



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA DETERMINACIÓN DE LA

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE

EXTRACTOS DE CÁSCARA RESIDUAL DE TORONJA

MEXICANA (*CITRUS PARADISI*)

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

LILIANA VIGUERAS ADAME



Ciudad Universitaria, CDMX

AÑO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: IRENE SARA AUDELO MENDEZ**

VOCAL: **Profesor: LINO JOEL REYES TREJO**

SECRETARIO: **Profesor: ITZEL ALONSO VENEGAS**

1er. SUPLENTE: **Profesor: MIGUEL ANGEL HERNANDEZ VALDEPEÑA**

2° SUPLENTE: **Profesor: SANDRA GUZMAN AGUIRRE**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**División de estudios de posgrado de la Facultad de Química, UNAM. Edificio B,
Laboratorio L-208, Departamento de Química Orgánica.**

**Universidad Autónoma de Chapingo, Laboratorio de Productos Naturales,
Departamento de Preparatorio Agrícola.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Lino Joel Reyes Trejo

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. Benito Reyes Trejo

SUSTENTANTE:

Liliana Viguera Adame

Índice

1	Introducción.....	1
2	Objetivos	2
2.1	Objetivo general.....	2
2.2	Objetivos particulares	2
3	Hipótesis.....	2
4	Marco teórico	3
4.1	Residuos.....	3
4.1.1	Clasificación de residuos.....	3
4.1.2	Residuos de alimentos	5
4.1.2.1	Valorización de residuos alimentarios	5
4.1.3	Cítricos y valorización de sus residuos.....	7
4.1.4	Toronja	9
4.2	Antioxidantes.....	10
4.2.1	Antioxidantes sintéticos	12
4.2.2	Antioxidantes naturales	13
4.2.3	Antioxidantes en toronja	15
4.3	Técnicas de extracción.....	16
4.3.1	Técnicas convencionales de extracción.....	16
4.3.2	Técnicas modernas de extracción	17
4.4	Métodos para la cuantificación de polifenoles.....	21
4.5	Métodos para la evaluación de actividad antioxidante	22
4.6	Evaluación de la estabilidad oxidativa	24
4.6.1	Índice de acidez.....	24
4.6.2	Índice de Yodo.....	25
4.6.3	Índice de peróxido.....	25

5	Metodología	26
5.1	Recolección limpieza y secado del material vegetal	28
5.2	Molienda y determinación de la humedad	28
5.3	Extracción del aceite de la harina de cáscara de toronja.....	29
5.3.1	Maceración.	29
5.3.2	Extracción mediante el método de Soxhlet.....	30
5.3.3	Extracción mediante hidrodestilación asistida por ultrasonido.....	30
5.4	Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu.....	32
5.5	Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH.....	34
5.6	Prueba de estabilidad oxidativa.....	36
5.7	Análisis estadístico.	37
6	Resultados y análisis.....	38
6.1	Humedad de la cáscara molida	38
6.2	Rendimientos obtenidos de los extractos de cáscara de toronja	38
6.3	Cuantificación de los polifenoles obtenidos por el método Folin-Ciocalteu.....	41
6.4	Evaluación de la actividad antioxidante	43
6.5	Estabilidad oxidativa del aceite.....	45
6.6	Índice de Acidez.....	45
6.7	Índice de Peróxidos	47
6.8	Índice de Yodo	49
7	Conclusiones	51
8	Bibliografía	52

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de residuos según su tipo de origen.....	3
Figura 2. Residuos sólidos urbanos.....	5
Figura 3. Componentes presentes en los desperdicios de la cadena de suministro de alimentos y sus usos en aplicaciones comunes de consumo	6
Figura 4. Anatomía general de un cítrico	7
Figura 5. Vista de la cadena de suministro de cítricos y la valorización de sus residuos.....	8
Figura 6. (<i>Citrus paradisi</i>) Toronja	10
Figura 7. Acción de los antioxidantes como secuestradores de radicales. AH: Antioxidante.....	11
Figura 8. Estructuras químicas de (a) BHA, (b) BHT y (c) TBHQ.....	13
Figura 9. Estructuras químicas de (a) naringina, (b) hesperidina y (c) neohesperidina.....	14
Figura 10. Estructura de carotenoides presentes en los cítricos (a) beta-caroteno (b) licopeno (c) luteína.	15
Figura 11. Extracción asistida por microondas	18
Figura 12. Extracción asistida por ultrasonido	20
Figura 13. Reacción entre antioxidante y el reactivo DPPH (Mohammadpour, et al. 2012)	24
Figura 14. Molienda de la cáscara	28
Figura 15. Maceración	29
Figura 16. Equipo Soxhlet.....	30
Figura 17. Equipo de sonicación	31
Figura 18. Equipo de extracción por hidrodestilación	32
Figura 20. Microplaca con prueba de fenoles totales	34
Figura 21. Microplaca con prueba de actividad antioxidante	35
Figura 22. Muestras de aceite	36

Índice de graficas

Gráfica 1. Rendimiento de los extractos de metanol de la cáscara de toronja (<i>Citrus paradisi</i>), empleando las técnicas de Soxhlet y maceración.	39
Gráfica 2. Rendimiento de los extractos de cáscara de toronja (<i>Citrus paradisi</i>) asistida por sonicación a diferentes tiempos, empleando metanol como disolvente.	40
Gráfica 3. Polifenoles totales en los extractos de cáscara de toronja (<i>Citrus paradisi</i>), empleando diferentes métodos de extracción: Soxhlet, maceración y hidrodestilación con sonicación.	42
Gráfica 4. Actividad antioxidante presente en los extractos de cáscara de toronja residual (<i>Citrus paradisi</i>), empleando diferentes técnicas de extracción.	44
Gráfica 5. Índice de acidez de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva, aceite de oliva adicionado con 150 ppm de extracto de cáscara de toronja y aceite de toronja adicionado con 200 ppm de BHT a 55°C por 21 días.	46
Gráfica 6. Índice de peróxidos de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva, aceite de oliva adicionado con 150 ppm de extracto de cáscara toronja y aceite de oliva con 200 ppm de BHT a 55°C por 21 días.	48
Gráfica 7. Índice de yodo de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva, aceite de oliva adicionado con 150 ppm de extracto de cáscara toronja y aceite de oliva con 200 ppm de BHT a 55°C por 21 días.	49

Índice de tabla

Tabla 1. Polifenoles totales presentes en los extractos de cáscara de toronja.	41
Tabla 2. Actividad antioxidante de los extractos de cáscara de toronja.	43
Tabla 3. Índice de acidez en aceite de oliva con extracto de cáscara de toronja, BHT y control, almacenados bajo condiciones aceleradas 55°C por 21 días.	47
Tabla 4. Índice de peróxidos en aceite de oliva con extracto de cáscara de toronja, BHT y control, almacenados bajo condiciones aceleradas 55°C por 21 días.	48
Tabla 5. Índice de yodo en aceite de oliva con extracto de cáscara de toronja, BHT y control, almacenados bajo condiciones aceleradas 55°C por 21 días.	50

1 Introducción

La producción de desperdicios de alimentos cubre todo el ciclo de vida de los mismos; desde la agricultura hasta la industria, fabricación y procesamiento, venta minorista y consumo doméstico. Es necesario integrar los residuos que se generan a un proceso de aprovechamiento, empleándolos en cadenas económicas para valorizarlos y beneficiar tanto a la población como a nuestro entorno. Su transformación a través de prácticas de reúso favorece la reducción del impacto ambiental. Algunos ejemplos de valorización de residuos de alimentos son: el empleo de aceite de cocina usado, semillas de cítricos para la obtención de biodiesel. El empleo de semillas de sandía, tejocote, melón para la obtención de antioxidantes. Los cítricos son frutos de alto consumo en México y uno de los principales productos de exportación. Se estima que los desechos industriales de cítricos constituyen más 40 millones de toneladas en todo el mundo, y la cantidad de residuos obtenidos del fruto representa el 50% de la masa total. Éste desecho es rico en azúcares, fibras, ácidos orgánicos, aminoácidos y proteínas, minerales, aceites, lípidos y grandes cantidades de flavonoides y vitaminas. El procesamiento de los cítricos genera grandes cantidades aguas residuales y residuos sólidos principalmente cáscaras, membranas y semillas. Varios estudios referidos a especies del género *Citrus* han indicado que semillas, cáscara y pulpa en general son fuente importante de antioxidantes. En el caso particular de la toronja (*Citrus paradisi*) se ha reportado una producción anual de aproximadamente 390 mil toneladas de este fruto a nivel nacional. En la industria alimentaria, se transforma en jugos naturales y concentrados. La cáscara de la toronja es un residuo que es poco aprovechado en México, su contenido de aceite podría ser utilizado por sus propiedades antioxidantes en la industria alimentaria. Hasta donde se sabe, aún no se han efectuado estudios sobre los antioxidantes en la cáscara de toronja mexicana residual. El presente trabajo tiene como objetivo principal; extraer, cuantificar y evaluar la actividad antioxidante de los fenoles presentes en la cáscara de desecho de toronja mexicana (*Citrus paradisi*), lo anterior con el propósito de poder incorporar el extracto obtenido y usarlo como antioxidante en un aceite comestible.

2 Objetivos

2.1 Objetivo general

Extraer, cuantificar y evaluar la actividad antioxidante de los fenoles presentes en la cáscara de desecho de toronja mexicana (*Citrus paradisi*), lo anterior con el propósito de poder incorporar el extracto obtenido y usarlo como antioxidante en un aceite comestible.

2.2 Objetivos particulares

- Definir el método de extracción con mayor rendimiento (Soxhlet, maceración o hidrodestilación con pretratamiento de ultrasonido)

- Determinar que extracto presenta mayor cantidad de polifenoles y actividad antioxidante, empleando los métodos de Folin-Ciocalteu y DPPH respectivamente

- Evaluar la actividad oxidativa del extracto con mayor actividad antioxidante, a través de una muestra de aceite comercial y compararla con la de una antioxidante sintético de uso común.

3 Hipótesis

El extracto de la cáscara residual de toronja (*Citrus paradisi*) puede ser una alternativa a los antioxidantes artificiales

4 Marco teórico

4.1 Residuos

La Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) define los residuos como “material o producto cuyo propietario o poseedor desecha y que se encuentra en estado sólido, semisólido, es un líquido o gas contenido en recipientes o depósitos, y que puede ser susceptible de ser valorizado o requiere sujetarse a tratamiento o disposición final” (LGPGIR, 2018).

La generación de residuos es uno de los problemas ambientales más graves, es necesario reintegrar los residuos que se generan a procesos ambientales y cadenas económicas para valorizarlos y beneficiar tanto a la población como a nuestro entorno, para favorecer la reducción del impacto ambiental que provoca la generación de residuos y promover el desarrollo sostenible. (Sotelo & Benitez, 2013)

4.1.1 Clasificación de residuos

De acuerdo con la LGPGIR los residuos pueden clasificarse como: residuos de manejo especial, residuos incompatibles, residuos peligrosos y residuos sólidos urbanos (Figura 1). (LGPGIR, 2018)



Figura 1. Clasificación de residuos según su tipo de origen

Residuos de Manejo Especial: Son aquellos generados en los procesos productivos, que no reúnen las características para ser considerados como peligrosos o como residuos sólidos urbanos, o que son producidos por grandes generadores de residuos sólidos urbanos.

Residuos Incompatibles: Aquellos que al entrar en contacto o al ser mezclados con agua u otros materiales o residuos, reaccionan produciendo calor, presión, fuego, partículas, gases o vapores dañinos.

Residuos Peligrosos: Son aquellos que posean alguna de las características de corrosividad, reactividad, explosividad, toxicidad, inflamabilidad, o que contengan agentes infecciosos que les confieran peligrosidad, así como envases, recipientes, embalajes .

Residuos Sólidos Urbanos: los generados en las casas habitación, que resultan de la eliminación de los materiales que utilizan en sus actividades domésticas, de los productos que consumen y de sus envases, embalajes o empaques; los residuos que provienen de cualquier otra actividad dentro de establecimientos o en la vía pública que genere residuos con características domiciliarias, y los resultantes de la limpieza de las vías y lugares públicos, siempre que no sean considerados por esta ley como residuos de otra índole (Figura 2).

En términos generales los RSU coincide con el de basura doméstica y comercial usual (esto es, que no sea de manejo especial o de tipo peligroso), es uno de los fenómenos que más impacto tiene sobre el medio ambiente y sus recursos. Al hacer la disposición final de los RSU, se hace una afectación al medio ambiente. Esto puede implicar, entre otras situaciones, graves problemas en materia de salud pública, utilización de espacios y recursos, además de mayor contaminación ambiental, por mencionar algunas. (Carrasco E., Rodriguez S. 2015)



Figura 2. Residuos sólidos urbanos

4.1.2 Residuos de alimentos

El desperdicio de alimentos se puede definir como los "productos finales de varias industrias de procesamiento de alimentos que no han sido reciclados o utilizados para otros fines. Son los flujos no derivados de productos de materias primas cuyo valor económico es menor que el costo de recolección y recuperación para su reutilización; por lo tanto descartados como residuos " (Lin et al. 2013). La industria de procesamiento y fabricación de alimentos produce desechos, pérdidas y desperdicio de alimentos en toda la fase de producción debido a razones tales como: procesamiento de materias primas (extracción o separación de la porción nutricional de los restos), daños durante el transporte o sistemas de transporte no apropiados, problemas durante el almacenamiento, pérdidas durante el procesamiento o contaminación, embalaje inadecuado. (Giroto et al., 2015; Baiano, 2014; Mirabella et al., 2014)

4.1.2.1 Valorización de residuos alimentarios

La valorización de los residuos, que se ha definido como el proceso de convertir éstos en productos más útiles. Los desechos alimentarios son valiosos recursos

biológicos que se pueden utilizar para obtener sustrato para la producción fermentativa de metabolitos de interés, para la generación de bioenergéticos, suplemento alimenticio para animales, etc. (Saval, 2012) Se pueden tener en cuenta varias razones para desarrollar prácticas avanzadas de valorización de residuos. (Garcia et al., 2019) Éstos contienen cantidades significativas de carbohidratos, proteínas, ácidos grasos que podrían recuperarse, concentrarse y reutilizarse en alimentos funcionales, aditivos, o materia prima para producción de biodiesel (Xiong et al., 2019). Algunos ejemplos como lo ilustra la Figura 3, donde se emplea la extracción asistida por microondas para la extracción de pectina de restos de manzanas y papa, la extracción de fenoles de semillas de uva, pigmentos solubles en agua de remolacha roja y pectina de restos de manzana donde se ha usado extracción asistida por ultrasonido, los aceites usados pueden emplearse para la producción de biocombustibles (Lin et al., 2013).

