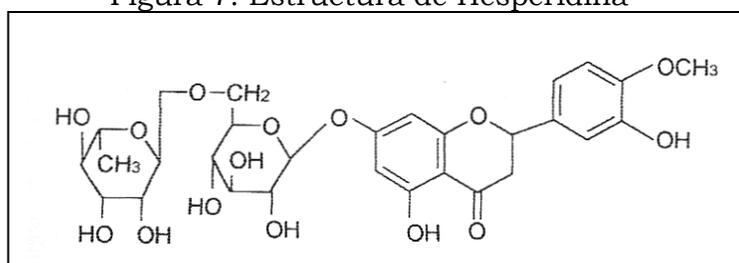


Figura 6. Estructura de Diosmina



Fuente: Bocco et al, 1998

Figura 7. Estructura de Hesperidina



Fuente: Bocco et al, 1998

1.5 MÉTODOS PARA MEDIR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Los métodos más usados comúnmente para determinar la actividad antioxidante, son aquellos que involucran compuestos cromógenos de naturaleza radical, para simular especies reactivas de oxígeno, por su rapidez, facilidad y sensibilidad (Matthaus, 2002).

Los dos métodos para medir la actividad antioxidante más ampliamente usados son los que involucran al radical ABTS⁺ y al radical DPPH[•], ambos presentan excelente estabilidad. El grado de decoloración indica el potencial secuestrante, mientras mas rápido decrece la absorbancia, es más potente la actividad antioxidante de los compuestos, todo en termino de su habilidad para donar hidrógenos (Arnao y Cano, 2001).



Existen otros sistemas que involucran al ácido linoléico. La actividad antioxidante determinada por el blanqueo del β -caroteno, mide el tiempo en que tardan en aparecer, los productos de degradación oxidativa del ácido linoléico, para que estos no ataquen a la molécula del β -caroteno, el cual sufre una decoloración rápida en ausencia de un antioxidante. El ácido linoléico forma micelas en sistemas acuosos, que son altamente oxidables (liposomas), por la doble capa lipídica que poseen, en la inhibición de la oxidación lipídica, se cuantifica la eficiencia de los extractos, para evitar la oxidación de las micelas (*Matthaus, 2002 y Siddhuraju, 2002*).

CAPITULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

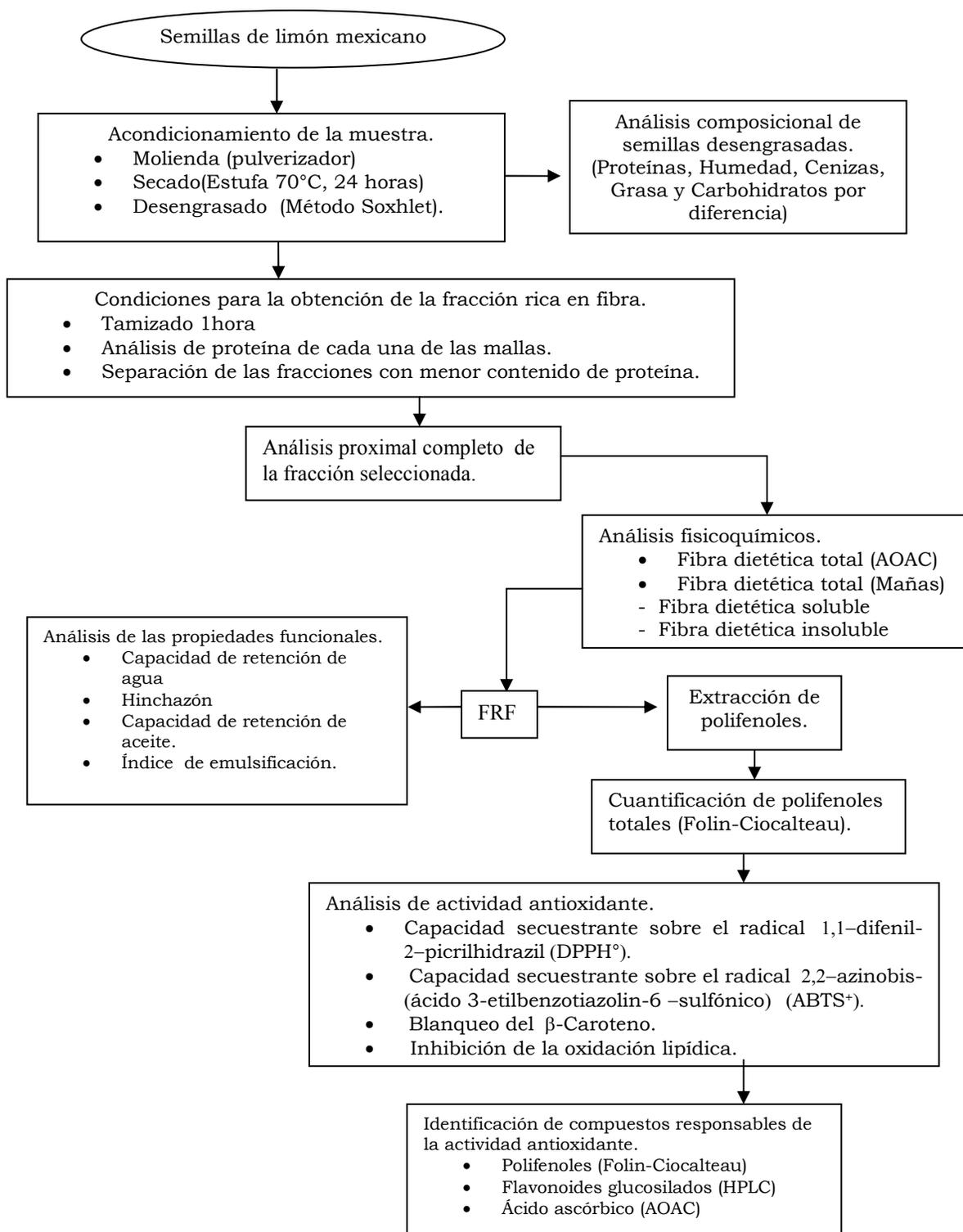


En el siguiente capítulo se describe la metodología que se siguió en la obtención de la fracción rica en fibra de la semilla de limón, la cual se dividió de la siguiente manera:

- 1.- Acondicionamiento de la muestra y su análisis composicional.
- 2.- Obtención de las condiciones del método físico (tamizado), seguido de un análisis de proteína en cada una de las mallas en donde se retuvo muestra.
- 3.- A las fracciones con menor cantidad de proteína (del paso anterior), se les realizó un análisis proximal completo (cantidad de proteína, humedad, cenizas, lípidos y carbohidratos por diferencia). Posteriormente se realizó un análisis de fibra dietética total por el método oficial de la AOAC (985.29), comparando con el método descrito por Mañas (1994). Una vez que se obtuvo la cantidad de fibra contenida, se les analizó sus propiedades funcionales más representativas: capacidad de retención de agua, capacidad de retención de aceite, capacidad de hinchazón y el índice de emulsificación.
- 4.- Se extrajeron los polifenoles de la fracción rica en fibra, se cuantificaron (método de Folin-Ciocalteu) y se les midió su actividad antioxidante a través de cuatro ensayos; los dos primeros involucraron a radicales libres: capacidad secuestrante sobre el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH^o) y la capacidad secuestrante sobre el radical 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS⁺). Con los otros dos ensayos -- Inhibición de la oxidación lipídica y el blanqueo del β -caroteno-- se midió la capacidad que poseen los extractos para inhibir la oxidación de ciertos compuestos.
- 5.- Finalmente se identificaron los compuestos que otorgan la actividad antioxidante.



DIAGRAMA GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN.



- Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico o cromatográfico según se requirió.



2.1 OBTENCION Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

Muestra

Semillas de limón de la variedad mexicano (*Citrus aurantifolia*), provenientes del estado de Michoacán. Se redujo el tamaño de partícula y homogenizó con ayuda de un pulverizador, posteriormente se secó en la estufa de vacío a 70°C, hasta obtener una humedad residual del 5%, finalmente se llevó a cabo la separación de la grasa por el método Soxhlet, dejando en reflujo por 5 horas, para lo cual se utilizó éter etílico como disolvente.

Análisis composicional.

Para conocer la composición química de la semilla de limón molida y desengrasada, se realizó un análisis proximal: contenido de proteína (AOAC 981.85), grasa (AOAC 920.85), humedad (AOAC 925.10), cenizas (AOAC 923.03) y carbohidratos por diferencia, usando los métodos oficiales descritos por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1995).

2.2 FRACCIÓN RICA EN FIBRA

Con el propósito de obtener una fracción rica en fibra, se empleó un método físico de separación (tamizado), se utilizó una criba con diferentes mallas por una hora, obteniendo así, cada una de las fracciones que componen a la semilla de limón desengrasada, a las cuales se les realizó un análisis de proteína (AOAC 981.85).

2.3 ANÁLISIS DE LA FIBRA DIETÉTICA TOTAL.

Se siguió el Método oficial de la AOAC 985.29 para fibra dietética total en alimentos. Ver anexo.



2.4 ANÁLISIS DE LA FIBRA DIETÉTICA SOLUBLE E INSOLUBLE

Se llevó a cabo la metodología descrita por Mañas 1994, la cual, es una modificación del método oficial de la AOAC, en ella, se utilizan la mitad de los reactivos y muestra, se sustituye la precipitación alcohólica por centrifugaciones y lavados. Esta metodología da como resultados valores individuales de las fracciones solubles e insolubles de la fibra dietética total. Ver anexo.

2.5 ANÁLISIS DE PROPIEDADES FUNCIONALES.

2.5.1 Capacidad de retención de agua (CRA).

La capacidad de retención de agua, se define como la cantidad de agua que permanece unida a la fibra hidratada después de la aplicación de una fuerza externa (presión, o más comúnmente, centrifugación). Se sigue la metodología descrita por Robertson, 2000. Ver anexo.

La capacidad de retención de agua se expresa como la cantidad de agua retenida por gramo de muestra seca.

2.5.2 Capacidad de retención de grasa (CRG).

Las fibras insolubles pueden retener más de cinco veces su masa en aceite, esta propiedad es explotada en los alimentos, para incrementar su retención de grasa, la cual es perdida normalmente durante el cocimiento (*Thebaudin, 1997*).

Para determinar la capacidad de retención de grasa se utiliza el método descrito por Abdul-Hamid 2000. Ver anexo.

La capacidad de retención de grasa se expresa como mililitros de aceite absorbido por gramo de muestra (mL aceite/g muestra).



2.5.3 Hinchazón.

La propiedad de hinchazón se mide como el volumen obtenido por una masa definida de fibras, cuando se obtiene el equilibrio en presencia de un exceso de solvente (generalmente agua).

La hinchazón es definida como la relación del volumen ocupado por la muestra entre el peso de la muestra seca (*Robertson et al, 2000*). Ver anexo.

2.5.4 Índice de Emulsificación.

Para determinar el índice de Emulsificación se utiliza el método descrito por Robertson, 2000. Ver anexo.

El porcentaje de la mezcla total que queda emulsificado, se expresa como índice de emulsificación, y se evalúa de la siguiente manera:

Bueno = igual o mayor al 94%

Malo = igual o menor al 50%

2.6 POLIFENOLES.

2.6.1 Método de Extracción.

La metodología de extracción seguida es descrita por Saura-Calixto, 1998 y Larrauri, 1996. Ver anexo.

2.6.2 Cuantificación de Polifenoles totales.

La cantidad de polifenoles totales se determina con el método Folin-Ciocalteu descrito por Taga, 1984.

La concentración de polifenoles se calcula usando ácido tánico como estándar y los resultados se expresan como mg de ácido tánico por gramo de muestra. Ver anexo.