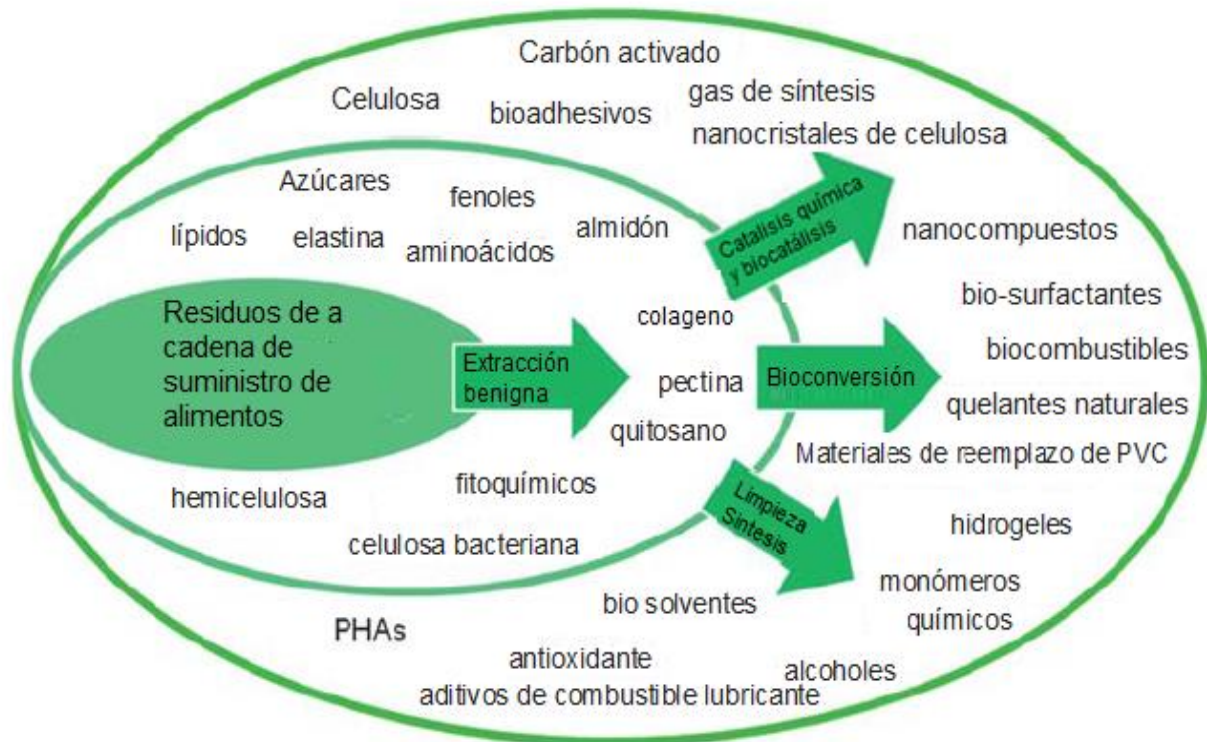


Figura 3. Componentes presentes en los desperdicios de la cadena de suministro de alimentos y sus usos en aplicaciones comunes de consumo

4.1.3 Cítricos y valorización de sus residuos.

El género *Citrus*, perteneciente a la familia Rutaceae, la cual consta de alrededor de 1300 especies, algunas importantes incluyen: *C. sinensis* (naranja), *C. paradisi* (toronja), *C. limon* (limón), *C. reticulata* (mandarina) etc. Las plantas de la mayoría de las especies de cítricos son grandes arbustos de hoja perenne o pequeños árboles, de 5–15 m de altura, la anatomía general de los frutos cítricos se ilustra en la Figura 4. Los cítricos son reconocidos como uno de los principales cultivos frutales del mundo. Estos se producen en muchos países de todo el mundo con clima tropical o subtropical. Brasil, Estados Unidos, Japón, China, México, Pakistán y los países de la región mediterránea son los principales productores de cítricos. (Anwar et al., 2008). Los cítricos son frutos de alto consumo en México y uno de los principales productos de exportación, en la industria alimenticia el fruto de estos es aprovechado para obtener jugos naturales y concentrados (SAGARPA, 2017).

Como resultado de su procesamiento son generadas grandes cantidades de aguas residuales y residuos sólidos principalmente cáscaras, membranas y semillas. (Espina et al., 2011). Estos desechos son ricos en azúcares, fibra, ácidos orgánicos, lípidos, vitaminas y minerales. (Faleye et al., 2012; Khan et al., 2012)

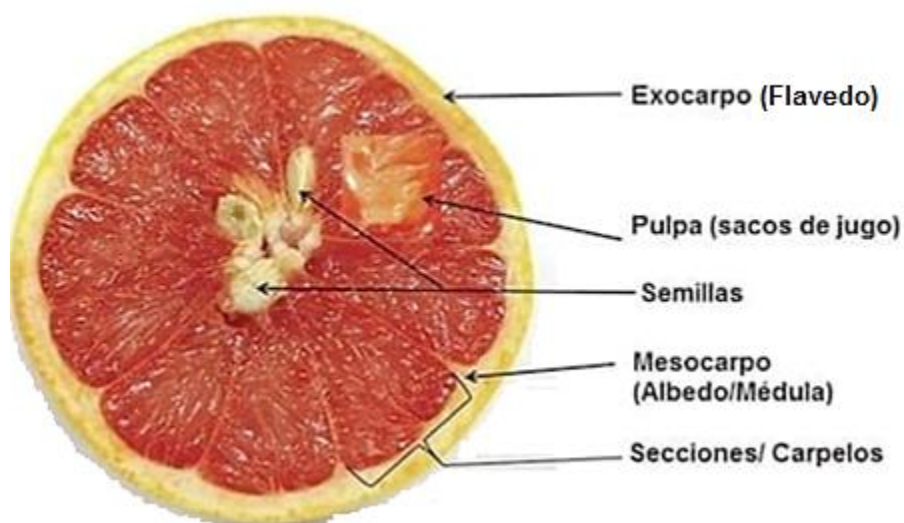


Figura 4. Anatomía general de un cítrico

La valorización de los residuos de cáscara de cítricos puede darse de forma directa para alimentación animal, fertilizante, en procesos bioquímicos para la obtención de etanol o enzimas, en extracción para obtener pectina o aceites esenciales, como lo ilustra la Figura 5. (Schulz et al., 2002; Lin et al., 2013; Satari & Kim, 2018)

La cáscara de toronja residual se compone de 20% de materia seca (azúcares, celulosa, hemicelulosa, pectina y d-limoneno) y 80% de agua. Sin embargo, la investigación llevada a cabo sobre la valorización de los residuos cítricos casi siempre se ha centrado en la producción de un solo componente, como d-limoneno, pectina o bioetanol. (Balu et al. 2012)

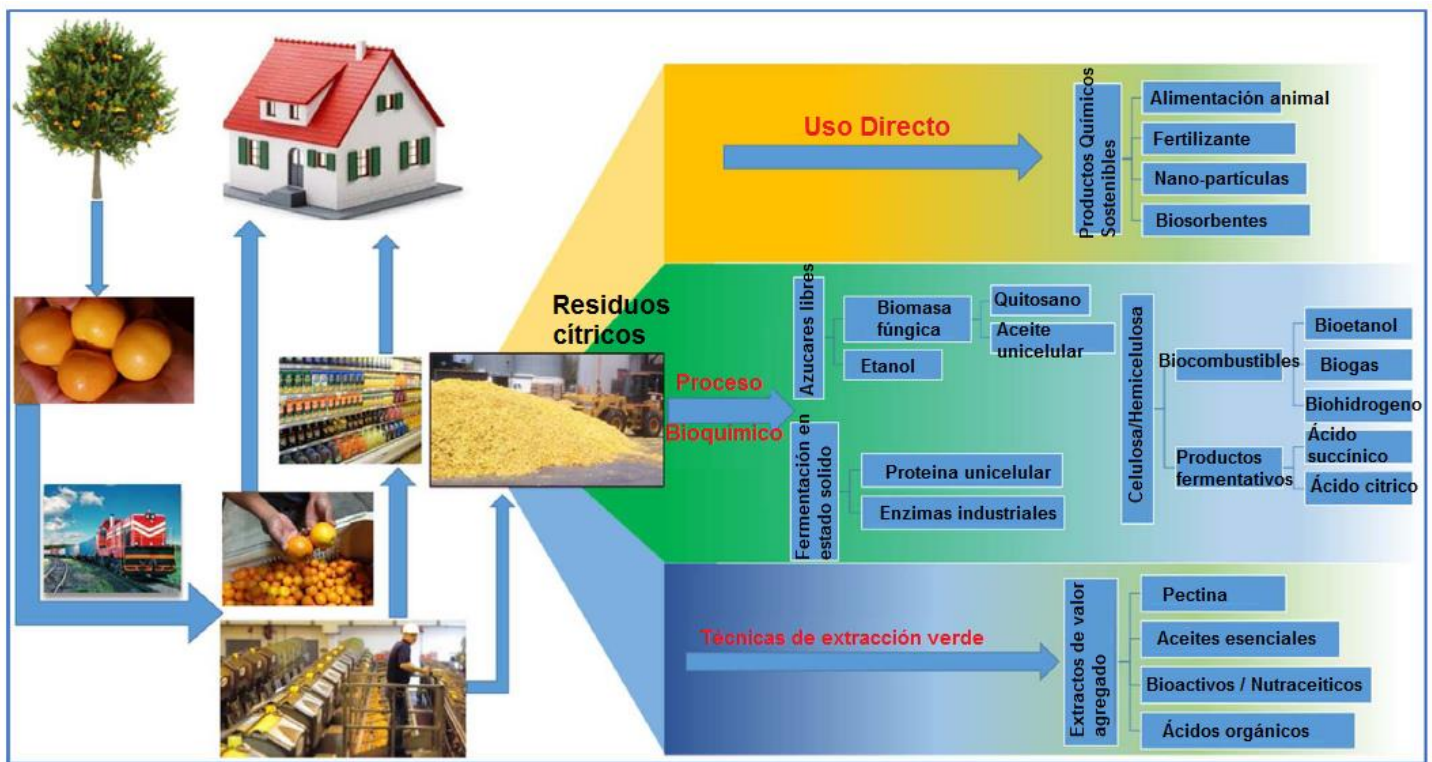


Figura 5. Vista de la cadena de suministro de cítricos y la valorización de sus residuos.

4.1.4 Toronja

La toronja (*Citrus paradisi*) tiene una pulpa amarilla o roja, jugosa y con un distintivo sabor amargo (Faleye et al., 2012). Es un fruto de alto consumo en México y uno de los principales productos de exportación. El primer productor es EU, seguido por China y Sudafrica y en 4to lugar esta México. Se han registrado 390 mil toneladas de producción de este fruto a nivel nacional. (SAGARPA, 2017). Es una fuente de muchos nutrientes y fitoquímicos que contribuyen a una dieta saludable, se consume fresco, en la industria alimenticia se transforma en jugos naturales y concentrados. Existe evidencia de que la toronja tiene propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antiinflamatorias. (Xi et al., 2015). La cáscara residual de los cítricos (Figura 6) se compone de 20% de materia seca (azúcares, celulosa, hemicelulosa, pectina y d-limoneno) y 80% de agua, el aceite de la cáscara de la toronja se ha utilizado como insecticida, sin embargo, la investigación llevada a cabo sobre la valorización de los residuos cítricos casi siempre se ha centrado en la producción de un solo componente, como d-limoneno, pectina o bioetanol. (Faleye et al., 2012; Balu et al., 2012).

Se han identificado un total de 15 compuestos fenólicos en jugos de toronja, como los ácidos p-hidroxibenzoicos: ácido gálico, p-hidroxibenzoico y ácido vanílico, ácidos hidroxicinámicos: ácido cafeico, ácido clorogénico, ácido p-cumarico, ácido ferúlico y ácido sinápico, y compuestos de flavanonas: narirutina, naringina, hesperidina, neohesperidina, didima. (Mandadi et al., 2007; Kelebek, 2010). Los compuestos fenolicos encontrados en la cáscara de toronja (flavedo) son: naringina, ácido cafeico, ferúlico, p-cumárico, sinápico, eriocitrina, naringina, poncirina, neohesperidina, narirutina, neodiosimina, rhoifolina, heptametoxiflavona, nobiletina. (M'hiri, et al., 2017; Zhang , 2007).

El aceite esencial de toronja contiene principalmente D-limoneno, también contiene α -terpinoleno, geraniol, heneicosano, mirceno, perilaldehído, trans-P-mentha-2,8-dienol, 4-metilprolina, benzaldehído, Z-5-nonadecano, d-carvona, tujol, α -pineno, 1-octanol, 5-acetil-2-metilpiridina, 3-careno, linalool, p-cimeno, citronelol, limoneno glycol (Khan et al., 2012; Yang et al., 2010).



Figura 6. (*Citrus paradisi*) Toronja

4.2 Antioxidantes

Un antioxidante es cualquier sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de este sustrato (Payne et al., 2010). Basado en su función los antioxidantes se clasifican en primarios, sinergistas y secundarios, según su origen se clasifican como naturales o sintéticos. (Madhavi et al., 1995).

Los antioxidantes son compuestos o sistemas que pueden interactuar de manera segura con los radicales libres y terminar la reacción en cadena antes de que se dañen las moléculas vitales. Pueden usar varios mecanismos:

- a) Eliminar especies que inician la peroxidación,
- b) Quelar iones metálicos para que no puedan generar especies reactivas o descomponer peróxidos
- c) Prevenir la formación de peróxidos.
- d) Romper de la reacción en cadena autooxidativa
- e) Reducir las concentraciones localizadas de oxígeno.

La efectividad antioxidante de estos compuestos depende de sus características químicas y ubicación física dentro de un alimento. Los antioxidantes tienen diversas propiedades biológicas, como los efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y antiateroscleróticos. (Orian y Escriche, 2015)

Con los antioxidantes (tipo AH) se secuestran los radicales oxi y peroxi que se forman durante las etapas de iniciación, propagación y multiplicación en cadena, aquellos antioxidantes con grupos fenólicos que dan lugar a radicales fenoxi estabilizados por resonancia, todavía pueden capturar radicales alcoxi y peroxi pero no pueden sustraer H de acil-lípidos insaturados. Como consecuencia, se interrumpe la propagación en cadena por formación de productos relativamente estables y se inhibe la peroxidación lipídica. El radical A (Figura 7) tiene que ser tan estable (por resonancia con un sistema aromático) que no pueda sustraer ningún átomo de hidrogeno de los ácidos grasos insaturados. El esquema muestra una molécula antioxidante puede interrumpir dos reacciones en cadena. (Belitz, 1988)

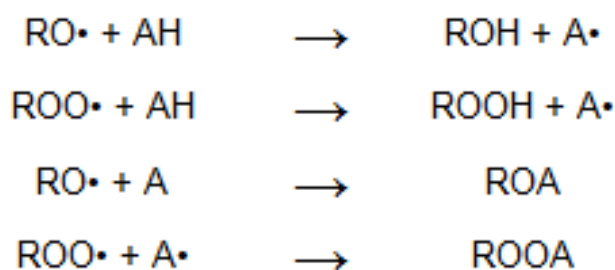


Figura 7. Acción de los antioxidantes como secuestradores de radicales.

AH: Antioxidante

Los antioxidantes primarios (BHA, BHT y TBHQ) terminan la reacción en cadena de los radicales libres al donar hidrógeno o electrones a los radicales libres y convertirlos en productos más estables. También pueden funcionar mediante la adición en reacciones con los radicales lipídicos, formando complejos de lípido-antioxidantes. (Madhavi et al., 1995).

Los antioxidantes sinergistas son sustancias que refuerzan la acción antioxidante. (Belitz, 1988). Se puede clasificar en términos generales como eliminadores de oxígeno y quelantes. Pueden actuar como donantes de hidrógeno al radical fenólico, regenerando así el antioxidante primario. Por lo tanto, los antioxidantes

fenólicos se pueden usar en niveles más bajos si se agrega un sinergista (como por ejemplo los ácido ascórbico, cítrico, fosfórico y fumarico) simultáneamente a los productos alimenticios, también proporciona un medio ácido que mejora la estabilidad de los antioxidantes primarios. (Madhavi et al., 1995).

Los antioxidantes secundarios o preventivos como el ácido tiodipropiónico y el dilauril tiodipropionato funcionan descomponiendo los peróxidos lipídicos en productos finales estables. (Madhavi et al., 1995)

4.2.1 Antioxidantes sintéticos

Antioxidantes fenólicos sintéticos actualmente permitidos para su uso en los alimentos son hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), galato de propilo (PG) y terc-butilhidroquinona (TBHQ). (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

BHA es un antioxidante monofenólico. Está disponible como escamas cerosas blancas, que es una mezcla de dos isómeros, 3-terc-butil-4-hidroxianisol (90%) y 2-terc-butil-4-hidroxianisol (10%) Figura 8(a). El BHA es muy soluble en grasas y aceites e insoluble en agua y es un antioxidante más efectivo para prevenir el deterioro del sabor y el color de los aceites esenciales. BHA es ligeramente mejor que BHT en sus propiedades de transferencia. Es particularmente efectivo para controlar la oxidación de los ácidos grasos de cadena corta como los que se encuentran en los aceites de coco y de almendra de palma que se usan típicamente en los productos de cereales y confitería. Un efecto sinérgico del BHA con otros antioxidantes como BHT, TBHQ (Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

El Butil hidroxitolueno o BHT Figura 8 (b) no es tan efectivo como el BHA principalmente debido a la presencia de dos grupos terc-butilo, que ofrecen mayor impedimento estérico que el BHA a la molécula, BHT es soluble en grasas y aceites e insoluble en agua y más efectivos en la supresión de la oxidación de las grasas animales que los aceites vegetales. (Shahidi & Ambigaipalan, 2015)

El terc-butilhidroquinona o TBHQ Figura 8(c) es un antioxidante altamente efectivo para aceites vegetales insaturados, muchas grasas animales comestibles y productos cárnicos, se puede usar solo o en combinación con BHA o BHT a una concentración máxima de 0.02% o 200 ppm, según el contenido de grasa de los alimentos, incluidos los aceites esenciales (Shahidi & Ambigaipalan, 2014; Márquez-Ruiz et al., 2014)

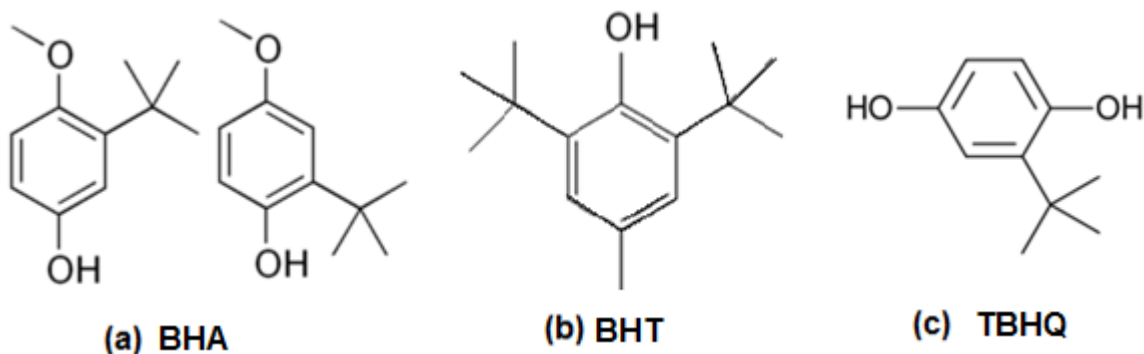


Figura 8. Estructuras químicas de (a) BHA, (b) BHT y (c) TBHQ

4.2.2 Antioxidantes naturales

Los antioxidantes sintéticos se usan ampliamente debido a su estabilidad y su amplia disponibilidad; Sin embargo, están relacionados con los efectos mutagénicos y cancerígenos y esto ha llevado a la búsqueda de antioxidantes extraídos de las matrices de plantas (Soquetta et al., 2018).

Los extractos naturales de origen vegetal podrían proporcionar alternativas a los antioxidantes sintéticos.(Caleja et al., 2017). Los flavonoides son una clase importante de compuestos bioactivos debido a sus versátiles propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias y su capacidad para los efectos de la antiperoxidación lipídica. Los dos grupos de flavonoides que se encuentran en los cítricos son las flavonas glicosiladas y polimetoxiladas. (Sarma et al., 2017). Las flavanonas glucósiladas más abundantes en la cáscara de cítricos son: naringina, hesperidina y neohesperidina (Satari & Kim, 2018) sus estructuras químicas se presentan en la Figura 9.

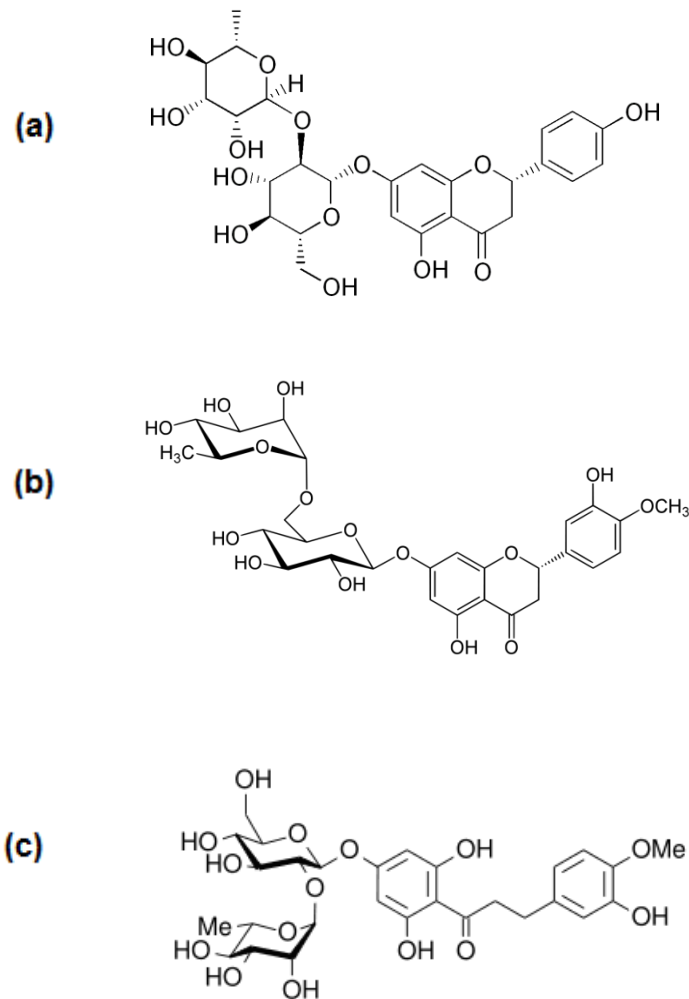


Figura 9. Estructuras químicas de (a) naringina, (b) hesperidina y (c) neohesperidina

Los flavonoides tienen una amplia gama de actividades biológicas, como la inhibición de la proliferación celular, la apoptosis, la enzima, los efectos antibacterianos y antioxidantes. Además, los flavonoides poseen varias propiedades clínicas, como los efectos antiateroscleróticos, antiinflamatorios, antitumorales, antitrombogénicos, antiosteoporóticos y antivirales (Jang et al., 2010)

La abundancia de carotenoides en frutas cítricas los convierte en una importante fuente de nutrientes de la dieta (Sharma et al. 2017). Los carotenoides

generalmente se clasifican en dos clases principales: carotenoides de hidrocarburos, conocidos como carotenos (por ejemplo, b-caroteno, licopeno); y carotenoides oxigenados, conocidos como xantofilas (por ejemplo, luteína). Las estructuras químicas de los carotenoides presentes en cítricos comunes se muestran en la Figura 10 (Márquez-Ruiz et al., 2014)

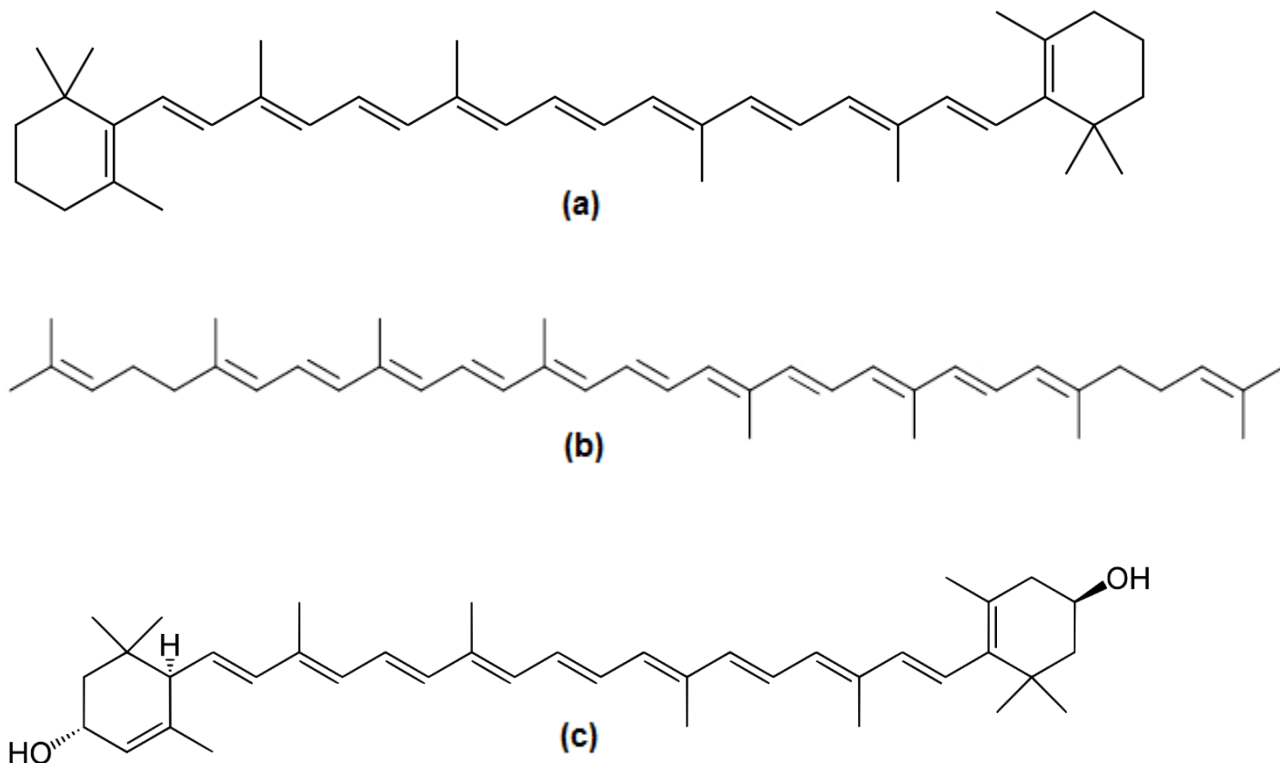


Figura 10. Estructura de carotenoides presentes en los cítricos (a) beta-caroteno (b) licopeno (c) luteína.

4.2.3 Antioxidantes en toronja

Se han encontrado altos niveles de glucósidos de flavanonas bioactivas como naringina y narirutina en las semillas y cáscaras de toronja, después de la extracción de su jugo. (Castro-Vazquez et al., 2016). Las flavanonas son los polifenoles típicos de las especies de cítricos (Khan et al., 2014). La naringina y neohesperidina son las principales flavanonas en toronja (Figura 9). Entre las flavonas polimetoxiladas (PMF) identificadas, la nobiletina y la tangeretina fueron

las las más abundantes. Entre los ácidos fenólicos el ácido gálico fue el predominante, seguido por el ácido clorogénico, el ácido cafeico y el ácido ferúlico. (Xi et al., 2015)

4.3 Técnicas de extracción

La extracción es un proceso fundamental para la separación y recuperación de compuestos bioactivos de las plantas. Desde la antigüedad, se han utilizado métodos de decocción, maceración, infusión, digestión y percolación para obtener extractos. Sin embargo, estas técnicas de extracción convencionales, tienen las desventajas de usar gran cantidad de disolvente, largo tiempo para la extracción y obtener rendimientos bajos. (Belwal et al., 2018). La extracción de compuestos bioactivos depende de varios factores, como la técnica de extracción, las materias primas y el disolvente de extracción que se utiliza. (Soqueta et al., 2018)

4.3.1 Técnicas convencionales de extracción

La extracción de compuestos bioactivos depende de varios factores, como la materia prima, el disolvente y la técnica de empleada, algunos ejemplos incluyen maceración, hidrodestilación y soxhlet. (Soqueta et al., 2018)

La maceración consiste en moler la matriz vegetal en partículas más pequeñas para aumentar el área superficial de contacto para una buena mezcla con el disolvente, la agitación durante el proceso facilita la extracción de dos maneras: al aumentar la difusión y al eliminar la solución concentrada de la superficie de la muestra, se decanta y filtra la mezcla dejando el disolvente con la sustancia de interés y el material sólido ausente de dicha sustancia, la elevación de la temperatura y la elección adecuada de los disolventes mejoran el proceso de extracción. Este proceso se ha utilizado durante mucho tiempo para obtener aceites esenciales y compuestos bioactivos. (Azmir et al., 2013). Esta técnica es un método fácil y simple. Sin embargo, utiliza un gran volumen de disolventes (Azwanida, 2015).

El método Soxhlet utiliza un sistema de extracción cíclica de los componentes que se encuentran en el alimento (NMX-F-089-S-1978). Es una extracción continua en caliente, en este método, la muestra finamente molida se coloca en una bolsa porosa o “dedal” hecho de un papel de filtro fuerte o celulosa, que se coloca en la cámara del dedal del aparato Soxhlet., el disolvente de extracción se calientan en el matraz inferior, se vaporizan en el dedal de muestra, se condensan en el condensador y se vuelven a gotear. Cuando el contenido líquido alcanza el brazo del sifón, el contenido líquido se vacía de nuevo en el matraz inferior y el proceso continúa. (Azwanida, 2015). Este método requiere una cantidad menor de disolvente en comparación con la maceración, sin embargo, esta técnica requiere un tiempo de extracción extenso y grandes cantidades de disolvente (Heleno et al., 2016).