2.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

Para evaluar la capacidad antioxidante de los polifenoles asociados a la fibra, se emplean los siguientes métodos, comparando con la actividad antioxidante del Trolox (derivado carboxílico del α -tocoferol) en una concentración de 200ppm. Así mismo se obtienen las cinéticas de las reacciones, para observar las tendencias que presentan.

2.7.1 Capacidad secuestrante sobre el radical 1,1-difenil-1,2-picril hidrazil (DPPH°):

La reducción del radical DPPH° se observa como un cambio de color de morado a amarillo, la absorbancia decrece cuando el radical DPPH° es secuestrado por un antioxidante, mediante la donación de un hidrógeno o de un electrón, para formar una molécula diamagnética estable, el decremento en la absorbancia se registra continuamente a temperatura ambiente, y el efecto secuestrante se grafica en función del tiempo (Matthaus, 2002). Ver anexo.

2.7.2 Capacidad secuestrante sobre el radical 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS°).

El radical ABTS° es un compuesto cromóforo, deber ser generado por una reacción enzimática (peroxidasa) o química, para el presente trabajo fue por una reacción enzimática, la cual representa numerosas ventajas; se evitan reacciones no deseadas, no se requieren altas temperaturas para generar los radicales, y la actividad antioxidante puede ser estudiada en un amplio intervalo de pH. El decremento en la absorbancia se registra continuamente a temperatura ambiente, y el efecto secuestrante se grafica en función del tiempo (Ver anexo).



2.7.3 Actividad antioxidante determinada por el blanqueo del β -Caroteno.

La función del antioxidante, es retardar la formación de los productos de la degradación oxidativa del ácido linoléico, para que éstos no ataquen a la molécula del β -caroteno (Matthaus, 2002). Ver anexo.

Los resultados se expresan como el porcentaje de actividad antioxidante determinada por el blanqueo de β -caroteno.

2.7.4 Inhibición de la oxidación lipídica (liposomas)

Se prueba la actividad antioxidante de los extractos en una emulsión de aceite, se utiliza lecitina de soya, libre de antioxidantes, extraídos previamente, para evitar que estos interfieran con los resultados.

Los resultados se expresan como el porcentaje de la actividad antioxidante determinada por la inhibición de la oxidación lipídica. Ver anexo.

2.8 CARACTERIZACIÓN DE POLIFENOLES.

2.8.1 Identificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

Se han publicado gran variedad de condiciones cromatográficas para el análisis de las distintas subclases de flavonoides en diferentes plantas y alimentos, en trabajos anteriores se han encontrado factores en común, las condiciones de la columna (fase estacionaria), son casi exclusivamente de fase inversa C_{18} , con longitudes de 100 a 300nm, y 4.6 milímetros 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 o 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). Ver anexo.



2.8.2 Identificación y cuantificación de flavonoides glucosilados (Hesperidina y Diosmina) por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

La cuantificación de los flavonoides glucosilados presentes en la muestra de semilla de limón, se lleva a cabo por HPLC, se realizan curvas de calibración de hesperidina al 88.13% de pureza, y diosmina 95% de pureza, ambas SIGMA. Ver anexo.

Los resultados se expresan en mg de flavonoide glucosilado por gramo de muestra.

2.9 Cuantificación de ácido ascórbico

La vitamina C o ácido ascórbico, es un nutrimento del grupo de vitaminas hidrosolubles, es un polialcohol, que en solución se encuentra en forma de lactona insaturada. El ácido ascórbico tiene dos grupos enólicos, por lo que un agente oxidante puede producir su oxidación, originando al ácido dehidroascórbico. Un método muy utilizado en la determinación de ácido ascórbico en los alimentos, es la acción del pigmento 2,6-diclorofenol-indofenol (*AOAC 967.21*). La vitamina C se reduce a una forma incolora, por lo cual la determinación con este reactivo es una valoración volumétrica de oxidoreducción.

Los resultados se expresan en mg de ácido ascórbico por gramo de muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los análisis se realizaron por triplicado, se determinó la media y la desviación estándar, se llevó a cabo un análisis de varianza, ver Apéndice.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION



3.1 MUESTRA

Se trabajó con semilla de limón desengrasada de la variedad mexicana (*Citrus aurantifolia*), proveniente del estado de Michoacán. En la tabla 3 se muestran los resultados del análisis proximal. Se observa que los carbohidratos son el componente mayoritario con 50.16g/100g, seguidos de la proteína (32.85g/100g), las cenizas (9.06g/100g) y finalmente la grasa (7.93g/100g), estos datos sirven de referencia para conocer la concentración de los principales componentes de la semilla de limón desengrasada.

Tabla 3. Análisis proximal de la semilla de limón desengrasada (base seca g/100 g).

Muestra	Proteína	Grasa	Cenizas	* Carbohidratos
Semilla de limón desengrasada.	32.85 ± 0.15	7.93 ± 0.11	9.06 ± 0.05	50.16

* Carbohidratos (calculados por diferencia)

3.2 FRACCIÓN RICA EN FIBRA.

Después de someter la muestra al método físico de separación (tamizado), se obtienen las fracciones que componen a la semilla de limón desengrasada, se analiza la cantidad de proteína en cada una, teniendo como propósito, el de separar la mayor cantidad de proteína y así concentrar la fibra.

En la tabla 4 se muestran los resultados del análisis de proteína después del método físico de separación. Se observa que el porcentaje de proteína en las tres primeras fracciones es menor que en el resto de las mallas, además se puede observar una tendencia con forma va aumentando el número de malla.

En una muestra de 73.31g de semilla de limón desengrasada 16.03gramos son de proteína, por lo tanto, los carbohidratos, las cenizas y la grasa (remanente) se encuentran dentro de los 57.28g restantes.



Tabla 4. Análisis de proteína de las fracciones que componen a la semilla de limón desengrasada.

MALLA	Peso (g)	% Recuperación	% Proteína	Balance de proteína (g)
10	1.66	2.26	5.54 ± 1.1	0.09
20	8.61	11.74	6.39 ± 1.3	0.55
30	16.92	23.08	7.32 ± 1.7	1.23
40	12.08	16.47	13.57 ± 1.8	1.63
50	0.20	0.27	N.D	N.D
60	2.20	3.00	N.D	N.D
70	3.59	4.89	25.63 ± 2.2	0.92
80	0.21	0.28	N.D	N.D
100	27.83	37.96	41.75 ± 2.3	11.61
Total	73.31	99.95	—	16.03

N.D Significa que no se determino.

Se juntan las tres primeras fracciones con el fin de reunir la parte rica en fibra de la semilla desengrasada de limón. En la tabla 5 se observa el porcentaje de proteína final (6.87g/100g).

Tabla 5. Fracciones seleccionadas (porcentaje de proteína final).

MALLA	Peso (g)	% Proteína	Balance de proteína (g)
10	1.66	5.54 ± 1.1	0.09
20	8.61	6.39 ± 1.3	0.55
30	16.92	7.32 ± 1.7	1.23
Totales	27.19	$\frac{1.87 \times 100}{27.19} = \mathbf{6.87g/100g}$	1.87

A la fracción seleccionada, se le hizo un análisis composicional completo, para identificar y cuantificar, por métodos oficiales la presencia de carbohidratos y todos los demás compuestos presentes.



En la tabla 6 se muestran los resultados del análisis composicional de la fracción seleccionada, se comparan con la semilla desengrasada, con el fin de contrastar los resultados.

Cabe destacar que en la muestra desengrasada hay mayor cantidad de carbohidratos que de proteínas (ver tabla 3 y 6) y aunque este comportamiento se mantiene en la fracción seleccionada, al utilizar el método físico de separación se redujo considerablemente la cantidad de proteína, ayudando a enriquecer la cantidad de carbohidratos en 7 veces.

Tabla 6. Análisis composicional de la fracción seleccionada de la semilla de limón (base seca g/100 g)

Variedad	Proteína	Grasa	Cenizas	* Carbohidratos	Relación Proteína / carbohidratos
Semilla desengrasada	32.85 ± 0.15 ^a	7.93 ± 0.11 ^a	9.06 ± 0.05 ^a	50.16 ^a	0.65
Fracción Seleccionada	6.87 ± 0.34 ^b	9.30 ± 0.16 ^a	8.28 ± 0.10 ^a	75.51 ^b	0.091
					Relación 7.14

* Carbohidratos (calculados por diferencia)

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

3.3 ANALISIS DE LA FIBRA DIETETICA TOTAL

Debido a que la fibra dietética es parte de los carbohidratos, se decide determinar la cantidad presente en la muestra. El análisis de fibra dietética se determina a través de dos metodologías. La primera es la oficial de la AOAC, que da el valor de fibra dietética total (FDT), y la segunda es la metodología descrita por Mañas 1994, la cual proporciona valores independientes de la fibra dietética soluble e insoluble. Dentro de las dos metodologías se espera que no haya variaciones significativas entre resultados, debido a la composición de la semilla desengrasada (compuestos ligninocelulósicos), a la sensibilidad y eficiencia de las metodologías.



En la tabla 7 se muestran los resultados obtenidos en la determinación de fibra dietética. Con el fin de comparar, se colocan los valores de las dos metodologías empleadas (*AOAC y Mañas*).

A pesar de que la metodología de Mañas se diferencia por utilizar la mitad de los reactivos y la sustitución de la precipitación alcohólica por centrifugaciones y lavados, no existe diferencia significativa entre los métodos, como se esperaba. En donde si se observa diferencia, es entre las muestras; la fracción seleccionada tiene un aumento considerable de fibra dietética total, comparando con la muestra desengrasada.

Con los datos obtenidos en las determinaciones, se confirma que todos los carbohidratos calculados por diferencia en el análisis composicional (ver tabla 6) para ambas muestras, son de fibra dietética total.

Tabla 7. Contenido de fibra dietética de acuerdo a diferentes métodos (base seca g/100g).

MUESTRA	FDT	
	MÉTODO AOAC	MÉTODO MAÑAS
Semilla desengrasada	50.88 ± 2.24 ^{a, 1}	49.61 ± 1.3 ^{a, 1}
Fracción seleccionada	75.32 ± 1.22 ^{b, 1}	74.69 ± 2.0 ^{b, 1}

^a Significa que en una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

¹ Significa que dentro de una fila con número igual no existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

De aquí en adelante a la fracción seleccionada se le denominará como fracción rica en fibra (FRF).

3.4 ANALISIS DE LA FIBRA DIETETICA SOLUBLE E INSOLUBLE

En la siguiente parte de la investigación, se trabaja con los datos obtenidos con la metodología de Mañas, que separa las fracciones de fibra dietética solubles e insolubles en agua.

Los valores individuales que componen a la fibra dietética total dan una posible información fisiológica de ella (*Bach, 2001*).



El análisis de la fibra dietética soluble e insoluble está detallado en las tablas 8 y 9. Los resultados son promedio de las determinaciones realizadas. Con el fin de comparar se reportan los valores para la semilla desengrasada. En las dos muestras, se observa la concentración de los diferentes compuestos que conforman a la fibra dietética de la semilla de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), observándose también el porcentaje que representan dentro de la FDT.

Tabla 8. Composición de la FDS presente en la semilla de limón (método Mañas) (base seca g/100g).

Variedad	FDS		FDS Total	FDT
	AU	AN		
Semilla desengrasada	4.49 ± 0.43 ^a	1.31 ± 0.1 ^a	5.81 ^a	49.61 ^a
FRF	5.59 ± 0.33 ^a	3.90 ± 0.5 ^a	9.49 ^a	74.69 ^b

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

AU = ácidos urónicos

AN = azúcares neutros

FDT = calculada como la suma de los valores de AU, AN y LK en la FDS y FDI.

Tabla 9. Composición de la FDI presente en la semilla de limón (método Mañas) (base seca g/100g).