La hidrodestilación es el proceso para obtener el aceite esencial de alguna materia prima vegetal mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica (Cerpa, 2007). Este método no involucra solventes orgánicos, se realiza con agua destilada y se emplea para extraer la fracción volátil en la materia vegetal. Los compuestos orgánicos solubles no volátiles se extraen en el agua hirviendo que está en contacto con la matriz dentro del destilador. (Wu et al., 2015). Sin embargo consume altos niveles de energía, tiempo, además a una temperatura de extracción alta, pueden perderse algunos componentes volátiles, este inconveniente limita su uso para la extracción de compuestos termolábiles. (Soqueta et al. 2018)

4.3.2 Técnicas modernas de extracción

Las técnicas convencionales de extracción de sólido-líquido, se utilizan principalmente para obtener extractos de compuestos bioactivos a partir de material vegetal. Sin embargo, los procesos convencionales de extracción con solventes tienen ciertas limitaciones, tales como menor eficiencia, bajo rendimiento de extracción, uso de gran cantidad de solventes y resistencia a la transferencia de masa. (Safdar et al., 2017).

Se han desarrollado nuevos métodos de extracción con el objetivo de mejorar el rendimiento, acelerar el proceso de extracción y ahorrar energía (Hashemi et al., 2018) Estos incluyen, extracción asistida por microondas, extracción asistida por ultrasonidos, extracción asistida por enzimas entre otros. Estas técnicas son conocidas por su corto tiempo de extracción, volumen reducido de solventes orgánicos, logrando un mayor rendimiento de extracción con menor consumo de energía (Belwal et al., 2018).

Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas (Figura 11) utiliza radiación electromagnética (300 MHz-300 GHz) que interactúa con los dipolos de materiales polares y polarizables (por ejemplo, solventes y muestras) provoca un calentamiento cerca de la superficie de los materiales y el calor se transfiere por conducción. En los solventes no polares, se produce un calentamiento deficiente ya que la energía se transfiere solo por absorción dieléctrica. (Azwanida, 2015)

Es posible tener acceso a temperaturas más altas de manera fácil, segura y reproducible; el rendimiento puede aumentar; y la pureza se puede mejorar en comparación con los métodos de calentamiento convencionales, pero la eficiencia de extracción bajo microondas depende de la naturaleza del disolvente y la muestra. (Soqueta et al., 2018)

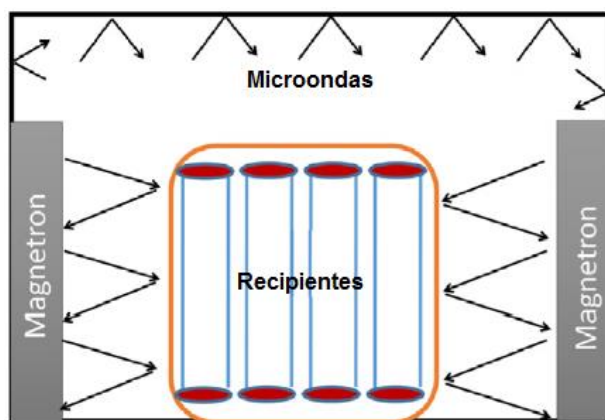


Figura 11. Extracción asistida por microondas

Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonido (Figura 12) utiliza un baño ultrasónico y / o una sonda ultrasónica que genera ondas sonoras que varían de 20 kHz a 100 MHz las cuales generan cavitación que implica la producción, el crecimiento y el colapso de burbujas, aceleran la transferencia de calor y masa a través de la ruptura de las paredes celulares, lo que lleva a la extracción de compuestos de la muestra al medio disolvente (Azmir et al., 2013). La temperatura, la presión, la frecuencia y el tiempo de sonicación son todos factores que regulan la acción del ultrasonido, la duración del proceso es inferior a 1 hora, el rendimiento de extracción es de 6% a 35% más alto que el obtenido utilizando técnicas de extracción tradicionales que emplean un tiempo de extracción más largo de 12 o más horas (Safdar et al., 2017). Se ha considerado como una alternativa prometedora para la extracción de compuestos bioactivos; permite la extracción a temperaturas más bajas que las utilizadas normalmente, la reducción de los volúmenes de solventes, aumenta el coeficiente de transferencia de masa, acelera la cinética y aumenta el rendimiento final (Soquetta et al., 2018). Sin embargo, el uso de ultrasonido de más de 20 kHz puede tener un efecto sobre los fitoquímicos activos a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la sonólisis. (Azwanida, 2015)

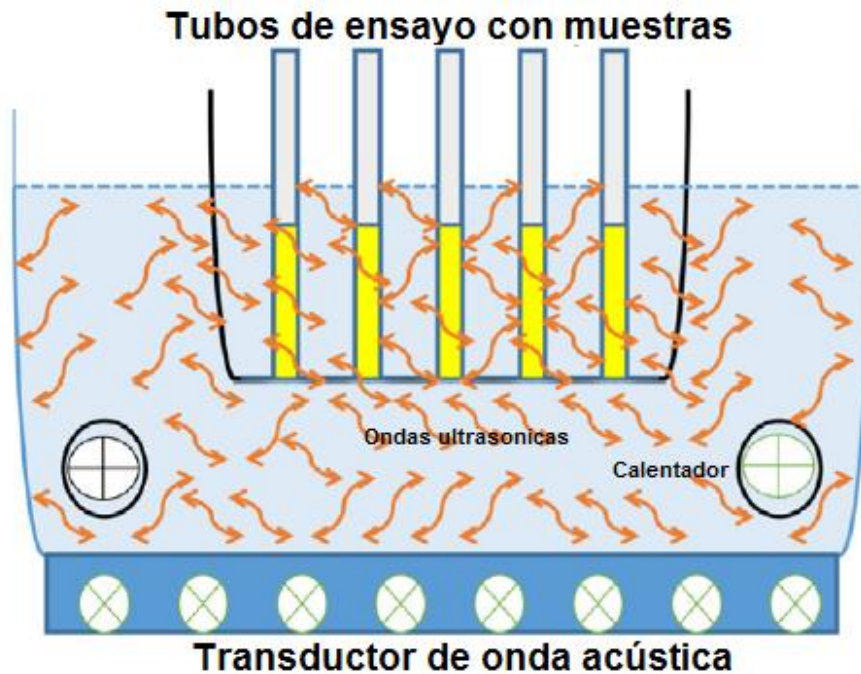


Figura 12. Extracción asistida por ultrasonido

Extracción asistida por campo eléctrico pulsado

La tecnología de la extracción asistida por campo eléctrico pulsado aplica como un pretratamiento en los procesos de extracción de materia vegetal, (Belwal et al. 2018). Es una tecnología no térmica basada en la electroporación de las membranas celulares, que ocurre cuando se aplica un campo eléctrico moderado o alto (0.1-50 kV/cm) a las células vivas, separa las moléculas de la membrana celular de acuerdo con su carga, esta repulsión forma poros, aumentando su permeabilidad aumentando así el rendimiento de extracción. (Azmir et al., 2013). Este método reduce el consumo de energía y aumenta la producción de extractos de alta calidad y pureza. (Soqueta et al. 2018)

Extracción asistida por enzimas

La extracción asistida por enzimas es otra técnica de extracción avanzada que se ha desarrollado para reducir el uso de disolventes, como se emplea en los procedimientos de extracción tradicionales, reduciendo los insumos del proceso. Este innovador método de extracción se basa en aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática celular o la pared celular a través de la acción hidrolítica de las enzimas (α -amilasa, celulasa, pectinasa y proteasa), que ayuda a la extracción de los compuestos de interés, como los pigmentos naturales, polisacáridos, saborizantes y compuestos bioactivos. La extracción asistida por enzimas permite el uso de una solución acuosa y condiciones de procesamiento suaves para obtener un extracto para diversas aplicaciones industriales. Las enzimas utilizadas se derivan principalmente de microorganismos, pero también se pueden obtener de plantas y animales. (Belwal et al. 2018)

4.4 Métodos para la cuantificación de polifenoles

-Ensayo Folin-Ciocalteu

La cuantificación de polifenoles totales se determina a través de un ensayo utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico que reacciona con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula. El contenido de polifenoles totales resultante de la aplicación del reactivo de Folin-Ciocalteu es regularmente expresado como mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de muestra (Singleton et al., 1999; Reyes et al., 2014).

4.5 Métodos para la evaluación de actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, una de las estrategias más aplicadas en las medidas de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, emplea sustancias cromógenas de naturaleza radical donde la pérdida de color se da de forma proporcional a la concentración (Kuskoski et al., 2005).

Algunos compuestos cromógenos comúnmente usados para determinar la capacidad de los compuestos fenólicos de captar los radicales libres generados son ABTS, DPPH, ORAC y FRAP se (Kuskoski et al., 2005).

ABTS

Este método espectrofotométrico se basa en la disminución de la absorbancia del ABTS (2,2'-azino-bis (3 - ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) el cual absorbe a 743 nm, dando un color verde azulado, debido a la interacción con especies donantes de hidrogeno o de electrones se produce la decoloración de la solución que indica el porcentaje de inhibición del ABTS, cual se cuantifica (Pisoschi & Negulescu, 2011; Sotelo et al., 2015). Este método es aplicable al estudio de antioxidantes solubles en agua y solubles en lípidos, compuestos puros y extractos alimenticios. (Re et al.,1999).

FRAP

El método FRAP (poder antioxidante reductor férrico por sus siglas en inglés) se basa en la reducción por los antioxidantes del complejo iónico férrico-TPTZ (2,4,6-tri (2-piridil) - 1,3,5-triazina). La unión de Fe^(II) al ligando crea un color azul marino muy intenso el cual se lee a 593 nm. La absorbancia se puede medir para evaluar la cantidad de hierro reducido y se puede correlacionar con la cantidad de antioxidantes, se utilizan como referencias trolox o ácido ascórbico. (Pisoschi & Negulescu, 2011).

La reacción es inespecífica, ya que el potencial redox estándar de $\text{Fe}^{(III)} / \text{Fe}^{(II)}$ es +0.77 V; cualquier compuesto con potencial redox más bajo presente en la mezcla de reacción puede reducir teóricamente $\text{Fe}^{(III)}$ a $\text{Fe}^{(II)}$ y contribuye a los valores de FRAP falsamente altos. (Benzie & Strain 1999; Ou et al., 2002)

ORAC

El método ORAC (capacidad de absorción de radicales de oxígeno por sus siglas en inglés) se basa en la generación de radicales hidrófilos piroxilo (ROO^*) por la descomposición térmica del compuesto diazo AAPH (2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloruro), estos radicales oxidan el sustrato fluorescente fluoresceína causando una extinción de su fluorescencia. Por tanto, la inhibición de este proceso por un antioxidante es una medida de su capacidad para reducir la producción de ROO. (Sotelo et al., 2015)

-Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidacil)

El método colorimétrico del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracil) es un método para la evaluación de actividad antioxidante total en alimentos y extractos vegetales (Singh et al., 2013).

La técnica se basa en el cambio de color del DPPH que es un radical cromógeno con una coloración violeta (Figura 13) que se pierde progresivamente a medida que reacciona con los antioxidantes de la muestra, produciendo un descenso de la absorbancia a 515 nm. La actividad antioxidante medida por el método de DPPH a menudo se informa como IC_{50} , que se define como la concentración inicial de DPPH en un 50%.

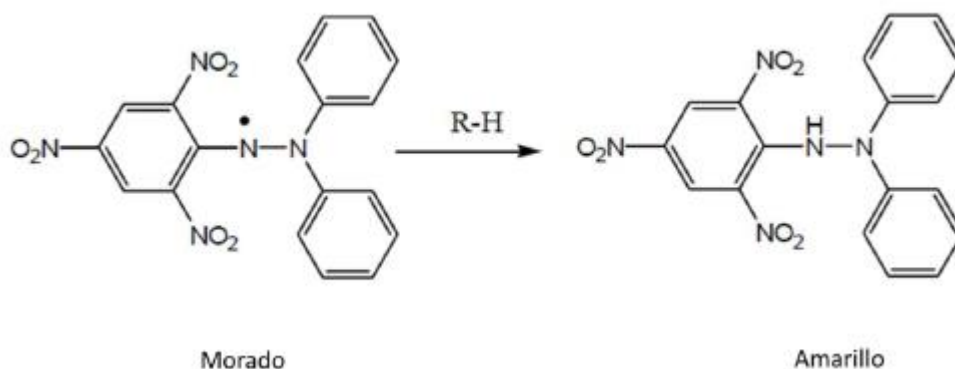


Figura 13. Reacción entre antioxidante y el reactivo DPPH (Mohammadpour, et al. 2012)

4.6 Evaluación de la estabilidad oxidativa

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas del deterioro de la calidad de los alimentos, ya que estos son susceptibles a los procesos oxidativos en presencia de catalizadores como calor, luz, enzimas, metales y microorganismos, dando lugar al desarrollo de sabores desagradables en los alimentos y la pérdida de aminoácidos esenciales, vitaminas liposolubles y otras moléculas bioactivas (Shahidi & Zhong, 2005; Iqbal et al., 2008)

La evaluación de la actividad oxidativa de un aceite se puede medir mediante distintas pruebas, como son: Índice de acidez, índice de yodo e índice de peróxidos.

4.6.1 Índice de acidez

Este método se basa en la titulación de los ácidos grasos libres, con un álcali, el índice de acidez, es la cantidad en miligramos de hidróxido de potasio necesaria para neutralizar los ácidos grasos libres en 1.0 g de aceites o grasa (NMX-F-101.). Su fundamento se basa en la titulación de los ácidos grasos libres con un álcali. Estos ácidos grasos son reflejo de la cantidad de ácidos

grasos hidrolizados de los triacilgliceroles (Nielsen, 2010). Caracteriza el grado de envejecimiento del aceite durante el almacenamiento, ya que aumenta gradualmente debido a la degradación del aceite (Ferrari et al., 2011)

4.6.2 Índice de Yodo

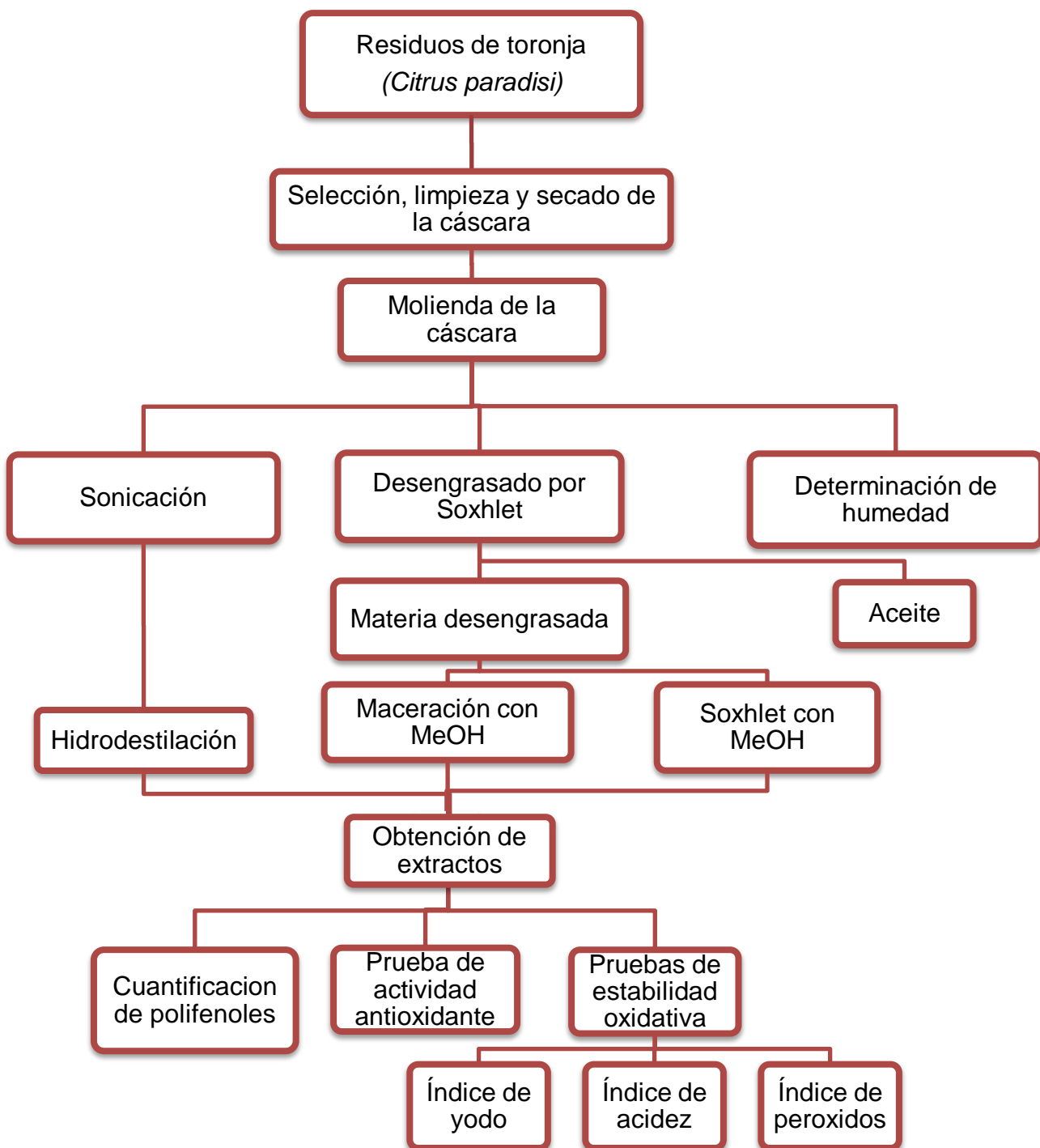
El índice de yodo permite valorar la insaturación total de un aceite o grasa, se expresa en miligramos de yodo que reaccionan por gramo de aceite (NMX-F-152-S). El monitoreo de este parámetro permite analizar la pérdida de insaturaciones en los triacilgliceroles, dado que, en las reacciones de oxidación, las dobles ligaduras son susceptibles a ser atacadas por radicales libres, para la formación de nuevos compuestos (Álvarez et al., 2007).

4.6.3 Índice de peróxido

La oxidación lipídica involucra la producción de radicales libres, formando compuestos iniciales de peróxidos e hidroperóxidos que se transforman en productos secundarios de la oxidación, como aldehídos y cetonas, responsables del olor y sabor rancio (Belen, et al., 2007) Se expresa en miliequivalentes de peróxido por kilogramo de muestra (NMX-F-154.).

El aceite se coloca en presencia de yoduro de potasio en exceso, este relaciona con los peróxidos presentes produciendo yodo (Hamilton y Hamilton, 1992), el cual posteriormente es titulado con tiosulfato de sodio estandarizado (Nielsen, 2010)

5 Metodología



Equipos

- Balanza analítica (Scientech, modelo SAT 20)
- Equipo de Soxhlet
- Evaporador rotatorio Buchi modelo R-124
- Hidrodestilador
- Parrilla eléctrica
- Lector de microplacas con dispensadores automáticos (BioTek [®], MODELO Synergy 2)
- Licuadora (Oster [®], modelo 6640-13)
- Sonicador Ultrasonic Cleaner (Sper Scientific modelo 10004, Frecuencia 42 KHz, 60 W)
- Termobalanza (Ohaus, modelo MB35)

Reactivos y disoluciones:

- Aceite de oliva
- Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)
- Ácido acético
- Ácido clorhídrico
- Ácido gálico
- Almidón para yodimetría
- Agua destilada
- Butilhidroxitolueno (BHT)
- Carbonato de sodio
- Cloroformo
- Diclorometano
- Etanol
- Fenoltaleína
- Hexano
- Hidróxido de potasio
- Metanol
- Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- Reactivo de Folín-Ciocalteu
- Reactivo de Wijs
- Tiosulfato de sodio
- Yoduro de potasio

5.1 Recolección limpieza y secado del material vegetal

- Se recolectó el residuo de cáscara de toronja en un negocio de jugos al sur de la ciudad de México, provenientes de la central de abastos, se seleccionó y limpio la cáscara residual de toronja, se retiró el exocarpo con la menor cantidad de mesocarpo con ayuda de un pelador de papas, se cortó en trozos pequeños (0.5 cm X 0.5 cm) se colocó sobre un papel absorbente y se dejó secar a la sombra por 7 días,

5.2 Molienda y determinación de la humedad

La cáscara seca se sometió a un proceso de molienda empleando una licuadora marca Oster (figura 14).

La determinación de la humedad se llevó a cabo colocando 1 gramo de cáscara molida extendida uniformemente en todo el plato de la termobalanza marca Ohaus a una temperatura de 85°C (NMX-F-428-1982).



Figura 14. Molienda de la cáscara

5.3 Extracción del aceite de la harina de cáscara de toronja

El desengrasado de la harina de cáscara de toronja se llevó a cabo por el método Soxhlet, pesando por triplicado 30 gramos de harina de cáscara de toronja, colocándola en un cartucho de papel filtro, se utilizaron 300 mL de hexano como disolvente. El hexano se puso en el matraz de ebullición, la muestra se extrajo en un extractor Soxhlet durante 6h. Una vez terminado el proceso, se evaporó el hexano bajo presión reducida en un evaporador rotatorio, se pesó el extracto obtenido para calcular el rendimiento (Ismail et al., 2010)

5.3.1 Maceración.

- 30 gramos de cáscara de toronja seca y molida, se pusieron en maceración en un matraz con 300 mL de metanol por 24 horas, Terminado el tiempo de extracción, se filtró y concentró el extracto con ayuda de un evaporador rotatorio Buchi modelo R-124. El remanente de disolvente en el extracto se eliminó al vacío hasta peso constante y se guardó a 4°C hasta su uso. Esta operación se realizó por triplicado. (Xu et al, 2007; Jang et al., 2010; Faleye, 2012; Zahoor S., 2016; Safdar M., 2017)

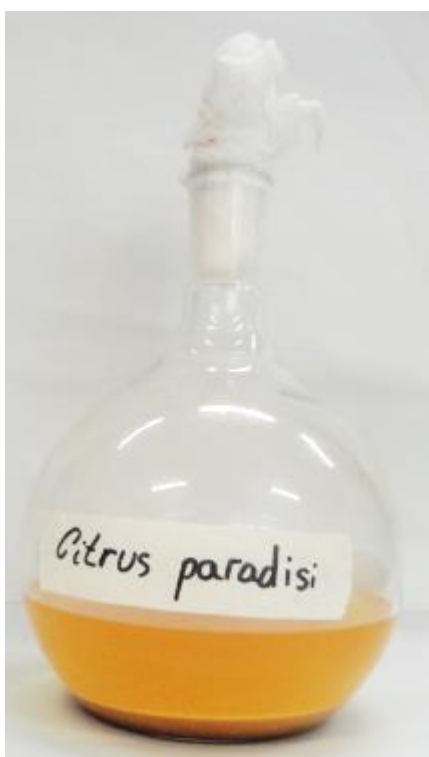


Figura 15. Maceración

5.3.2 Extracción mediante el método de Soxhlet

- Se colocaron en cartuchos de papel filtro 10 g de cáscara de toronja molida y se introdujeron en un aparato de Soxhlet (Figura 16). Se pusieron 300 mL de metanol en el metraz de ebullición y se calentó por un periodo de 6 horas. Después se evaporó el disolvente a presión reducida con ayuda de un evaporador rotatorio Buchi modelo R-124, eliminando el remanente de disolvente mediante evaporación al vacío hasta peso constante, el extracto se almacenó a 4°C hasta su uso. Esta operación se realizó por triplicado. (Ajewole K., 1993; Lopresto C.G., 2014; Ciğeroğlu Z., 2018)



Figura 16. Equipo Soxhlet

5.3.3 Extracción mediante hidrodestilación asistida por ultrasonido.

-10 g de cáscara seca y molida, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se agregaron 100 mL de agua destilada. La mezcla se sometió a sonicación (Figura 17) por diferentes periodos de tiempo (15, 30, 45 y 60 minutos, por triplicado respectivamente) una vez transcurrido el tiempo determinado, la mezcla sonicada se transfirió a un matraz bola de 500 mL y se agregan 100 mL de agua destilada. A este matraz se le colocó un aparato hidrodestilador (Figura 18) y se

sometió a ebullición por un periodo de 2 horas (o hasta que no cambie el volumen de extracto). El aceite obtenido se secó con sulfato de sodio anhidro, se decantó, pesó y almacenó a 4°C hasta su uso. Esta operación se realizó por triplicado. (Xu et al., 2007; Guimarães et al., 2010; Bimakr M., 2012; Khan M., 2012; Palacios S., 2009; Lopresto C.G., 2014; Song J., 2016 ;Askin et al., 2015 ; Castro-Vazquez et al., 2016)



Figura 17. Equipo de sonicación



Figura 18 .Equipo de extracción por hidrodestilación

5.4 Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

En un vaso de precipitados de 10 mL se pesaron aproximadamente 0.1 gramos de extracto y se añadieron 5 mL de metanol 80%, se agitó vigorosamente y una vez disuelto el extracto se adicionó a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforó con metanol 80%

La cuantificación de posibles compuestos polifenólicos se llevó a cabo con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Zhang, Y., et al 2010; Siddhuraju, P., 2007) realizando algunas modificaciones y empleando el Lector de microplacas con dispensadores automáticos (BioTek®, MODELO Synergy 2) (figura 19)



Figura 19. Lector de microplacas Synergy 2

Se elaboró una curva patrón de ácido gálico para cuantificar los polifenoles, se adicionaron aproximadamente 0,0125 g de ácido gálico y se colocaron en un matraz aforado de 25 mL, se adicionó agua destilada hasta el aforo. Posteriormente se hicieron diluciones de esta solución en tubos Eppendorf obteniendo las siguientes concentraciones de ácido gálico: 0.02 mg/mL, 0.04 mg/mL, 0.06 mg/mL, 0.08 mg/mL, 0.10 mg/mL, 0.12 mg/mL, 0.14 mg/mL, 0.16 mg/mL, 0.18 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.22 mg/mL.

Se colocaron 25 μ L de cada dilución de ácido gálico en diferentes pozos de la micro placa y consecutivamente se adicionó en cada pozo 30 μ L de solución de carbonato de sodio al 20%, 125 μ L de agua destilada y 20 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de la agitación vigorosa se dejó reposar la microplaca 30 minutos en la obscuridad, terminado el tiempo se midió la absorbancia a 760 nm en el lector de microplacas Sinergy 2.

Se realizaron diluciones de la preparación del extracto en tubos Eppendorf. Se colocaron 25µL de cada dilución en diferentes pozos de la microplaca (figura 20) y consecutivamente se adicionó en cada pozo 30 µL de solución de carbonato de sodio al 20%, 125 µL de agua destilada y 20 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de la agitación vigorosa se dejó reposar la microplaca 30 minutos en la oscuridad, terminado el tiempo se midió la absorbancia a 760 nm en el lector de microplacas Sinergy 2. La prueba se realizó por cuadruplicado para cada muestra.

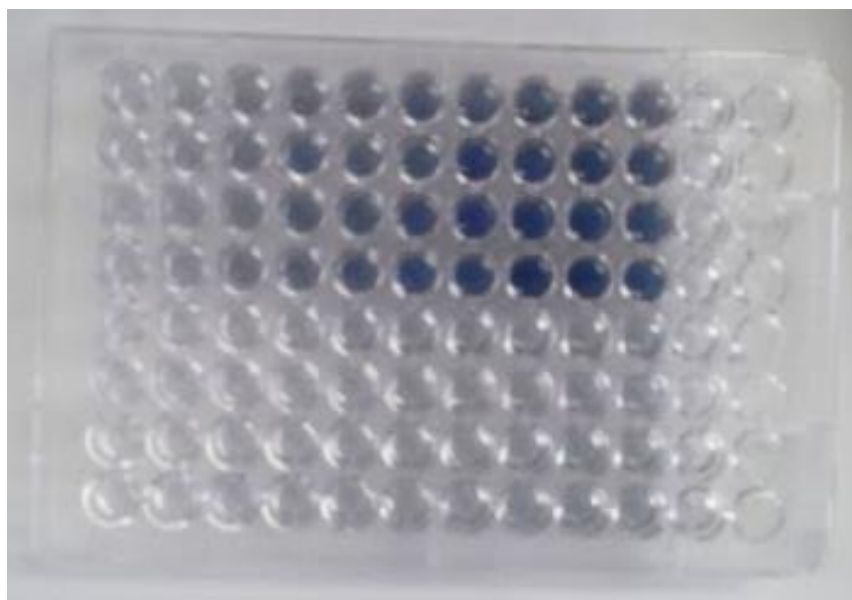


Figura 20. Microplaca con prueba de fenoles totales

5.5 Determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH

La actividad antioxidante se evaluó llevando a cabo el ensayo de la capacidad de remoción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH por sus siglas en inglés) de acuerdo al método de Brand-Williams, Cuvelier & Berset, 1995, siguiendo algunas modificaciones de (Cheng et al., 2006)

Se pesaron 0.0197 gramos de DPPH y se disolvieron con 1 mL de acetona, después esta mezcla se adicionó a un matraz aforado de 100 mL y se aforó con metanol al 80% obteniendo una concentración de 0.4998 mM de DPPH.

El ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox), es un compuesto hidrosoluble que se utilizó como referencia para elaborar la curva patrón de esta prueba. Se partió de un stock de trolox de 1000 μM , posteriormente se realizaron diferentes diluciones para obtener las siguientes concentraciones: 49.94 μM , 99.88 μM , 149.82 μM , 199.77 μM , 299.65 μM , 399.54 μM , 499.42 μM .

En el caso de los diferentes extractos se realizaron diluciones para llegar a la concentración idónea y posteriormente de la solución tomando diferentes alícuotas las cuales fueron de 100 μL , 200 μL , 300 μL , 400 μL , 500 μL , 600 μL , 700 μL , 800 μL , 900 μL , 1000 μL y se aforaron un mililitro con metanol al 80%.