Variedad	FDI			FDI Total	FDT
	AU	AN	LK		
Semilla desengrasada	2.09 ± 0.5 ^a	6.53 ± .35 ^a	35.17 ± 0.3 ^a	43.80 ^a	49.61 ^a
FRF	4.27 ± 0.2 ^a	6.17 ± 1.2 ^a	54.7 ± 0.1 ^b	65.19 ^b	74.69 ^b

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

AU = ácidos urónicos

AN = azúcares neutros

LK = lignina de Klason

FDT = calculada como la suma de los valores de AU, AN y LK en la FDS y FDI.

La FRF posee una gran cantidad de fibra dietética total, la cual esta compuesta por la fracción soluble e insoluble. En el caso de la primera, se cuantifican pectinas, gomas, mucílagos y ciertos tipos de hemicelulosa solubles,



mientras que para la segunda, la constituyen la celulosa, lignina y hemicelulosa. En todas las determinaciones, la FRF reporta valores estadísticamente más altos que en la muestra de semilla desengrasada, siendo la lignina el componente mayoritario en ambos, lo cual contrasta con los azúcares neutros de la fracción soluble, que se encuentran en menor cantidad dentro de la fibra dietética total. La fracción insoluble para ambas muestras, es la que se encuentra en mayor proporción dentro de la fibra dietética total, esto se debe a la gran cantidad de compuestos ligninocelulosicos presentes en ella.

En la tabla 10 se observa la relación que existe entre fibra dietética insoluble y fibra dietética soluble dentro de la fibra dietética total. Con el fin de comparar se reportan los valores obtenidos para la semilla desengrasada.

En ambas muestras, se tiene baja cantidad de fibra dietética soluble y una gran proporción de fibra dietética insoluble, por lo que la relación FDI/FDS es alta, lo que significa que por si sola, la FD de la semilla de limón no tiene una función fisiológicamente óptima, como menciona Grigelmo 1999, quien indica que la relación debe estar en el intervalo de 1.0 – 2.3.

Tabla 10. Relación entre la fibra dietética insoluble y soluble de la Semilla de limón mexicano (base seca).

Variedad	FDS % en la muestra (AN + AU)	FDI % en la muestra (AN + AU + LK)	FDT	Relación (FDI/FDS)
Semilla desengrasada	5.81	43.80	49.61	7.5
FRF	9.49	65.19	74.69	6.8

AU = ácidos urónicos

AN = azúcares neutros

LK = lignina de Klason

FDT = calculada como la suma de los valores de AU, AN y LK en la FDS y FDI.

En la tabla 11. Con el propósito de efectuar una comparación, se incluyen datos de otras fuentes derivadas de cítricos. Se observa que la FDT de la fracción rica en fibra de la semilla de limón (74.69g/100g), tiene un valor cercano, al



reportado para la cáscara de limón mexicano (70.42g/100g), sin embargo, comparado con la muestra de semilla desengrasada (49.61g/100g), si hay diferencia significativa. Los datos de la FDS y FDI varían entre las fuentes comparadas, la FDS reporta valores más altos en la cáscara de limón mexicano y el limón persa que en la FRF de la semilla de limón y la semilla desengrasada. La FDI de la FRF de la semilla de limón posee un valor superior (65.19g/100g), a todas las fuentes reportadas en la tabla.

Tabla 11. Contenido de FD en algunos derivados de Cítricos
(base seca g/100g)

FUENTE DE FIBRA	FDS	FDI	FDT	Relación
* Cáscara de limón mexicano (Michoacán)	21.84	48.58	70.42	2.2
* Cáscara de limón Persa	20.28	46.43	66.71	2.3
Semilla desengrasada	5.81^a	43.80^a	49.61^a	7.5^a
FRF	9.49^b	65.19^b	74.69^b	6.8^b

Referencias:

* Ubando, 2003.

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

3.5 ANALISIS DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES.

En la producción de los alimentos comúnmente se utiliza a la fibra por sus propiedades funcionales. Dentro de las fibras solubles se emplean: goma xantana, carragenina, guar, derivados de celulosa e inulina. Por la parte de las fibras insolubles tenemos: al salvado de trigo, avena, maíz, cebada, manzana y cítricos. Ambas fracciones de fibra tienen beneficios tecnológicos. La FDI se utiliza en emulsiones cárnicas, pates y embutidos, aumentando el rendimiento de cocimiento y mejorando la textura, debido a su capacidad de retención de agua y capacidad de retención de grasa. De igual manera la FDI se usa en panadería (bizcochos y barras de cereal), sustituyendo parte de la harina o de la grasa, reduciendo el contenido calórico e incrementando el contenido de fibra, además ayuda a incrementar el volumen de las pastas y los pasteles. (*Thebaudin., 1997*)



3.5.1 Capacidad de retención de agua (CRA)

La tabla 12 muestra los valores obtenidos en la determinación de la capacidad de retención de agua, comparados con otras variedades de subproductos. Se observa que la fracción rica en fibra, presenta una CRA muy baja (2.3 gH₂O/gFD). Esto se debe a la celulosa, hemicelulosa y sobre todo a la lignina que es la más hidrofóbica de todos los componentes, debido a que son compuestos que captan poca agua y forman mezclas de baja viscosidad.

La FRF de la semilla de limón mexicano necesita estar acompañada de otras fuentes de fibra soluble, para reducir calorías o modificar la textura y viscosidad en alimentos.

Tabla 12. Capacidad de retención de agua de la FD de la semilla de limón mexicano.

Variedad	CRA (g H ₂ O / g FD)
FRF	2.3 ± 0.50^a
¹ FD cáscara de limón mexicano (Michoacán)	12.8 ± 0.54 ^b
* FD Manzana	6.3
* FD Pera	6.8
* FD Naranja	12.4
* FD Durazno	12.6
* FD Espárrago	11.2

Referencias:

* Grigelmo, 1999

¹ Ubando, 2003

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

3.5.2 Capacidad de retención de grasa (CRG)

La tabla 13 muestra los resultados obtenidos en la determinación de capacidad de retención de grasa. El valor reportado para la FRF de la semilla de limón es bajo; la calificación máxima de este ensayo según Abdul-Hamid 2000, es de 5 mL aceite/g FD, sin embargo se obtuvo un valor de 1.0 mL aceite/g FD. No se observa diferencia significativa con la FD de la naranja y la FD de la cáscara de limón mexicano. Las fibras con mayor capacidad para atrapar en su interior a las grasas son las viscosas, es decir, las solubles, como las ricas en pectinas, gomas y mucílagos. La FRF de la semilla de limón y las otras fuentes comparadas tienen baja concentración de compuestos solubles, por lo tanto, no hay compuestos que formen los geles que estabilizan la retención de la grasa en la fibra.



Tabla 13. Capacidad de retención de grasa de la FD de la semilla de limón mexicano.

Variedad	CRG (mL aceite / g FD)
* * FD de naranja	0.8 a 1.3 ^a
¹ FD cáscara de limón mexicano (Michoacán)	1.9 ± 0.18 ^a
FRF	1.0 ± 0.08 ^a

Referencias:

* * Grigelmo, 1999

¹ Ubando J. 2003

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

3.5.3 Hinchazón.

La absorción de agua se produce por fijación a la superficie de la fibra o por atrapamiento en el interior de la estructura macromolecular.

La tabla 14 muestra los resultados en la determinación de hinchazón. Se observa que el valor obtenido en la FRF (0.007mL/gFD), es muy bajo, en comparación con los valores reportados para otros subproductos de cítricos, como la cáscara de limón mexicano y limón persa. La fracción rica en fibra de la semilla de limón no tiene la capacidad de incrementar su volumen con el agua, debido a la gran cantidad de FDI en su composición, la parte soluble de la fibra es la que posee propiedades de formar geles, retener agua y aumentar la viscosidad (gomas y pectinas).

Tabla 14. Hinchazón de la FD de la semilla de limón mexicano.

Variedad	Hinchazón (mL/gFD)
FRF	0.007 ± 0.003 ^a
¹ FD cáscara de limón mexicano (Michoacán)	13.64 ± 0.52 ^b
¹ FD cáscara de limón Persa	11.34 ± 0.34

Referencias:

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

¹ Ubando, 2003



3.5.4 Índice de emulsificación.

En la tabla 15 se observa el porcentaje del índice de emulsificación en la FRF de la semilla de limón, con el fin de comparar se mencionan otros subproductos. Se puede ver que el valor de la FRF está por debajo del 50%, esto le concede la calificación de MALO, como describe en su metodología Robertson, 2000.

Los agentes emulsificantes se encuentran en los carbohidratos solubles, como las gomas, las pectinas y el mucílago, la fracción rica en fibra de la semilla de limón es pobre en la composición de estos carbohidratos, por tal motivo no hay una buena capacidad de emulsificar. La chia Jalisco es rica en FDS debido a esto se ve tan marcada la diferencia comparando con la FRF de la semilla de limón.

Tabla 15. Emulsificación en la fibra de la semilla de limón mexicano.

Variedad	Índice de Emulsificación (%)
FRF	15
*Salvado de arroz	14
**Chia Jalisco	100

Referencias:

* Abdul-Hamid y Luan, 2000

** Reyes, 2006

3.6 CONTENIDO DE POLIFENOLES

Del concentrado de polifenoles obtenido después de realizar la metodología completa descrita por Saura-Calixto 1998, se obtienen dos extractos: uno soluble en etanol y otro soluble en agua.

La tabla 16 muestra el contenido de polifenoles totales en la fracción rica en fibra de la semilla de limón, en comparación con otros subproductos. Existe diferencia significativa entre las muestras, la FRF posee los valores más bajos (3.23mg ácido tánico/gFD). En todas las muestras los extractos solubles en etanol tienen mayor contenido de polifenoles que los extractos solubles en agua.



Tabla 16. Contenido de Polifenoles totales en los extractos de FD de la semilla de limón mexicano (base seca).

VARIEDAD	Extractos solubles (mg ácido tánico/g FD)		Polifenoles Totales (mg ác. Tánico/g FD)	Polifenoles Totales (ppm)
	ETOH	H ₂ O		
FRF	2.10 ± 0.5 ^a	1.13 ± 0.35 ^a	3.23	3230 ^a
¹ FD cáscara de limón mexicano (Michoacán)	6.36 ± 0.28 ^b	1.64 ± 0.33 ^a	8.00	8000 ^b
¹ FD cáscara de limón Persa	16.37 ± 1.30 ^c	3.53 ± 0.21 ^a	19.9	19900 ^c

¹ Ubando, 2003

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

Cabe destacar que los polifenoles totales determinados de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu, no son una medida **absoluta de la cantidad de compuestos fenólicos**, ya que este método no es específico para fenoles, otros compuestos reductores como **azúcares o ácido ascórbico** pueden interferir como más adelante se demostrara. (Matthaus, 2002).

3.7 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La evaluación de la actividad antioxidante se hace a través de dos formas. La primera involucra radicales libres (DPPH° y ABTS⁺), en donde se mide la reducción que van teniendo, al estabilizarse con los compuestos. Ambos radicales poseen la misma estequiometría con los antioxidantes (2:1). Por otro lado se mide la capacidad de retardar la oxidación, retrasando la formación de productos de degradación oxidativa del ácido linoléico, métodos del blanqueo del β-caroteno y la Inhibición de la oxidación lipídica (liposomas).

En todas las evaluaciones se empleó un estándar de antioxidante, **Trolox** (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico), es un ácido carboxílico derivado del α-tocoferol, que se utiliza para comparar los resultados obtenidos de la actividad antioxidante, debido a que es un antioxidante de origen natural, económico, eficiente y no reacciona con ningún reactivo.



La concentración de los extractos de la FRF y del Trolox se ajustaron a 200ppm para todos los ensayos de la actividad antioxidante.

Las gráficas de las cinéticas que se muestran a lo largo de este capítulo, están elaboradas de acuerdo a los valores obtenidos de los extractos solubles en agua, que más adelante se describen, debido a que presentan mayor actividad.