En una microplaca de 96 pozos se adicionaron 200 μL de cada dilución del extracto (figura 21), 200 μL de disolución del reactivo de referencia (trolox), como control 200 μL de disolvente, el dispensador automático suministró 50 μL del reactivo de DPPH a cada pozo y como blanco de reactivos para desarrollar la prueba se adicionaron 250 μL de disolvente. La microplaca con muestras se dejó reposar por 30 minutos en la oscuridad para después medir la absorbancia a 515 nm en el lector de microplacas Sinergy 2. La prueba se realizó por cuadruplicado para cada muestra.

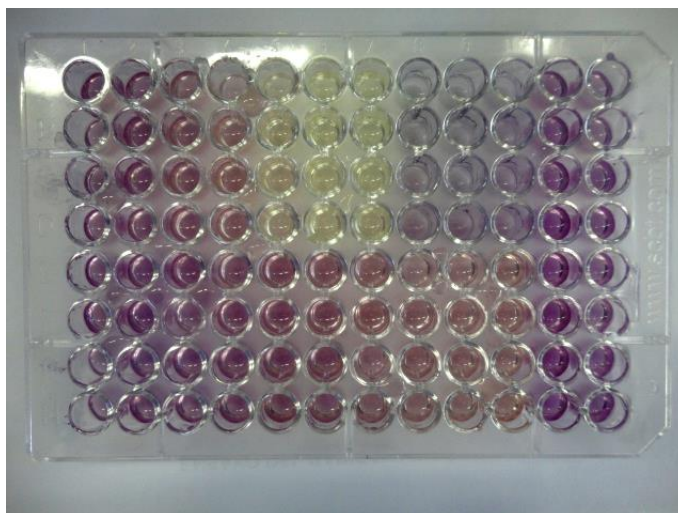


Figura 21. Microplaca con prueba de actividad antioxidante

El cálculo de actividad antioxidante se expresó como IC_{50} que es la concentración de muestra necesaria para inhibir el 50% de radicales libres (DPPH) añadidos. En este método se hizo un comparativo entre las muestras contra un estándar (trolox), a través d un modelo matemático de regresión lineal (Cheng. Et al., 2006). El valor obtenido de actividad antioxidante se define como la capacidad de captación de radicales libres en μM equivalentes de trolox por gramo de muestra.

5.6 Prueba de estabilidad oxidativa

Se añadieron extractos metanólicos al aceite de oliva precalentado (a $50^{\circ} C$ durante 3 h) a concentraciones de 150 ppm. Antioxidante sintético, es decir, BHT se empleó en su límite legal de 200 ppm para comparar la eficacia de los antioxidantes naturales. Todas las muestras (120 ml cada una) se colocaron en frascos, sin tapones y se almacenaron en un horno a una temperatura fija de $55^{\circ} C$ (Figura 22). Las muestras de control también se colocaron en las mismas condiciones de almacenamiento. Los análisis se llevaron a cabo después de intervalos regulares de 7 días durante 21 días. Se analizaron al menos tres muestras de cada categoría para cumplir con los requisitos de análisis estadísticos. (Iqbal et al., 2008; Ling et al., 2015; Iqbal et al.; Chong et al., 2015; AOCS, 1997)



Figura 22. Muestras de aceite

5.7 Análisis estadístico.

Una vez terminadas las pruebas de estabilidad oxidativa durante el tiempo propuesto, se realizó un análisis estadístico para comparar la función como antioxidante en una matriz alimentaria entre el extracto de la cáscara residual de toronja (*Citrus paradisi*) y el antioxidante sintético (BHT).

En este análisis se utilizó el programa de análisis estadístico STATISTICA para comparar resultados y comprobar si existe diferencia significativa entre las muestras. Se elaboró un análisis de varianza (ANOVA) con valor de significancia de 0.05 y la comparación de medias de realizo por Tukey (R Core Team, 2017)

6 Resultados y análisis

6.1 Humedad de la cáscara molida

Se midió el porcentaje de humedad de la cáscara fresca, dando como resultado un porcentaje de humedad de ~70%, al dejar secar y moler la cáscara se midió nuevamente la humedad la cual se redujo a 10%.

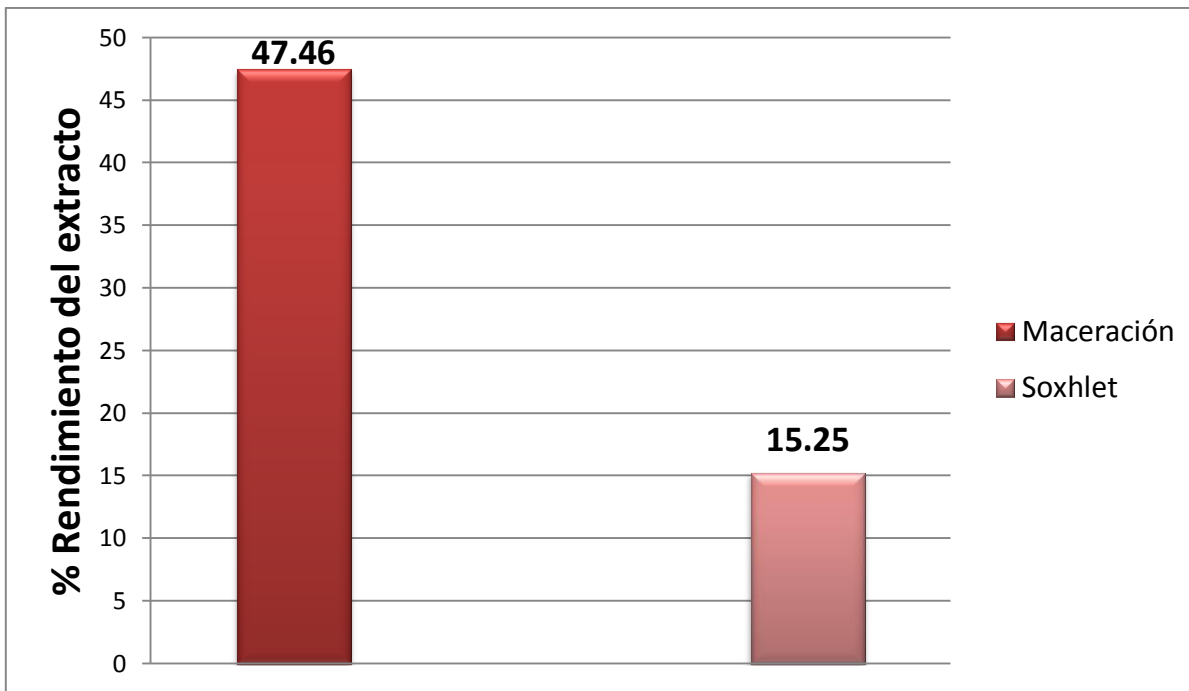
6.2 Rendimientos obtenidos de los extractos de cáscara de toronja

El aceite obtenido por desengrasado de la cáscara seca mediante el método de Soxhlet empleando hexano como disolvente tuvo un rendimiento de 7.93%.

Una vez desengrasada la harina de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*), se llevó a cabo la extracción de posibles compuestos fenólicos mediante la técnica de Soxhlet y maceración empleando metanol como disolvente. Una parte de la harina sin desengrasar se empleó para la extracción de posibles compuestos antioxidantes mediante la técnica de hidrodestilación asistida por sonicación empleando agua destilada como disolvente.

- **Extracción mediante Soxhlet y maceración**

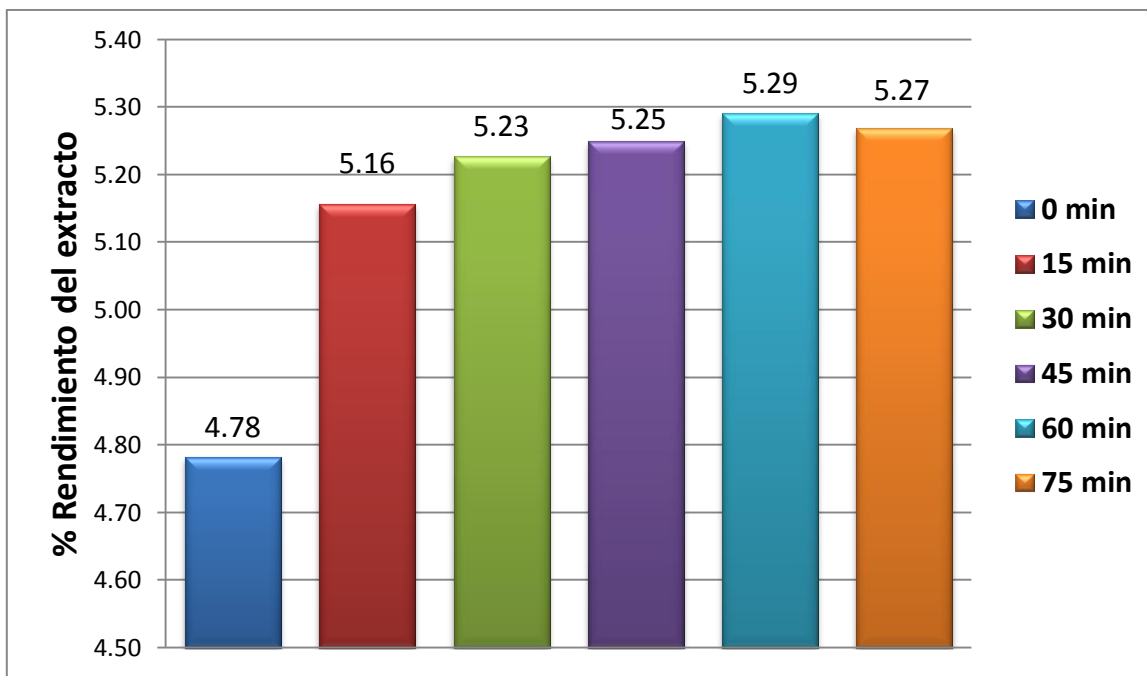
En cada método de extracción (Soxhlet y maceración), se empleó metanol como disolvente. El rendimiento de cada extracción se presenta en la Gráfica 1, en la cual se observa que la técnica que obtuvo mayores rendimientos fue la técnica de maceración



Gráfica 1. Rendimiento de los extractos de metanol de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*), empleando las técnicas de Soxhlet y maceración.

- **Extracción asistida por ultrasonido**

En la extracción asistida por ultrasonido se empleó agua destilada como disolvente y se llevó a cabo a diferentes tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 75 minutos). Como se observa en la Gráfica 2, el mayor rendimiento de extracción se obtuvo a los 60 minutos de sonicación



Gráfica 2. Rendimiento de los extractos de cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) asistida por sonicación a diferentes tiempos, empleando metanol como disolvente.

Se ha reportado un rendimiento de hasta 0.531 % de aceite esencial de toronja (Song et al., 2016). En dicho caso se empleó la cáscara completa, mientras que en este caso se procuró tomar solo el exocarpo, tratando de tomar la menor cantidad de mesocarpo.

Considerando los métodos de extracción utilizados (Soxhlet, maceración e hidrodestilación asistida por sonicación), el orden de rendimiento de extracción quedaría de la siguiente manera: maceración 47.46% > Soxhlet 15.25% > hidrodestilación asistida mediante sonicación 5.29% > solo hidrodestilación 4.78%.

Es importante hacer notar que mientras que en el proceso de hidrodestilación solo se extraen los componentes volátiles de la cáscara de toronja, en las técnicas de maceración y Soxhlet se extraen todos los componentes solubles en metanol de la harina desengrasada de la cáscara de toronja. (Yang, et al., 2010).

6.3 Cuantificación de los polifenoles obtenidos por el método Folin-Ciocalteu

Los compuestos polifenólicos se encuentran distribuidos en todo el reino vegetal, se ubican en toda la planta (Oroian & Escriche, 2015). Diversos estudios han encontrado que la cáscara de toronja contiene importantes compuestos bioactivos, entre ellos polifenoles, los cuales tienen actividad antioxidante (Mandadi et al, 2007.) Por lo anterior se investigó el contenido de polifenoles totales en los extractos obtenidos, mediante el ensayo de Folin-Ciocalteu.

En la tabla 1 se resumen los resultados obtenidos del contenido de polifenoles totales de los extractos de cáscara de toronja, junto con el análisis estadístico Tukey.

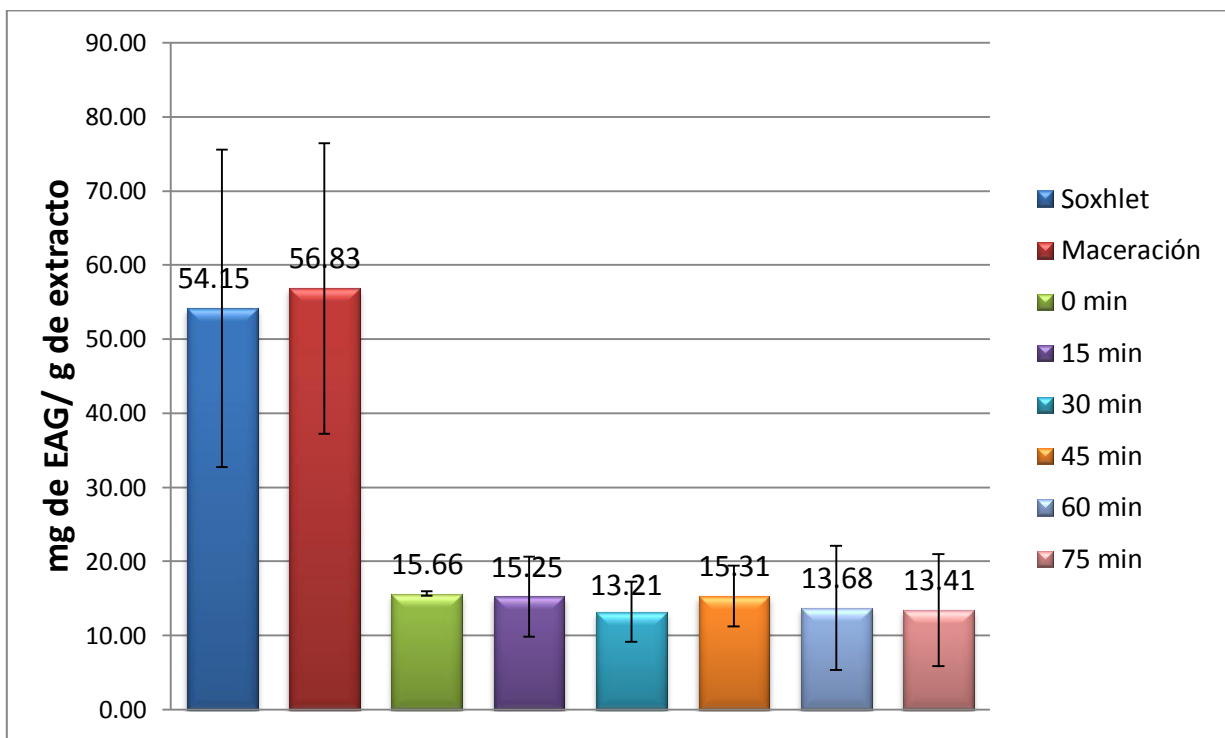
Tabla 1. Polifenoles totales presentes en los extractos de cáscara de toronja.

Técnica de extracción		Fenoles totales (mg de EAG/g de extracto)
Soxhlet metanol		54.15±21.43 ^b
Maceración metanol		56.83±19.61 ^c
Hidrodestilación	Sonicación 0 min	15.66±0.33 ^{af}
	Sonicación 15 min	15.25±5.40 ^{ad}
	Sonicación 30 min	13.21±3.47 ^a
	Sonicación 45 min	15.31±3.19 ^{ae}
	Sonicación 60 min	13.68±8.38 ^{ac}
	Sonicación 75 min	13.41±7.57 ^{ab}

N=3, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico por tipo de técnica de extracción. Superíndices ^{a-f} significan diferencia significativa ($p < 0.05$), donde el intervalo va desde a (menor contenido), hasta d (mayor contenido).

La cantidad de polifenoles totales de los extractos obtenidos por las técnicas de extracción Soxhlet, maceración, hidrodestilación e hidrodestilación asistida mediante sonicación se muestran en la Gráfica 3. Con el método de maceración se obtuvo mayor contenido de polifenoles, obteniéndose $56.83 \pm 19.61^c \pm$ mg de EAG/g de extracto.



Gráfica 3. Polifenoles totales en los extractos de cáscara de toronja (*Citrus paradisi*), empleando diferentes métodos de extracción: Soxhlet, maceración y hidrodestilación con sonicación.

Comparando los resultados obtenidos de todos los extractos, se observa que la mayor cantidad de polifenoles totales fue a partir del extracto obtenido con el método de maceración 56.83 ± 19.61 mg de EAG/g de muestra, seguido por

56.83±19.61 con mg de EAG/g de muestra y hidrodestilación sin sonicación (15.66±0.33 mg de EAG/g).

6.4 Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante mediante el método de eliminación de DPPH se informa como IC₅₀ que se define como la concentración de antioxidante efectiva necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50% (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Por lo anterior, a menor valor de IC₅₀ hay mayor actividad antioxidante.

En la tabla 2 se resumen los resultados de actividades antioxidante de los extractos obtenidos de la cáscara de toronja con su respectivo promedios y desviación estándar.

Tabla 2. Actividad antioxidante de los extractos de cáscara de toronja.

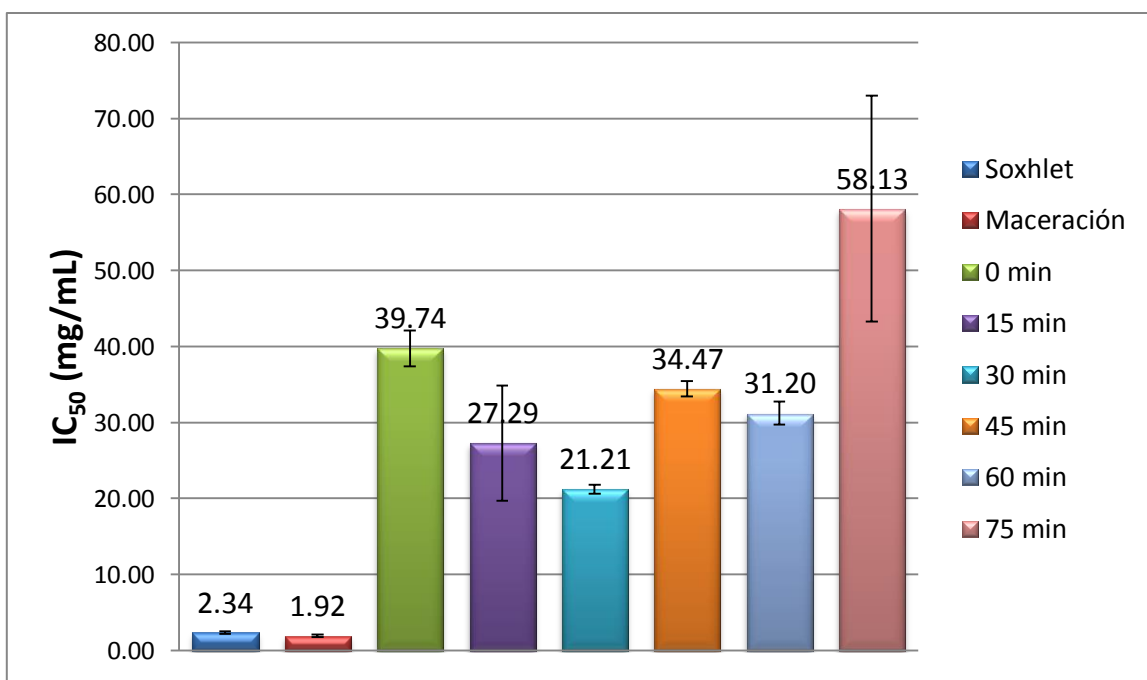
Técnica de extracción		DPPH IC ₅₀ (mg/mL)
Soxhlet metanol		2.34±0.18 ^b
Maceración metanol		1.92±0.15 ^a
Hidrodestilación	Sonicación 0 min	39.74±2.38 ^{ce}
	Sonicación 15 min	27.29±7.56 ^{cb}
	Sonicación 30 min	21.21±0.62 ^{ca}
	Sonicación 45 min	34.47±1.01 ^{cd}
	Sonicación 60 min	31.20±1.52 ^{cc}
	Sonicación 75 min	58.13±14.83 ^{cf}

N=3, promedio ± desviación estándar

Análisis estadístico por tipo de técnica de extracción. Superíndices ^{a-f} significan diferencia significativa (p<0.05), donde intervalo va desde a (mayor actividad), hasta f (menor actividad).

En particular, con la técnica de extracción por maceración con metanol se observa que el extracto tuvo mayor actividad antioxidante, con IC₅₀ de 1.92±0.15 mg/mL.

Los resultados que se muestran en la Gráfica 4 corresponden a los valores de IC₅₀ de todos los extractos.



Gráfica 4. Actividad antioxidante presente en los extractos de cáscara de toronja residual (*Citrus paradisi*), empleando diferentes técnicas de extracción.

Los extractos con mayor actividad antioxidante fueron los siguientes en orden descendiente: maceración > Soxhlet > hidrodestilación > hidrodestilación asistida mediante sonicación.

Se ha reportado un buen rendimiento de extracción con metanol de los componentes polifenólicos presentes en la cáscara de toronja (Zahoor S., 2016; Zhang et al., 2007). Los componentes de extractos obtenidos con metanol son diferentes a los obtenidos mediante hidrodestilación debido a que el aceite esencial de toronja obtenido se compone principalmente de limoneno y trazas de algunos terpenos, el cual presenta baja actividad antioxidante, (Bacanlı et al., 2015; Yang et al., 2010).

6.5 Estabilidad oxidativa del aceite

La oxidación de los lípidos es una de las principales causas de deterioro de la calidad de los alimentos. Los lípidos son susceptibles a los procesos oxidativos en presencia de catalizadores como calor, generando hidroperóxidos y dienos conjugados como productos de oxidación primarios que posteriormente se degradan a productos secundarios como alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, ácidos orgánicos volátiles y epoxi compuestos, entre otros (Shahidi & Zhong, 2015).

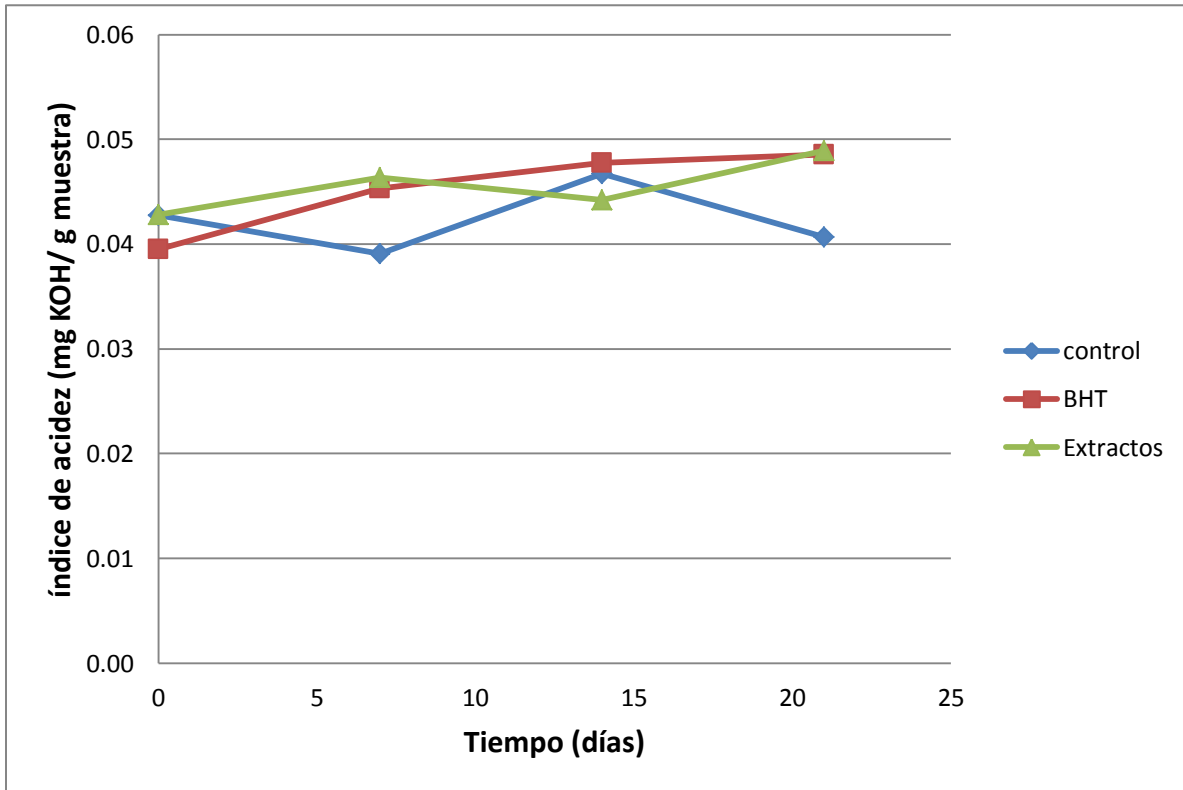
El estudio de la estabilidad oxidativa se llevó a cabo con tres muestras: control (aceite de oliva extra-virgen), aceite de oliva adicionado con BHT y aceite de oliva adicionado con el extracto de cáscara de toronja obtenido con la técnica de maceración con metanol. Las muestras se almacenaron en condiciones aceleradas a 55°C por un periodo de 21 días (Chong et al., 2015), que equivalen a 16 meses de almacenamiento en temperatura ambiente de acuerdo a Matthäus, 2010.

El extracto de toronja utilizado fue el obtenido con la técnica de maceración con metanol. Los cambios oxidativos de las muestras almacenadas fueron monitoreados cada 7 días durante 21 días, determinando el índice de peróxidos, índice de yodo e índice de acidez.

6.6 Índice de Acidez

El índice de acidez (IA) normalmente refleja la cantidad de ácidos grasos hidrolizados presentes una muestra de aceite se usa a menudo como un indicador de la calidad del aceite (O'Keefe & Pike, 2010).

En la gráfica 5 se observa que el índice de acidez adicionado con el extracto de cáscara de toronja aumenta al igual que el aceite adicionado con BHT, en el día 21 el aceite adicionado con el extracto metanólico de cáscara presenta una mayor acidez que el aceite control.



Gráfica 5. Índice de acidez de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva, aceite de oliva adicionado con 150 ppm de extracto de cáscara de toronja y aceite de toronja adicionado con 200 ppm de BHT a 55°C por 21 días.

En la tabla 3 se muestran los resultados del índice de acidez con su respectiva desviación estándar y análisis estadístico Tukey.

Tabla 3. Índice de acidez en aceite de oliva con extracto de cáscara de toronja, BHT y control, almacenados bajo condiciones aceleradas 55°C por 21 días.

Índice de acidez (mg KOH/g muestra)				
Muestra/Tiempo	0	7	14	21
Extracto de cáscara de toronja	0.0428±0.0056 ^a	0.0464±0.0014 ^a	0.0442±0.0015 ^a	0.0489±0.0004 ^a
BHT	0.0395±0.0133 ^a	0.0453±0.0045 ^a	0.0478±0.0012 ^a	0.0486±0.0006 ^a
Control	0.0428±0.0220 ^a	0.0391±0.0142 ^a	0.0467±0.0016 ^a	0.0407±0.0137 ^a

n=3, promedio ± desviación estándar.

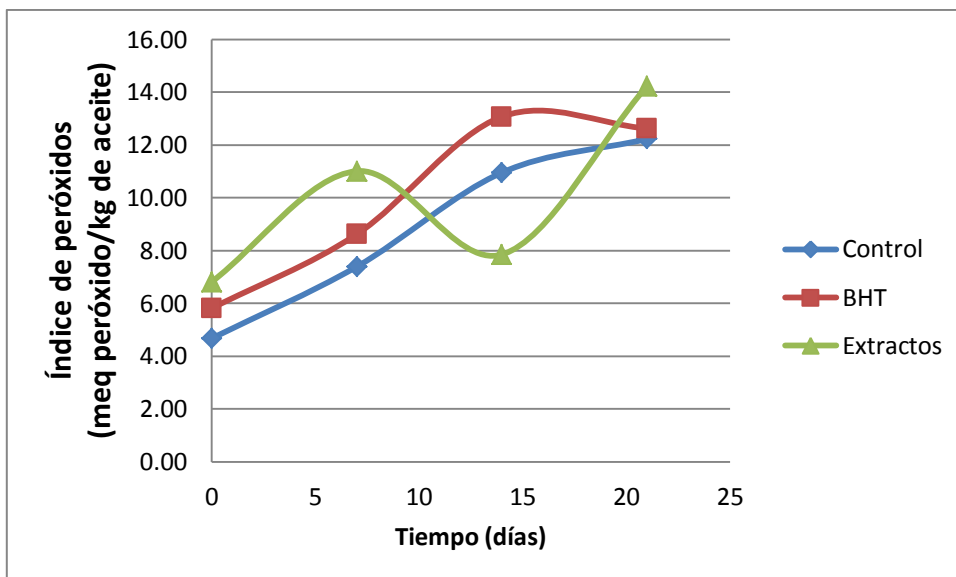
Análisis estadístico para índice de acidez por día. El superíndice ^a indica que no hubo diferencia significativa (p<0.5) entre los valores.

6.7 Índice de Peróxidos

En general, la oxidación de lípidos produce peróxidos como productos de primera generación que son inestables y se degradan a una amplia gama de productos secundarios incluidos compuestos volátiles y no volátiles (Shahidi & Zhong, 2015).

El índice de peróxido (IP) es una de las pruebas más utilizadas en la determinación de la calidad de los aceites (O'keefe & Pike, 2010).