3.7.1 Capacidad secuestrante sobre el radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH°).

La tabla 17 muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad secuestrante sobre el radical DPPH°. Se observa que no existe diferencia significativa entre muestras, sin embargo para este ensayo sí existe diferencia entre extractos, siendo mayor la capacidad secuestrante en los extractos solubles en etanol. Ambas muestras presentan porcentajes inferiores comparado con el Trolox que fue de 99.01%.

Tabla 17. Capacidad secuestrante sobre el radical DPPH°.

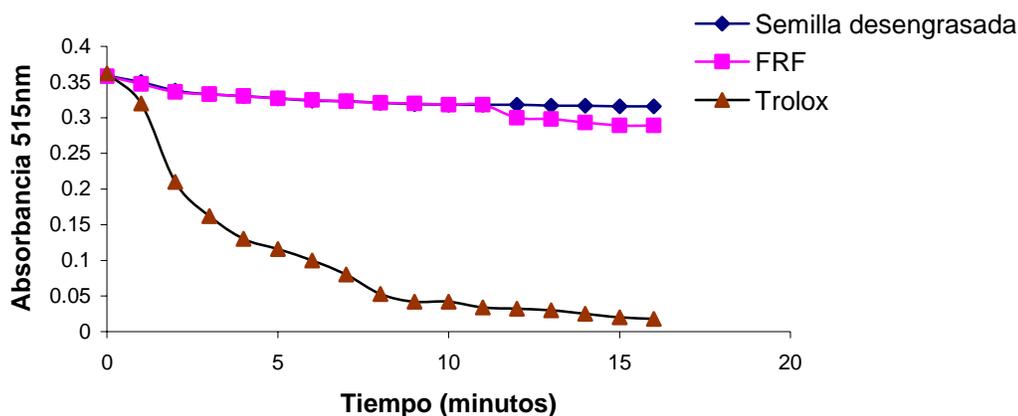
Muestra	% CS DPPH°	
	ETOH	H ₂ O
Semilla desengrasada	18.37 ± 1.37 ^a	10.87 ± 1.64 ^a
FRF	20.29 ± 0.38 ^a	14.9 ± 2.9 ^a
Trolox	99.01 ± 0.59	

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

En la gráfica 1 se observa la cinética de la capacidad secuestrante sobre el radical DPPH°. La fracción rica en fibra de la semilla de limón y la muestra desengrasada, no tienen gran capacidad para donar hidrógenos, ya que no decrece la absorbancia de forma rápida -como se observa en la gráfica con una línea casi constante- podría confundirse con una mala actividad antioxidante. El porcentaje de la actividad secuestrante de la FRF y la semilla desengrasada, varían dependiendo de la naturaleza de los compuestos que poseen la actividad, este ensayo evalúa principalmente a los antioxidantes de origen hidrofóbicos, además las reacciones de DPPH° se llevan a cabo en ausencia de su forma



reducida (DPPH-H), lo que hace más difícil la donación de hidrógeno y la estabilización con los compuestos que poseen los extractos. El Trolox reduce al radical DPPH° de una forma drástica, al llegar al estado estacionario en 10 minutos.



Gráfica 1. Efecto secuestrante sobre el radical DPPH°.

3.7.2 Capacidad secuestrante sobre el radical 2,2-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS⁺).

La tabla 18 muestra los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad secuestrante sobre el radical ABTS⁺. Para las muestras, no existe diferencia significativa entre los extractos solubles en agua y en etanol, los porcentajes de la capacidad secuestrante son altos para todos, y muy parecidos al valor del Trolox.

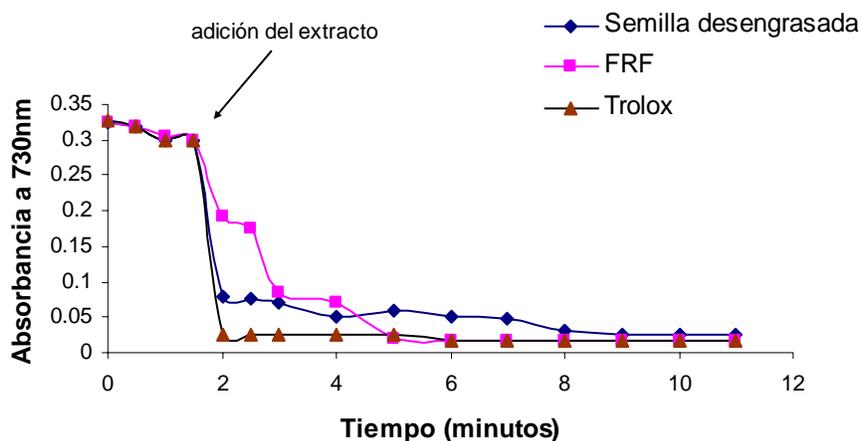
Tabla 18. Capacidad secuestrante sobre el radical ABTS⁺.

Muestra	% CS ABTS ⁺	
	ETOH	H ₂ O
Semilla desengrasada	89.76 ± 0.02 ^a	90.71 ± 0.8 ^a
FRF	92.66 ± 0.02 ^a	94.47 ± 0.95 ^a
Trolox	99.69 ± 0.1	

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$



La grafica 2 muestra la cinética para los extractos de la fracción rica en fibra de la semilla de limón. Todos los extractos reducen de manera drástica la absorbancia y no se aprecia diferencia entre las respuestas a este ensayo; los porcentajes de la capacidad secuestrante son muy semejantes con respecto al Trolox. Este ensayo evalúa principalmente a los compuestos hidrofílicos, debido a que es un radical catiónico. Los extractos de la FRF y la muestra desengrasada son más afines al radical ABTS⁺ y se estabilizan mejor, este radical se encuentra siempre presente en su forma reducida, debido a esto las reacciones son más rápidas, claro que también depende de la composición de los extractos.



Gráfica 2. Efecto secuestrante sobre el radical ABTS⁺

3.7.3 Actividad antioxidante determinada por el blanqueo del β -Caroteno.

La tabla 19 muestra los porcentajes de la actividad antioxidante de la FRF, medidos por el blanqueo del β -caroteno. No existe diferencia significativa, entre los extractos solubles en agua y en etanol, el Trolox, presenta una actividad ligeramente mayor a todas las muestras. La función de los antioxidantes, que se encuentran en los extractos, es retardar la formación de productos de degradación oxidativa del ácido linoléico, evitando la formación de compuestos que blanquean al β -caroteno. Deben cumplir con estabilizar al oxígeno presente



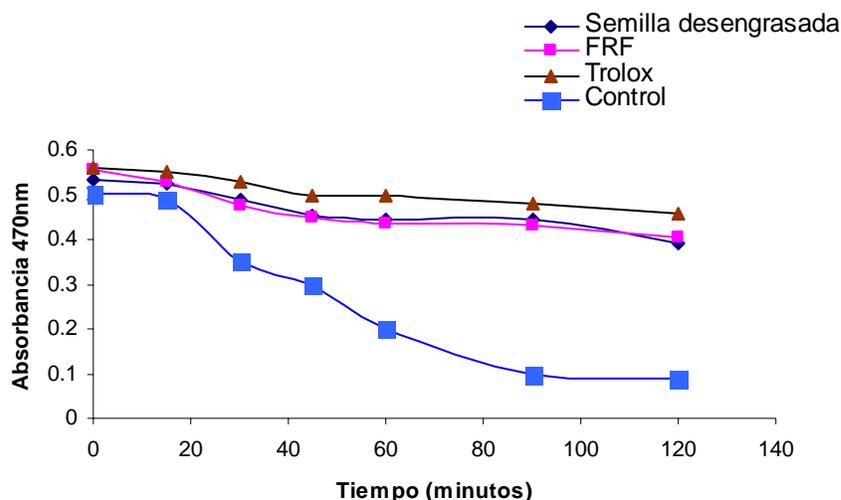
en el medio y además estabilizar a los radicales libres ya formados, los cuales son los que propician la decoloración del β -caroteno.

Tabla 19. Actividad antioxidante determinada por el blanqueo del β -Caroteno

Muestra	% AA β - CAROTENO	
	ETOH	H ₂ O
Semilla desengrasada	71.99 \pm 0.62 ^a	72.83 \pm 0.05 ^a
FRF	74.15 \pm 0.30 ^a	75.96 \pm 0.56 ^a
Trolox	87.97 \pm 0.56	

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

En la grafica 3 se muestra la cinética de la actividad antioxidante por el blanqueo del β caroteno. El porcentaje de actividad antioxidante se ve disminuido en comparación del método del ABTS⁺, tanto para los extractos como para el Trolox. Comparado con un control, el cual no inhibe la formación de productos de degradación oxidativa del ácido linoléico -debido a que en su estructura no hay compuestos que estabilice los radicales libres-, se observa que los extractos de la FRF y la semilla de limón, sí inhiben el blanqueo del β -caroteno, impiden que el ácido linoléico genere productos de degradación (radicales libres). Sin embargo por otra parte, el ácido linoléico se tiene que oxidar, debido a que en el medio de reacción se adiciona oxígeno, para poder corroborar si los extractos están llevando a cabo su trabajo de estabilizar a los radicales libres que se generan por el oxígeno añadido, evitando la oxidación del β -caroteno y propiciando su decoloración. Esto se observa en la gráfica con las líneas casi constantes de los extractos y el Trolox, en donde no decrece la absorbancia de una forma drástica.



Gráfica 3. Actividad antioxidante determinada por el blanqueo del β -Caroteno

3.7.4 Inhibición de la oxidación lipídica (liposomas).

En la tabla 20 se observan los valores de la inhibición de la oxidación lipídica. El porcentaje de la actividad antioxidante en este ensayo es muy parecido al del blanqueo del β -caroteno, lo que nos indica que los extractos tienen capacidad de estabilizar al oxígeno, no en el mismo porcentaje que el Trolox, pero sí presentan una actividad por encima del 50%.

Los extractos de la FRF estabilizan al oxígeno del medio de reacción, al evitar que los liposomas se oxiden, debido a que son micelas altamente oxidables que poseen una doble capa lipídica.

Tabla 20. Actividad antioxidante determinada por la inhibición de la oxidación lipídica.

Muestra	% AA LIPOSOMAS	
	ETOH	H ₂ O
Semilla desengrasada	73.56 \pm 0.23 ^a	76.52 \pm 0.48 ^a
FRF	75.32 \pm 1.5 ^a	80.71 \pm 0.94 ^a
Trolox	91.89 \pm 0.10	

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$



En la tabla 21 se observan los resultados de todas las evaluaciones realizadas para la determinación de la actividad antioxidante en la FRF de la semilla de limón.

Tabla 21. Actividad antioxidante en la FRF de la semilla de limón desengrasada.

	ABTS ⁺		DPPH [°]		β-CAROTENO		LIPOSOMAS	
	ETOH	H ₂ O	ETOH	H ₂ O	ETOH	H ₂ O	ETOH	H ₂ O
FRF	92.66±0.02	94.47± 0.9	20.29±0.3	14.9± 2.9	74.15±0.30	75.96± 0.5	75.32±1.5	80.71±0.9
Trolox	99.69 ± 0.1		99.01 ± 0.59		87.97 ± 0.56		91.89 ± 0.10	

Las pruebas realizadas (ABTS⁺, β-caroteno y Liposomas), muestran evidencia, de que existe actividad antioxidante presente en la FRF de la semilla de limón, es decir inhibe la oxidación causada por radicales libres ya que retarda el comienzo y disminuye la velocidad de oxidación. Comparado con la actividad antioxidante del Trolox, que es relativamente mas baja; sin embargo la FRF de la semilla de limón presenta una actividad antioxidante por arriba del 50%.

Los sustratos lipídicos que forman micelas (ácido linoléico), incrementan la actividad de los antioxidantes hidrofílicos y polares. Los resultados de estas pruebas demuestran una mayor concentración de polifenoles polares en los extractos de la fracción rica en fibra.

Como se comprobó que si existe actividad antioxidante en los extractos de la FRF de la semilla de limón, se procedió a identificar el perfil y la cantidad de estos compuestos, para conocer sus características individuales y sus propiedades dentro de la FRF de la semilla de limón.



3.8 Identificación de polifenoles totales por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).

El contenido de polifenoles no es el único factor que determina la capacidad antioxidante. Existen otros compuestos dentro de la FD como las vitaminas y los minerales que poseen actividad antioxidante. (Sanchez Moreno, 1999).

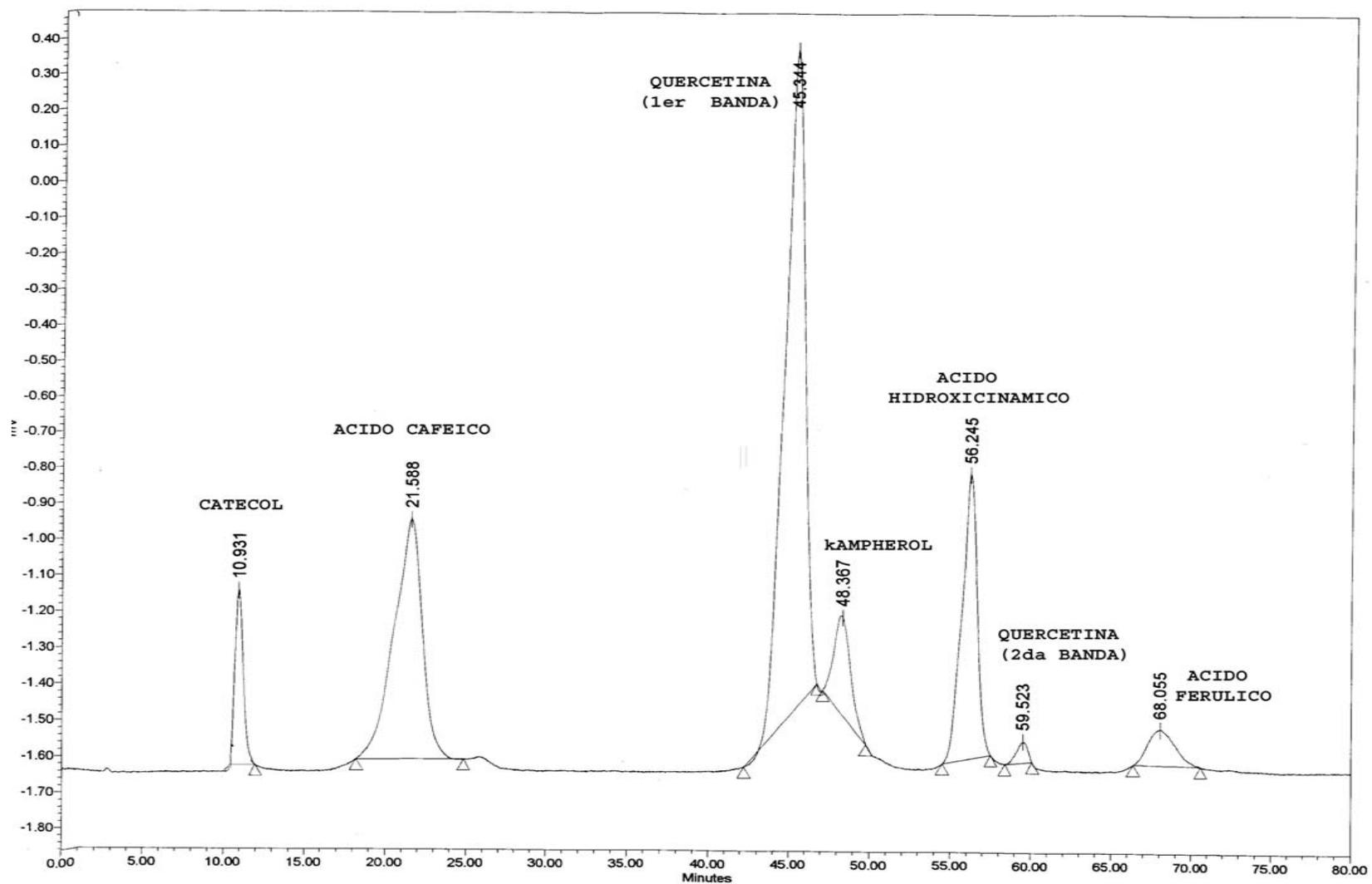
Se evalúa el perfil de antioxidantes a través del análisis de HPLC, el tipo de polifenoles presentes define la capacidad antioxidante de los extractos. La composición está influenciada por el tipo de fruta, la variedad y el procedimiento usado en la preparación de la muestra y los métodos empleados para la cuantificación de polifenoles.

En el Cromatograma 1 se muestran las señales de los estándares de polifenoles utilizados, así como el tiempo de retención de cada uno de ellos. En la tabla inferior se mencionan sus nombres por orden de aparición.

Tabla 22. Estándares de antioxidantes.

Nombre y posición de cada señal	Tiempo de retención (minutos)
1 CATECOL	10.931
2 ÁCIDO CAFEICO	21.588
3 QUERCETINA (1° BANDA)	45.344
4 KAMPHEROL	48.367
5 ÁCIDO HIDROXICINAMICO	56.245
6 QUERCETINA (2° BANDA)	59.523
7 ÁCIDO FERULICO	68.055

Una vez identificadas cada una de las señales de los polifenoles, se procedió a inyectar los extractos de la fracción rica en fibra de la semilla de limón, bajo las mismas condiciones cromatográficas, con el fin de identificar alguno.



Cromatograma 1. Estándares de Antioxidantes.



El cromatograma del perfil de los antioxidantes en la FRF, no se muestra, ya que no se encuentran presentes los polifenoles de referencia utilizados, en él se ve una línea constante sin ninguna de las señales características de cada estándar. En la literatura se menciona que existen flavonoides glucosilados presentes en el limón estos son: la Hesperidina y la Diosmina, como lo indican Bocco et al, 1998 y Larrauri, 1996.

En el cromatograma 3 se muestran los resultados obtenidos en la identificación de flavonoides glucosilados presentes en el limón. En la tabla inferior se mencionan sus nombres y el tiempo de retención de cada uno.

Tabla 23. Estándares de flavonoides glucosilados.

Nombre de Flavonoide glucosilado	Tiempo de retención (minutos)
Hesperidina	4.082
Diosmina	6.443

Una vez identificadas cada una de las señales de los flavonoides glucosilados (Hesperidina y Diosmina), se procedió a inyectar los extractos de la FRF de la semilla de limón, bajo las mismas condiciones cromatograficas, con el propósito de identificar alguno de ellos. En el cromatograma 4 se identifican las señales presentes de los flavonoides glucosilados Hesperidina y Diosmina en la fracción rica en fibra de la semilla de limón. Para conocer sus concentraciones se utilizaron las siguientes ecuaciones de recta.

Hesperidina

$$Y = 0.0781x - 0.0241$$

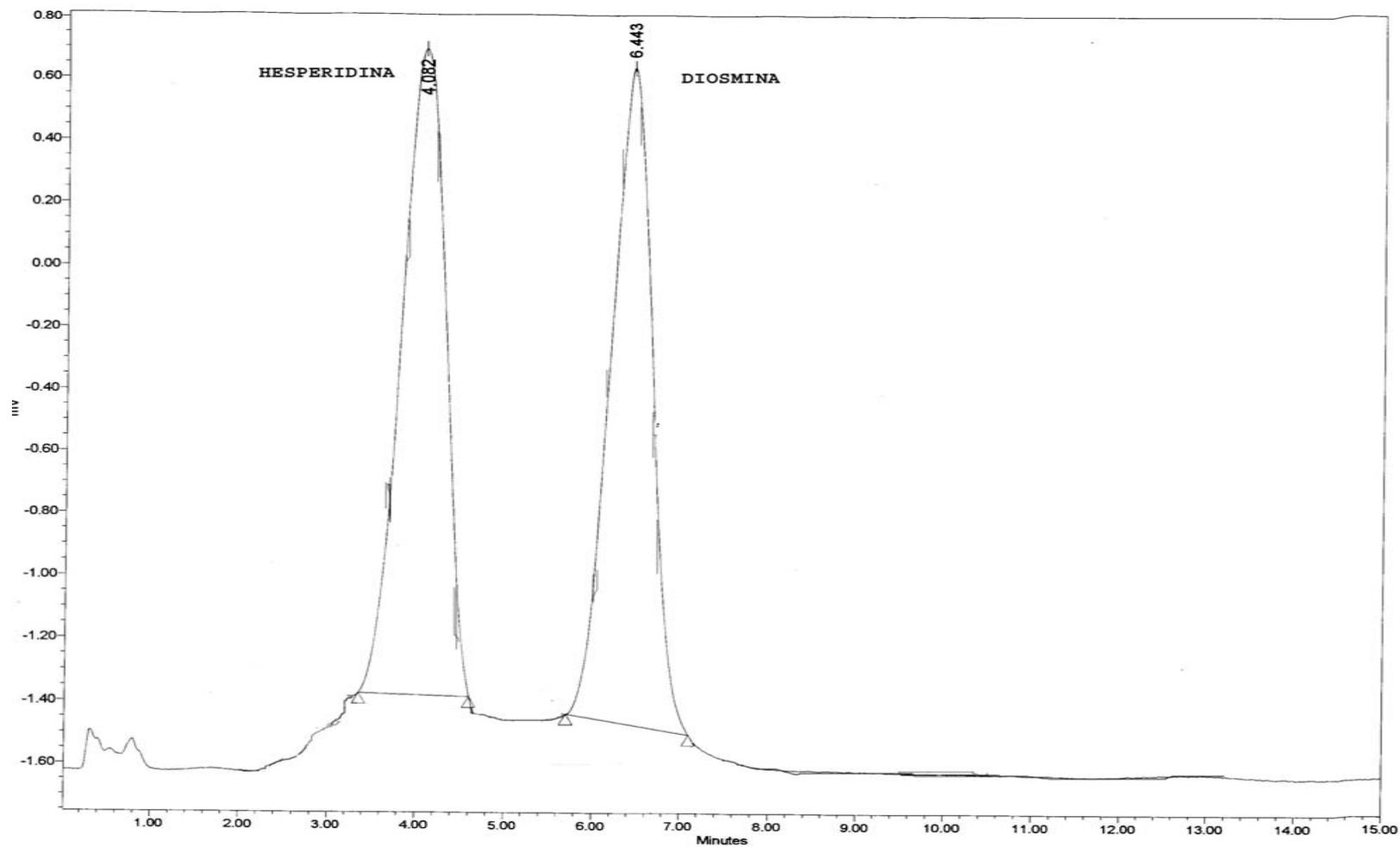
$$R^2 = 0.9998$$

Diosmina

$$Y = 0.2133x + 0.0004$$

$$R^2 = 0.9951$$

Las diferentes señales captadas en el cromatograma 4 son causadas por los disolventes utilizados, sin embargo existe una señal con tiempo de retención de 3.673 minutos que no ha sido identificada.



Cromatograma 3. Estándar de Diosmina y Hesperidina



3.8.1 Cuantificación de flavonoides glucosilados (Hesperidina y diosmina).

La tabla 24 muestra la concentración de Hesperidina y Diosmina presentes en la FRF de la semilla de limón. Se anexan otras fuentes de investigaciones con el propósito de comparar. Se observa la baja concentración de Hesperidina y Diosmina dentro de la FRF de la semilla de limón, debido a que la cubierta de lignina y celulosa de la semilla no permite que se almacenen los flavonoides glucosilados en ella, además es una parte del fruto que no se encuentra expuesta al oxígeno del medio ambiente y esto hace que no tenga la cantidad necesaria para ayudar a combatir la oxidación del fruto.

Tabla 24. Concentración de Hesperidina y Diosmina en la FRF de la semilla de limón mexicano.

Variedad	Hesperidina (mg/g)	Diosmina (mg/g)
* Cáscara de Limón mexicano (Michoacán)	2.86	0.041
* Cáscara Limón Persa	2.62	0.146
* Jugo de Limón mexicano (Michoacán)	0.1301	0.0078
* Jugo de Limón Persa	0.0487	0.0097
FRF	0.0209	0.00759

Referencia:

* Rodríguez, 2003.

Comparando la cantidad de polifenoles totales calculados por el método Folin-Ciocalteu (3.23mg ácido tánico/gFD), con la cantidad de flavonoides glucosilados totales obtenidos por HPLC (0.02851mg/gFD), se observa que no coinciden los valores obtenidos hasta el momento. Ver tabla 25.

Tabla 25. Cantidad de polifenoles y Flavonoides glucosilados en la FRF.

METODOLOGÍA	CONCENTRACIÓN
Polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu)	3.23mg ácido tánico/gFD ^a
Flavonoides glucosilados (Hesperidina + Diosmina)	0.028mg/gFD ^b

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

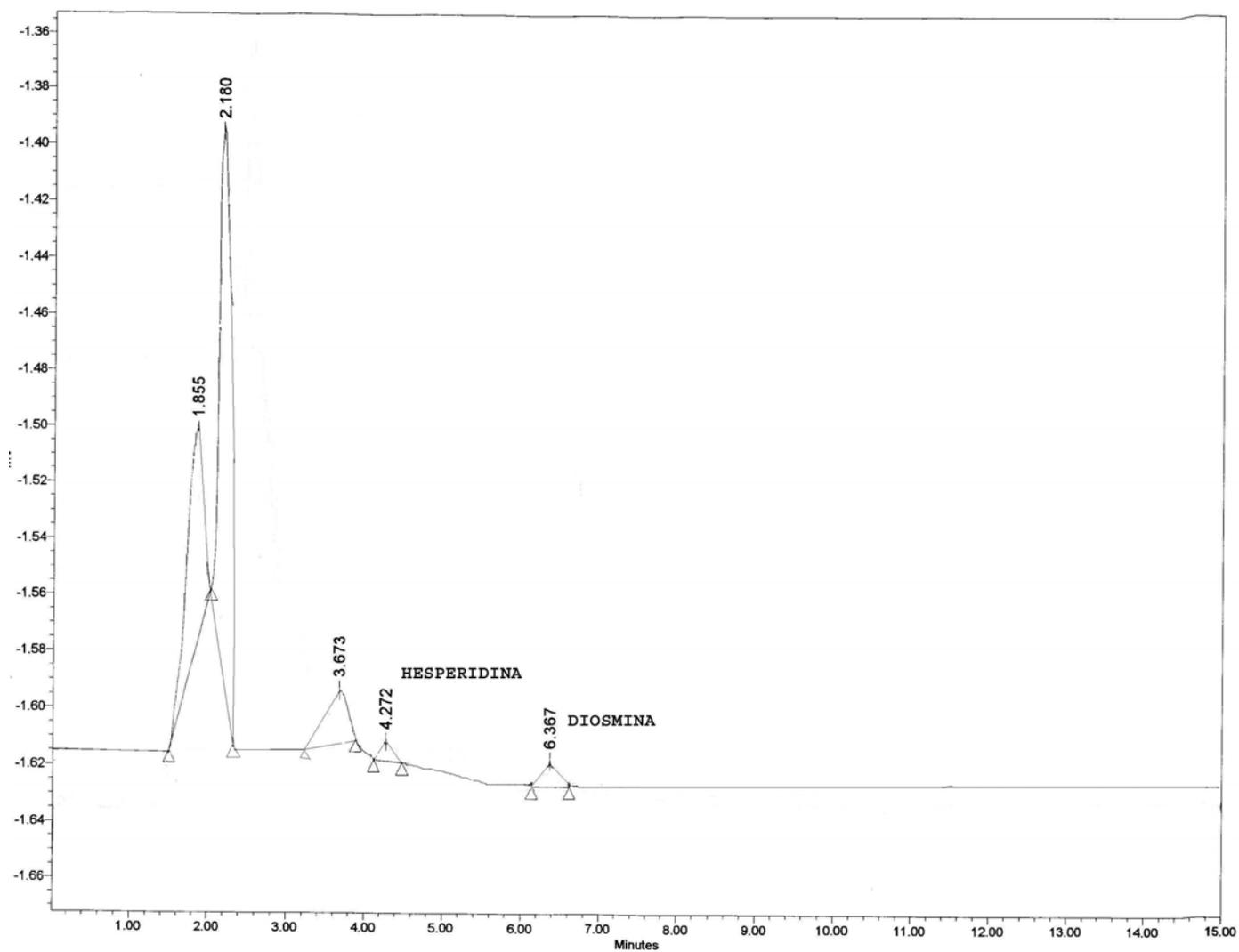


Con base en la metodología de la cuantificación de polifenoles totales, se encontró que el ácido ascórbico, reacciona rápidamente con el reactivo de Folin-Ciocalteu y que su presencia debe ser considerada. Vernon, 1986 menciona que el procedimiento podría usarse para determinar al ácido ascórbico antes de cualquier determinación de fenoles totales, en donde su valor se restaría al total de los resultados obtenidos. Esto suele pasar con los compuestos fácilmente oxidables.

La información obtenida hasta el momento, requiere de una determinación de ácido ascórbico, para verificar si se cuantificó por el método de Folin-Ciocalteu, como menciona el autor.

El método de Folin-Ciocalteu es conveniente, simple y requiere sólo equipo común. Ha producido una gran cantidad de datos comparables bajo las condiciones apropiadas del ensayo, sin embargo es variable por los grupos que reaccionan con la molécula así como los tipos de fenoles y sustratos oxidables encontrados en la naturaleza. La expresión de los resultados como un solo número es arbitrario, porque la reacción es independiente, cuantitativa y predecible, el análisis de una mezcla de fenoles puede ser recalculada usando algunos otros estándares para estar seguros de los resultados que se obtienen.

El ensayo de Folin-Ciocalteu mide todos los compuestos rápidamente oxidables bajo las condiciones de reacción y permite que ciertas sustancias también puedan reaccionar no necesariamente fenoles (**por ejemplo, las proteínas y el ácido ascórbico**). La reacción de componentes en una mezcla es posible determinarse solo por otros medios y calcular su contribución, al contenido total de fenoles por el reactivo de Folin (Vernon y Orthofer, 1986)



Cromatograma 4. Fracción rica en fibra de semilla de limón mexicano.



3.9 CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO EN LA SEMILLA DE LIMÓN MEXICANO.

El ácido ascórbico es un polialcohol, en el cual el grupo hidroxilo unido al átomo de carbono etilénico tiene carácter ácido ($p_k = 4.1$), tiene dos grupos enólicos, además un agente oxidante puede producir su oxidación y se produce el ácido dehidroascórbico, el cual por la acción de un agente reductor puede volver a recuperar los átomos de hidrógeno perdidos y restaurar su actividad biológica, se encuentra principalmente en frutas y verduras. El primer producto de la oxidación de ácido ascórbico es el ácido dehidroascórbico, el cual no se descubre por los ensayos de ácido ascórbico usuales pero si cuando se encuentra en su forma enólica, ya que también puede reaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Al respecto se han obtenido valores reportados en la literatura de la presencia del ácido ascórbico en un rango máximo de 45 mg ácido galico/g muestra.

La tabla 26 muestra los resultados obtenidos en la determinación de ácido ascórbico. Se comparan los datos de los polifenoles totales obtenidos por el método de Folin-Ciocalteu, así como los resultados obtenidos en la cuantificación de flavonoides glucosilados. Se observa que el valor reportado para el ácido ascórbico es muy semejante al valor obtenido en la cuantificación de polifenoles totales. El método de Folin está cuantificando al ácido ascórbico como lo mencionan Vernon y Orthofer, 1986.

Tabla 26. Cuantificación de ácido ascórbico en la FRF de la semilla de limón.

METODOLOGÍA	CONCENTRACIÓN
Polifenoles totales (Método de Folin-Ciocalteu)	3.23mg ácido tánico/gFD ^a
Ácido ascórbico (Método oficial AOAC)	3.018mg ácido ascórbico/gFD ^a
Flavonoides glucosilados (HPLC)	0.028mg/gFD ^b

^a Significa que dentro de una columna con letras diferentes existe diferencia significativa a $p \leq 0.05$

CONCLUSIONES



- ✓ *Se obtuvo una fracción rica en fibra dietética total en una concentración de 74.69g/100g, con actividad antioxidante a partir de semillas desengrasadas de limón mexicano.*
- ✓ *Se establecieron las condiciones para la obtención del concentrado de fibra a través de la tamización; que es un método físico de separación.*
- ✓ *Se caracterizó a la fibra dietética soluble (9.49g/100g) y la fibra dietética insoluble 65.19 g/100g.*
- ✓ *La relación entre FDI/FDS es de 6.8, fisiológicamente no se encuentra en el intervalo (1.0-2.3) de una FD con propiedades óptimas.*
- ✓ *La baja concentración de fibra dietética soluble y la gran proporción de lignina presente en la FRF hace que las propiedades funcionales (CRA, CRG, Hinchazón y Emulsificación) estén por debajo de los valores óptimos requeridos para una FD con propiedades tecnológicas.*
- ✓ *Se conoció la concentración de compuestos fenólicos presentes en la fracción rica en fibra de la semilla de limón mexicano (3.23mg ácido Tánico/gFD).*
- ✓ *Los Flavonoides glucosilados (0.028mg/gFD) no representan el total de los compuestos fenólicos calculados por el método de Folin- Ciocalteau.*
- ✓ *El método de Folin-Ciocalteau cuantificó al ácido ascórbico (3.018mg ácido ascórbico/gFD) presente en la FRF, lo cual se comprobó al medir dicho ácido.*
- ✓ *Se evaluó la actividad antioxidante en la FRF, para conocer la eficiencia que tienen los extractos al inhibir la auto-oxidación, y aunque presenta una buena actividad, es menor comparada con la actividad del Trolox.*
- ✓ *La actividad antioxidante que posee la FRF está dada por el ácido ascórbico y no por los polifenoles.*



BIBLIOGRAFIA.

A.O.A.C. (1995) Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. Cunniff, 15^a ed. Vol. II, Estados Unidos.

Abdul-Hamid, A y Luan, Y. S (2000) Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chem.* 68, 15-19)

Arnao, M. B., Cano, A. (2001) The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chem.* 73, 239-244.

Azizah Abdul-Hamid, Yu Siew Luan. (2000). Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chem.* 68, 15-19.

Bach Knudsen, K. E. (2001). The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 90, 3-20.

Baduí, D. S. (1996). Química de los alimentos. *Alhambra Mexicana, 3^a Edic., México D.F* pp 120-130.

Bitter, T. Muir, H.M. (1962). A modified uronic acid carbazole reaction. *Analytical Biochemistry*, 4, 330-334.

Bocco, A., Cuevelier, A., Richard, H. (1998). Antioxidant activity and Phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *J Agric Food Chem.* 46, 2123-2129.

Bloor. 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.

Borroto, B., Rodriguez, J. (1995). Composición química de la fibra dietética obtenida a partir de hollejos de cítricos durante su cosecha. *Alimentaria*, septiembre, 63-65.

Braverman, J.B, (1997). Introducción a la Bioquímica de los alimentos. *Edit Manual Moderno*, 100,101 162-166, USA.



Brian A. Fox, (1992). *Ciencia de los Alimentos Nutrición y Salud. 3ª Edic. Limusa, Barcelona España.*

Del Rio, J.A., Fuster, M. D., Gomez, Porras, I., Garcia-Lidón. (2003). Citrus lemon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. *Food Chem.* 60, 35-42.

Fenema, O. R. (1995) *Química de los alimentos. Acribia S.A Zaragoza 2ª Edic., España,* 85, 223-229, 965.

Fibra-Salud (2004) “fibra dietética” <http://www.fibra-salud.com/Obra/5.htm> Consultada en Agosto del 2004.

Gorinstein, S., Martín-Belloso, O., Park, y Haruenkit, R., Lojek, A Caspi, A., Libman. (2001). Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits. *Food Chem.*, 74, 309-315.

Grigelmo, N., Martín, (1999a). Characterization of dietary fiber from orange juice extraction. *Food Research International*, 31 (5), 355-361.

Grigelmo, N., Martín, (1999b). Comparison of Dietary Fibre from by products of processing fruits and seeds and from cereal. *Lebens-Wiss. U-Tecnol.* 32, 503-508.

Hasler, C.M., Huston, R. L y Caudill, E. M., (1998). Two Decades of Nutrition Labeling Dekror, M. *Nutrition International Inc, Dayton, N.J. USA.*

Hemeroteca digital UNAM (2005). www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES/ipn/arte_ciencia_cultura/jul-ago97/fibdie/sec_1.h Consultada Junio del 2005

Infoagro, “El cultivo del Limón” (2003). www.Infoagro.com Consultada Septiembre del 2004

Larrauri, J.A (1996). “High dietary fibre powders from orange and lime peels: associated polyphenols and antioxidant capacity”. *Food Research International.* 29(8), 757-762.

Larrauri, J.A (1999). New approaches in the preparation of high dietary fibre powders from fruit by-products. *Food Science y Technology*, 10, 3-8.



Mañas, E., Bravo, L y Saura-Calixto. (1994). Sources of error in dietary fibre analysis. *Food Chem.* 50, 331-342.

Matthaus, B (2002). Antioxidant activity of obtained from residues of different oilseeds, *J. Agric Food Chem.* 50(12), 3444-3452.

Mollá, E., Eseban, R. M., Valiente. (1994). Contenido de fibra alimentaria en los subproductos procedentes de la industria cervecera y de la industria de cítricos. *Alimentaria, Abril*, 61-64.

Nagendran Balasundram (2005). Phenolic compounds in plant and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 1-11.

Periago, M. J. Ros., López. G. (1992). Componentes de la fibra dietética y sus efectos fisiológicos. *Revista española de ciencia y tecnología de los alimentos.* 33, 229-245.

Reyes Caudillo, Erika (2006). La Chía (Salvia Hispánica): fuente de fibra dietética total con propiedades funcionales y antioxidantes. *Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.*

Robards, K., Prenzel, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P y Glover, W. (1999) Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* 66, 401-436.

Robertson, J.A., Monredon, F.D., Dyssele. (2000). Hydration properties of dietary fibre and resistant starch : a *European Collaborative Study.* IWT, 33, 73-79.

Roch, D., Bergmann, M., Knorr, D (2003). Structure-antioxidant efficiency relationships of phenolic compounds and their contribution to the antioxidant activity of dea buckthorn juice. *J. Agric Food Chem.* 51, 4233-4239.

Rodríguez Barba, C. E (2003). Desarrollo de un esquema de extracción de flavonoides glucosilados a partir de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.*

Saura-Calixto, F (1998). Antioxidant dietary fiber product: a new concept and a potential food ingredient, *J Agric Food Chem.* 46, 4303-4306.



MARTHA ELIZET HERRERA HERNÁNDEZ

Sanchez-Moreno, Jose A Larrauri. (1999) Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. *Food Research International* (32) 407-412

SIAP, (Sistema Integral de Información Agroalimentaria y Pesquera). Análisis agropecuario del limón, abril del 2001. Consultada Junio del 2004.

www.siea.sagarpa.gob.mx/InfOmer/analisis/anlimon.html

Siddhuraju, P., Mohan, P.S y Becker, K. (2002). Studies on the antioxidant activity of Indian Laburnum (cassia fistula L.): a preliminary assessment of crude extract. *Food Chem.* 79, 61-67.

Skoog, Douglas (1997). Fundamentos de química analítica. 3^a Edic. Barcelona España. 640-645.

Taga Silvia M, E.E. Miller and D.E. Pratt (1984). Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants. *Departament of Foods and Nutriron, Purdue University, West Lafayette.* 928-931.

Thebaduin (1997). Dietary fibres: Nutritional and Technological interest. *Food Science and Technology.* 8, 41-47.

Ubando Rivera Joanna. (2003). Influencia en el estado de madurez en las propiedades fisicoquímicas y funcionales de la fibra dietética del limón. *Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.*

Vasconcellos, J. A. (1998). Alimentos funcionales conceptos y beneficios para la Salud. Departamento de Ciencias de Alimentos y Nutrición, *Universidad Chapman, Orange, California, USA.*

Vernon L. Singleton; Rudolf Orthofer. (1986). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. Polyphenols and Flavonoids. *J. Agric Food Chem.* 14,152-178



APENDICE
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ANÁLISIS DE VARIANZA

ANÁLISIS COMPOSICIONAL DE LA SEMILLA DE LIMÓN MEXICANO

* Proteína

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	S _{Ctr}	0.73	1	0.73	365	0.05	225	F _c >F _t
Dentro de tratamientos	S _{CE}	0.01	4	0.002	Si hay diferencia			
Total	S _{ctotal}	0.74	5					

* Carbohidratos

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	S _{Ctr}	110.65	1	110.6	1164.7	0.05	225	F _c >F _t
Dentro de tratamientos	S _{CE}	0.19	2	0.095	Si hay diferencia			
Total	S _{ctotal}	110.84	3					

*Grasa

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	S _{Ctr}	888.1	1	888.1	0.091	0.05	225	F _c <F _t
Dentro de tratamientos	S _{CE}	38683.4	4	9670.8	No hay diferencia			
Total	S _{ctotal}	47564.4	5					

* Cenizas

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	S _{Ctr}	1.11	1	1.11	148	0.05	225	F _c <F _t
Dentro de tratamientos	S _{CE}	0.03	4	0.007	No hay diferencia			
Total	S _{ctotal}	1.14	5					



Comparación entre metodologías de fibra dietética total (AOAC vs Mañas) para Fracción rica en Fibra.

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	0.735	1	0.735	133.74	0.05	200	Fc<Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.011	2	0.005	No hay diferencia			
Total	Sctotal	0.746	3					

Muestra entera frente a FRF con el método AOAC para FDT

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	4.795	1	4.795	1598.3	0.05	200	Fc>Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.006	2	0.003	Si hay diferencia			
Total	Sctotal	4.801	3					

Muestra entera frente a FRF con el método de Mañas para FD

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	382.98	1	382.98	153194	0.05	200	Fc>Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.005	2	0.0025	Si hay diferencia			
Total	Sctotal	382.99	3					

Propiedades funcionales

- Capacidad de retención de grasa (CRG)

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	944.9	1	944.9	0	0.05	200	Fc<Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0	4	0	No hay diferencia			
Total	Sctotal	944.9	5					

- Capacidad de retención de agua (CRA)

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	5.58	1	5.58	2232	0.05	200	Fc>Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.01	4	0.0025	Si hay diferencia			
Total	Sctotal	5.59	5					



* Hinchazón

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	188.01	1	188.01	3760	0.05	200	Fc>Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.01	2	0.005	Si hay diferencia			
Total	Sctotal	188.02	3					

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES (FOLIN-CIOCALTEAU)

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	321.9	2	160.6	193494	0.05	19.33	Fc>Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.005	6	0.00083	Si hay diferencia			
Total	Sctotal	521.99	8					

* Extractos solubles en AGUA

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	9.470	2	4.735	15.78	0.05	19.33	Fc<Ft
Dentro de tratamientos	SCE	1.8	6	0.3	No hay diferencia			
Total	Sctotal	9.472	8					

• Extractos solubles en ETOH

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	2.81	2	2.81	1124	0.05	19.33	Fc>Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.01	6	0.002	Si hay diferencia			
Total	Sctotal	2.82	8					

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

* Efecto secuestrante sobre el radical DPPH

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	24.6	1	24.6	196.8	0.05	200	Fc<Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.25	2	0.125	No hay diferencia			
Total	Sctotal	24.61	3					



* Efecto secuestrante sobre el radical ABTS

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	21.5	1	21.5	71.66	0.05	200	Fc<Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.6	2	0.015				No hay diferencia
Total	Sctotal	22.1	3					

* Blanqueo de β caroteno

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	14.19	1	14.19	56.76	0.05	200	Fc<Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.5	2	0.25				No hay diferencia
Total	Sctotal	14.69	3					

* Liposomas

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	26.3	1	26.3	131.5	0.05	200	Fc<Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.4	2	0.2				No hay diferencia
Total	Sctotal	26.7	3					

Método Folin-Ciocalteu vs determinación de ácido ascórbico

Fuente de Variación	FV	SC	g.l	M.C	Fc	α	F tablas	Criterio
Entre tratamientos	SCTr	0.068	1	0.068	6.8	0.05	200	Fc<Ft
Dentro de tratamientos	SCE	0.02	2	0.01				No hay diferencia
Total	Sctotal	0.088	3					



ANEXO METODOLOGIAS.

FIBRA DIETÉTICA TOTAL MÉTODO DE LA AOAC.

Se corre un blanco a lo largo de toda la determinación. Se pesa por duplicado 1g de muestra (exactitud de 0.1mg) en matraces de 400ml (el peso entre muestras no debe diferir en 20mg). Se le adiciona a cada matras 50ml de buffer de fosfatos (pH 6, 0.08M); se mide el pH y ajusta a $\text{pH} \pm 0.2$, se le adiciona a cada matras 0.1ml de la solución de amilosa; se cubren los matraces con aluminio, se llevan a un baño de agua a ebullición por 15 minutos, agitando los matraces cada 5 minutos (verificar que cada matras mantenga 100°C los 15 minutos); transcurrido este tiempo enfriar a temperatura ambiente. Una vez frío se ajusta el pH a 7.5 ± 0.2 adicionando 10ml de NaOH 0.275N y 5mg de proteasa (disolver 50mg/1ml buffer de fosfatos, adicional 0.1ml de la solución a cada matras), se cubren los matraces con aluminio y se colocan en un baño de agua a 60°C por 30 minutos, con agitación continua cada 5 minutos; se enfrían a temperatura ambiente y se adicionan 10ml de HCl 0.325N y se ajusta el pH entre 4.0-4.6, se adiciona 1ml de amilogucosidasa, se lleva a un baño de 60°C por 30 minutos con agitación continua cada 5 minutos. Una vez terminada la incubación se adicionan 280ml de etanol 95% precalentado a 60°C (medir el volumen antes de calentar) y se deja en reposo una hora.

Para esta determinación se hacen correcciones de cenizas y proteína; por lo tanto se trabaja con un crisol a peso constante a menos de 400°C, se monta un equipo de filtración al vacío. Se humedece y redistribuye la celita con etanol al 78%, se mantiene la succión y cuantitativamente se transfiere el precipitado de la digestión enzimática. Se lava el residuo con 3 porciones de 20ml de etanol al 78%; con 2 porciones de 10ml de etanol al 95% y finalmente con 2 porciones de 10ml de acetona (si se forma una goma mover con espátula para mejorar la filtración). Se deja secar el crisol conteniendo el residuo a 70°C, se enfría en el desecador y se pesa; se resta el peso del crisol con la celita para conocer el peso del residuo. Se analiza proteína a una de los crisoles y cenizas al otro. Los cálculos se realizan de la siguiente forma:

$$\text{Blanco} = \text{Residuo} - \text{Proteína} - \text{Ceniza.}$$

$$\% \text{ FDT} = [(\text{Residuo} - \text{Proteína} - \text{Cenizas} - \text{Blanco}) / \text{peso muestra (g)}] \times 100$$



FIBRA DIETÉTICA TOTAL MÉTODO DE MAÑAS.

Las fracciones de fibra dietética se obtuvieron mediante una modificación del método de la AOAC propuesta por Mañas (Mañas et al., 1994). Los reactivos y condiciones fueron las mismas que en el método de la AOAC pero solo se ocupa la mitad de los reactivos requeridos. El experimento se llevo a cabo en un tubo de centrífuga de 40ml. La FDI se obtuvo centrifugando la muestra (Centrífuga Damon /IEC Division, Modelo 856), colectando los sobrenadantes y los lavados con una pipeta pasteur. En la determinación de FDS la diálisis reemplazo a la precipitación alcohólica. El sobrenadante junto con el agua de los lavados obtenidos en la centrifugación de la FDI se dializo por 48 horas con recambios continuos de agua (cada 2horas). Con la diálisis se eliminan los compuestos solubles de bajo peso molecular (carbohidratos y aminoácidos); se utilizaron bolsas para diálisis Sigma (12,000-15,000 PM). Transcurrido este tiempo el dializado se homogenizó y se determino el contenido de ácidos urónicos (Bitter et al., 1962) y azucares neutros (Fenol-Sulfúrico).

Para determinar la FDI los residuos obtenidos después de la centrifugación fueron sometidos a una hidrólisis secuencial con ácido sulfúrico 12M (1hora. 35°C) y 1M (2 horas, 100°C). En los hidrolizados se cuantificaron por espectrofotometría los ácidos urónicos (método de Bitter) y los azucares neutros (método de fenol-sulfúrico). El material residual de la hidrólisis se seca (105°C toda la noche; estufa de vacío, marca National Appliance Co., Modelo 5831) y posteriormente se pesa y cuantifica como lignina de Klason.

CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE AGUA.

Se pesa 1g de muestra y se coloca en un tubo de centrífuga, se le adicionan 30 mL de agua destilada, se agita, se deja en reposo por 18horas, después de este tiempo se centrifuga a 3000rpm por 20 minutos (Centrífuga Damon/ EC División, Modelo 856), se decanta el sobrenadante y se pesa el residuo hidratado, posteriormente el residuo se seca y se pesa de nuevo.



CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE GRASA.

En un tubo de centrifuga se colocan 4 gramos de muestra y 20mL de aceite de maíz, la mezcla se agita por 30 segundos cada 5 minutos; durante 30 minutos, transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugan a 1600rpm por 25 minutos (Centrífuga Damon/ EC División, Modelo 856), el aceite libre se decanta y el aceite absorbido se determina por diferencia.

CAPACIDAD DE HINCHAZÓN.

Se coloca de 100-200 mg de fibra en una probeta, se le adicionan 10 mL de agua destilada, y se mezcla suavemente, se deja en reposo por 18 horas a temperatura ambiente, después de este tiempo, sin retirar el agua, se registra el volumen ocupado por la fibra.

ÍNDICE DE EMULSIFICACIÓN.

Se prepara una solución al 7% de fibra, y se le adicionan 20 mL de aceite de maíz, homogenizando por 5 minutos a velocidad intermedia, se toma una alícuota de volumen conocida y se centrifuga 3000rpm por 20 minutos (Centrífuga Damon/ EC División, Modelo 856), el porcentaje de la mezcla total que queda emulsificado, se expresa como índice de estabilidad, y se evalúa de la siguiente manera:

Bueno = igual o mayor al 94%

Malo = igual o menor al 50%

METODO DE EXTRACCIÓN DE POLIFENOLES

500mg de muestra se extraen con 40ml de metanol/agua (50:50 v/v), a temperatura ambiente durante una hora, se centrifuga a 2500rpm por 15 minutos (Centrífuga Damon/ EC División, Modelo 856), se guarda el sobrenadante, posteriormente el precipitado se extrae con 40ml de acetona/agua (70:30 v/v), a temperatura ambiente por una hora, se centrifuga a 2500rpm por 15 minutos (Centrífuga Damon/ EC Division, Modelo 856).

Los sobrenadantes de ambas extracciones se combinan y se concentran a 40°C en un rotavapor (BUCHI modelo R-205 V800), y se disuelven en 10ml de



MARTHA ELIZET HERRERA HERNÁNDEZ

Etanol absoluto (REASOL, reactivo analítico), la fracción que no se solubiliza en etanol, se filtra y se disuelve en 10ml agua destilada, obteniéndose así dos fracciones del extracto.

En ambas fracciones se determina el contenido de polifenoles totales.

CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES.

Se toman 2 mL de la solución del extracto y se llevan a un volumen de 5 mL con HCl al 0.3%, se adiciona una alícuota de 100 μ L de la solución resultante en 2 mL de Na_2CO_3 al 2%, después de 2 minutos se adicionan 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido en agua 1:1), transcurridos 30 minutos se mide la absorbancia a 750nm usando un espectrofotómetro (Perkin-Elmer, Modelo C618-0432). Los resultados se hacen usando ácido tánico como estándar; se expresan en mg de ácido tánico por gramo de muestra.

CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL DPPH.

Se corre un blanco con agua en todo el ensayo. Se adiciona a una celda de cuarzo 2 mL de una solución metabólica de DPPH 3.6×10^{-5} M, sin sacar del espectro se agrega 50 μ L del extracto, y se mide el decremento en la absorbancia a 515nm (de morado a amarillo), se registra continuamente cada minuto durante 16 minutos a temperatura ambiente, con el fin de obtener la cinética de la reacción.

El porcentaje de la capacidad secuestrante sobre el radical DPPH se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{CS}_{\text{DPPH}} = \frac{\text{Absorbancia } t = 0 - \text{Absorbancia } t = \text{final}}{\text{Absorbancia } t = 0} \times 100$$



CAPACIDAD SECUESTRANTE SOBRE EL RADICAL ABTS.

Se genera una reacción enzimática con la peroxidasa. En una celda se colocan 0.5 mL de H₂O₂ 15 μM, 0.5 mL de ABTS 2 mM, y 0.5 mL de peroxidasa (1mg/mL en buffer de fosfato de sodio 50 mM pH 7.5), se mezclan y se registra la absorbancia a 730nm, cada minuto durante tres minutos, transcurrido este tiempo se adicionan 0.5 mL del extracto de la mezcla de reacción, y se registra el decremento en absorbancia hasta que el cambio sea mínimo.

La capacidad secuestrante sobre el radical ABTS se calcula con la siguiente formula:

$$\% \text{CS}_{\text{ABTS}} = \frac{\text{Absorbancia } t = 0 - \text{Absorbancia } t = \text{final}}{\text{Absorbancia } t = 0} \times 100$$

BLANQUEO DEL β-CAROTENO.

Se satura agua desionizada con aire por 15 minutos y se prepara una solución de β-caroteno (20mg/10mL) en diclorometano, se adiciona 1 mL de esta solución en un frasco oscuro, el cual contiene previamente 20mg de ácido linoléico y 200mg de Tween 80. El diclorometano se evapora a 40°C, posteriormente se adicionan 50mL de agua destilada aireada para preparar la emulsión. Por otro lado, en un tubo de ensayo agregar 0.2 mL del extracto de etanol (200ppm), se le adicionan 5 mL de la mezcla anterior e inmediatamente se lee la absorbancia a 470nm (Perkin-Elmer, Modelo C618-0432), (tiempo = 0), la mezcla se mantiene en baño María a 50°C durante 2 horas, se sigue midiendo la absorbancia para obtener la cinética de la reacción cada 15 minutos. Se registran todos los puntos tomados y el ultimo es igual a la absorbancia (tiempo = final), de manera paralela se corre un ensayo-control, adicionando 0.2 mL de etanol a la solución de β-caroteno con agua aireada. Como blanco se coloca 0.2ml de etanol en 5 mL de agua destilada.

El porcentaje de actividad antioxidante (%AA) se expresa como:

$$\% \text{AA} = \frac{\text{Absorbancia extracto } t = \text{final} - \text{Absorbancia control } t = \text{final}}{\text{Absorbancia control } t = 0 - \text{Absorbancia extracto } t = \text{final}} \times 100$$



INHIBICION DE LA OXIDACIÓN LIPIDICA.

La preparación de los liposomas (emulsión), se hace mezclando, 58 mL de buffer de fosfato de sodio (20 mM pH=7.4), y 580 mg de lecitina de soya, sonicando (biblock scientific vibra cell) por 30 minutos, bajo una atmósfera de Nitrógeno, en un baño de agua fría. La determinación de la peroxidación se mide de la siguiente manera:

Los extractos (0.5 mL) se mezclan con los liposomas (2 mL), y se le agregan los siguientes reactivos: 0.1 mL, de FeCl₃ 25 mM, 0.1 mL, de H₂O₂ 25 mM, 0.1 mL de ácido ascórbico 25 mM y 1.2 mL de buffer de fosfato 0.2M (, pH=7.4). La mezcla de reacción se incuba a 37°C por cuatro horas, al final de la incubación se adiciona 1 mL de BHA (20mg/ml) en MeOH para detener la reacción de la oxidación. La oxidación de los liposomas se determina midiendo las sustancias ácido-reativas del tiobarbiturico (TBARS), a la mezcla de reacción se le adiciona un mililitro de TBA al 1% y un mililitro de HCl al 10%, se calienta en un baño de agua a 100°C por 30 minutos, después la mezcla se enfría en un baño de hielo por 15 minutos, se adicionan 5 mL de diclorometano y la mezcla se centrifuga 300rpm por 20 minutos (Centrífuga Damon/ EC Division, Modelo 856), se mide el sobrenadante a 532nm en un espectrofotómetro (Perkin-Elmer, Modelo C618-0432) (*Siddhuraju et al, 2002*).

El porcentaje de la Inhibición de TBARS se calcula con la siguiente formula:

$$\frac{\text{Abs control} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs control} - \text{Abs blanco}} \times 100$$

IDENTIFICACIÓN DE POLIFENOLES (HPLC).

Condiciones:

Tiempo de corrida de 80 minutos,

Columna Phenomenex C₁₈ 4.6 x 250 milímetros con 5µm de diámetro,

Detector UV/Vis λ 280nm.

Concentración 1mg/mL para los estándares.

Fase móvil: Acetonitrilo – Buffer de acetato de sodio 2 mM en ácido acético.

Flujo de 1mL/minuto.

Volumen de inyección de 20µl.



IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES GLUCOSILADOS (HPLC).

Condiciones:

Tiempo de corrida de 15 minutos.

Columna Phenomenex C₁₈ 4.6 x 250 milímetros con 5µm de diámetro.

Detector UV/Vis λ 325nm.

Concentración 1mg/mL para los estándares.

Fase móvil: MeOH-H₃PO₄ 0.01M pH 7 (50:50) Isocratico.

Flujo de 1mL/minuto.

Volumen de inyección de 20µl.

CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES GLUCOSILADOS.

Hesperidina

$$Y = 0.0781x - 0.0241$$

$$R^2 = 0.9998$$

Diosmina

$$Y = 0.2133x + 0.0004$$

$$R^2 = 0.9951$$

CUANTIFICACIÓN DE ÁCIDO ASCORBICO.

Se pesa de 5 a 10 gramos de muestra, inmediatamente homogenizar con 50ml de ácido acético al 5%, con el fin de inactivar a la ascorbato oxidasa endógena. Se lleva a 100ml con agua destilada, se deja que sedimente el material insoluble. Para eliminar la mayor cantidad de material insoluble del sobrenadante, se filtra. Se obtienen 2 alícuotas de 10ml para hacer la valoración de vitamina C. se coloca cada alícuota en un matras Erlenmeyer; titulando con una solución valorada de diclorofenol-indofenol, hasta que persista el color rosado. Los resultados se expresan en mg de ácido ascórbico por gramo de muestra.