En la gráfica 6 se observa un incremento en el índice de peróxidos durante el almacenamiento, el aceite adicionado con BHT presenta un menor índice de peróxidos que el aceite adicionado con el extracto de cáscara de toronja, ambos por debajo del valor máximo permitido de 20 meq de peróxido /g (NMX-F-109-1982)



Gráfica 6. Índice de peróxidos de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva, aceite de oliva adicionado con 150 ppm de extracto de cáscara toronja y aceite de oliva con 200 ppm de BHT a 55°C por 21 días.

En la tabla 4 se muestran los resultados del índice de peróxidos con su respectiva desviación estándar y análisis estadístico Tukey.

Tabla 4. Índice de peróxidos en aceite de oliva con extracto de cáscara de toronja, BHT y control, almacenados bajo condiciones aceleradas 55°C por 21 días.

Índice de peróxidos (meq peróxidos/kg muestra)				
Muestra/Tiempo	0	7	14	21
Extracto de cáscara de toronja	6.8126±1.3747 ^b	11.0117±1.9360 ^a	7.8541±2.1241 ^a	14.2335±1.5112 ^a
BHT	5.8145±2.1556 ^a	8.6169±2.2783 ^a	13.0722±0.4641 ^c	12.6247±1.0042 ^a
Control	4.6749±1.8665 ^a	7.3917±1.0819 ^a	10.9543±2.1935 ^a	12.2257±0.3082 ^a

n=3, promedio ± desviación estándar.

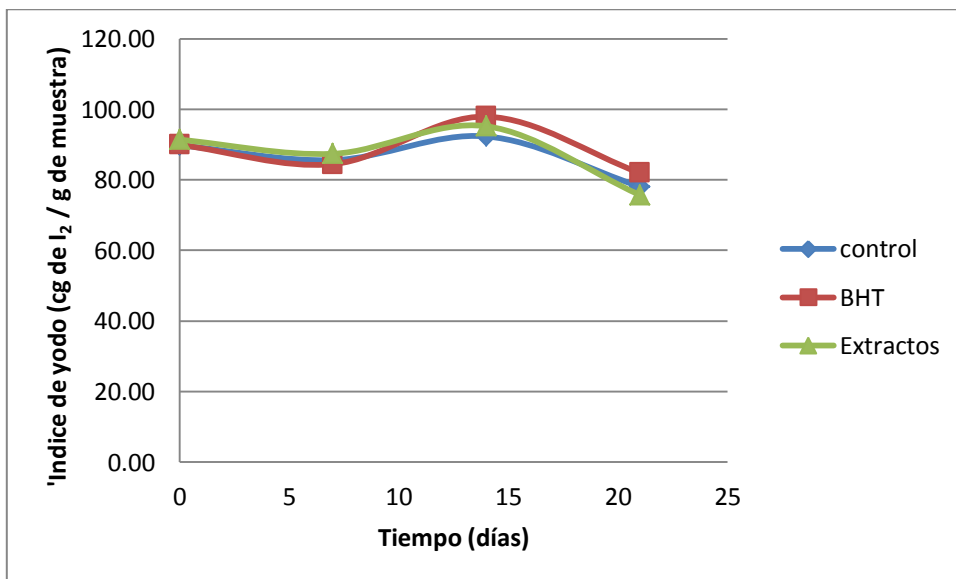
Análisis estadístico para índice de peróxidos por día. El superíndice ^{a-c} indica diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los valores, donde ^a es el menor índice y ^c el mayor.

Se muestra que existe diferencia significativa entre las muestras adicionadas con extractos y el aceite control al día 14 donde disminuyó el índice de peróxidos del aceite adicionado con extracto metanólico de cáscara de toronja.

6.8 Índice de Yodo

El índice de yodo es una medida del grado de insaturación, en relación con la cantidad de aceite, cuanto mayor es la cantidad de insaturación, más yodo se absorbe y mayor es el índice de yodo (O'Keefe & Pike, 2010).

En la gráfica 7 se observa como el índice de yodo disminuye durante el almacenamiento de las muestras



Gráfica 7. Índice de yodo de las diferentes muestras a través del tiempo usando como control aceite de oliva, aceite de oliva adicionado con 150 ppm de extracto de cáscara toronja y aceite de oliva con 200 ppm de BHT a 55°C por 21 días.

En la tabla 5 se muestra los resultados del índice de yodo con su respectiva desviación estándar y análisis estadístico Tukey.

Tabla 5. Índice de yodo en aceite de oliva con extracto de cáscara de toronja, BHT y control, almacenados bajo condiciones aceleradas 55°C por 21 días.

Índice de yodo (centigramos de I ₂ /g muestra)				
Muestra/Tiempo	0	7	14	21
Extracto de cáscara de toronja	91.40±3.86 ^a	87.41±6.90 ^a	95.20±1.64 ^b	75.74±5.01 ^a
BHT	89.95±7.41 ^a	84.47±6.43 ^a	97.93±1.11 ^{c-a}	81.99±6.39 ^a
Control	89.82±8.75 ^a	85.59±3.30 ^a	92.33±1.43 ^a	78.12±4.72 ^a

n=3, promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico para índice de yodo por día. El superíndice ^{a-c} indica diferencia significativa (p<0.5) entre los valores, donde ^a es el menor índice y ^c el mayor.

En la tabla anterior puede observarse que existe diferencia significativa entre el aceite adicionado con BHT y el aceite control al día 14.

7 Conclusiones

1. Se analizaron los extractos obtenidos de la cáscara de toronja (*Citrus paradisi*) mediante los métodos de extracción: Maceración, Soxhlet e hidrodestilación asistida con ultrasonido.
2. El orden de rendimiento de extracción fue el siguiente: maceración usando metanol (47.46%) > Soxhlet empleando metanol (15.25%) > hidrodestilación asistida mediante sonicación 5.29% > hidrodestilación 4.78%.
3. El extracto con mayor cantidad de polifenoles fue el obtenido mediante el método de maceración con metanol (56.83±19.61 EAG/g de extracto).
4. El extracto con mayor actividad antioxidante fue el obtenido mediante el método de Soxhlet con metanol (IC₅₀ de 1.92±0.15 mg/mL).
5. El estudio de estabilidad oxidativa no presenta diferencia significativa entre las muestras de control (aceite de oliva), aceite adicionado con BHT y aceite adicionado con extracto de cáscara de toronja. Por lo anterior se concluye que el extracto de cáscara de toronja no mostró ser eficiente para retardar el proceso de oxidación bajo las condiciones empleadas en este experimento.

8 Bibliografía

- AOCS Official Method Cg 5–97, (1997). Oven storage test for accelerated aging of oils. Sampling and analysis of commercial fats and oils. Methods and Recommended Practices of the AOCS, Sixth edition. Firestone, D. (ed.); AOCS Press, Champaign, IL, USA, pp. 1-2.

- Ajewole K. & Adeyeye A. (1993). Characterisation of Nigerian citrus seed oils, *Food Chemistry* 47, 77-78

- Álvarez, M. J., Guarán, C. Y., Belén, D. R., García-Pantaleón, D., & Medina, C. A. (2007). Efecto de los extractos de flavonoides de harinas de cáscaras y semillas de pomelos sobre la estabilidad de aceite de soja. *Grasas y aceites*, 58(4), 351-358

-Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., ... & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436

Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*, 4(196), 2167-0412.

- Bacanlı, M., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2015). The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Food and chemical Toxicology*, 81, 160-170.

- Baiano, A. (2014). Recovery of biomolecules from food wastes—a review. *Molecules*, 19(9), 14821-14842.

- Balu, A. M., Budarin, V., Shuttleworth, P. S., Pfaltzgraff, L. A., Waldron, K., Luque, R., & Clark, J. H. (2012). Valorisation of orange peel residues: waste to biochemicals and nanoporous materials. *ChemSusChem*, 5(9), 1694-1697.

-Belén-Camacho, D. R., Román, J. C., Pantaleón, D. M. G., Moreno-Álvarez, M. J., Martínez, C. M., & Escalona, C. E. O. (2007). Efecto del secado solar en los contenidos de humedad, carbohidratos, carotenoides totales e índice de peróxidos del mesocarpio de la palma coroba (*Attalea spp.*). *Interciencia*, 32(4), 257-261.

-Belitz, H. D., & Grosch, W. (1988). Química de los Alimentos (2ª edición ed.). Zaragoza, España: Acribia. Pp (237- 241)

-Belwal, T., Ezzat, S. M., Rastrelli, L., Bhatt, I. D., Daglia, M., Baldi, A., ... & Anandharamakrishnan, C. (2018). A critical analysis of extraction techniques used for botanicals: Trends, priorities, industrial uses and optimization strategies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 100, 82-102

- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 15-27). Academic Press.

-Bimakr M., Rahman R., Taip F., Adzahan N., Sarker Z. and Ganjloo A.(2012) Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Crude Oil from Winter Melon (*Benincasa hispida*) Seed Using Response Surface Methodology and Evaluation of Its Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Fatty Acid Composition, *Molecules*, 17, 11748-11762.

- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P., & Ferreira, I. C. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food chemistry*, 216, 342-346.

-Castro-Vazquez, L., Alañón, M. E., Rodríguez-Robledo, V., Pérez-Coello, M. S., Hermosín-Gutierrez, I., Díaz-Maroto, M. C., & Arroyo-Jiménez, M. D. M. (2016). Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016.

-Carrasco Escobar, J., & Rodríguez Silva, J. (2015). Análisis de estadísticas del INEGI sobre residuos sólidos urbanos. *Revista Realidad, Datos y Espacio. Revista Internacional de Estadística y Geografía*. Vol. 6, Núm. 1, 18- 35

- Cerpa, G. (2007). HIDRODESTILACION DE ACEITES ESENCIALES: MODELADO Y CARACTERIZACION, UNIVERSIDAD DE VALLADOLID, Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente.

-Cheng, Z., Moore, J., & Yu,L (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of agricultural and food Chemistry* (54), 7429 – 7436.

- Chong, Y. M., Chang, S. K., Sia, W. C. M., & Yim, H. S. (2015). Antioxidant efficacy of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) peel extracts in sunflower oil during accelerated storage. *Food bioscience*, 12, 18-25.

-Ciğeroğlu Z., Aras Ö., Pinto C., Bayramoğlu M., Kirbaşlar S., Lorenzo J., Barba F., Saraiva J., Şahin S. (2018) Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) leaves via D-optimal design and artificial neural network design with categorical and quantitative variables *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume98, Issue12, 4584-4596

-Decker, E. A., Elias, R. J., & McClements, D. J. (2010). *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications: management in different industry sectors*. Elsevier. Editorial : woodhead publishing limited, capitulo 6, 183-238

-Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food control*, 22(6), 896-902.

- Evans, C. D., List, G. R., Moser, H. A., & Cowan, J. C. (1973). Long term storage of soybean and cottonseed salad oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 50(6), 218-222.

-Faleye, F J.ogundaini AO., Olugbade AT. (2012). Antibacterial & Antioxidant Activities of Citrus Paradisi, *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 3.(1), 63-66.

FAO, (2019), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Pérdida y desperdicio de alimento, [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/food-loss-and-food-waste/es/>

[Último acceso 1/09/2019]

- Ferrari, R. A., Pighinelli, A. L. M. T., & Park, K. J. (2011). Biodiesel production and quality. *Biofuel's Engineering Process Technology*, 1, 221-240.

-Garcia-Garcia, G., Stone, J., & Rahimifard, S. (2019). Opportunities for waste valorisation in the food industry—A case study with four UK food manufacturers. *Journal of cleaner production*, 211, 1339-1356.

-Giroto, F., Alibardi, L., & Cossu, R. (2015). Food waste generation and industrial uses: a review. *Waste management*, 45, 32-41.

- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*, 16(1), 33-50.

-Hashemi S.M.B., Khaneghah A.M., Koubaa M., Barba F., Abedi E., Niakousari M., Tavakoli J., 2018, Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties, *Process Biochemistry* 65, 197–204.

-Heleno, S. A., Diz, P., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. (2016). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 197, 1054–1063.

-Ho, S. C., & Lin, C. C. (2008). Investigation of heat treating conditions for enhancing the anti-inflammatory activity of citrus fruit (*Citrus reticulata*) peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(17), 7976-7982.

-Iqbal, S., & Bhangar, M. I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100(1), 246-254.

-Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., & Akbar, J. (2008). Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food Research International*, 41(2), 194-200.

- Ismail, M., Mariod, A., & Bagalkotkar, G. (2010). Fatty acid composition and antioxidant activity of oils from two cultivars of cantaloupe extracted by supercritical fluid extraction. *Grasas y aceites*, 1 (37-44), 61.

-Jang, H. D., Chang, K. S., Chang, T. C., & Hsu, C. L. (2010). Antioxidant potentials of buntan pumelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its ethanolic and acetified fermentation products. *Food Chemistry*, 118(3), 554-558.

-Kaya, A., Tekin, A. R., & Öner, M. D. (1993). Oxidative stability of sunflower and olive oils: comparison between a modified active oxygen method and long term storage. *LWT-Food Science and Technology*, 26(5), 464-468.

- Kelebek, H. (2010). Sugars, organic acids, phenolic compositions and antioxidant activity of Grapefruit (*Citrus paradisi*) cultivars grown in Turkey. *Industrial Crops and Products*, 32(3), 269-274.

-Khan, M. M., Iqbal, M., Hanif, M. A., Mahmood, M. S., Naqvi, S. A., Shahid, M., & Jaskani, M. J. (2012). Antioxidant and antipathogenic activities of citrus peel oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 15(6), 972-979.

-Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732.

-Landines, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J. & Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y tecnología alimentaria*. 25 (4): 726 – 732.

-Lemes, R. S., Alves, C. C., Estevam, E. B., Santiago, M. B., Martins, C. H., SANTOS, T. C. D., ... & Miranda, M. L. (2018). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Citrus aurantifolia* leaves and fruit peel against oral pathogenic bacteria. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2), 1285-1292.

-Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos”, *Diario Oficial de la Federación*. [En línea] Disponible en:

http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/pdf/263_190118.pdf

[Último acceso el 3/10/2019]

-Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H., ... & Thankappan, S. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*, 6(2), 426-464.

-Ling, S. S. C., Chang, S. K., Sia, W. C. M., & Yim, H. S. (2015). Antioxidant efficacy of unripe banana (*Musa acuminata* Colla) peel extracts in sunflower oil during accelerated storage. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, 14(4).

-Lopresto C.G., Petrillo F., Casazza A.A., Aliakbarian B., Perego P., Calabro V. (2014) A non-conventional method to extract D-limonene from waste lemon peels and comparison with traditional Soxhlet extraction. *Separation and Purification Technology* 137, 13–20.

- Madhavi, D. L., Deshpande, S. S., & Salunkhe, D. K. (1995). *Food antioxidants: Technological: Toxicological and health perspectives*. CRC Press.

-Mandadi, K. K., Jayaprakasha, G. K., Bhat, N. G., & Patil, B. S. (2007). Red Mexican grapefruit: A novel source for bioactive limonoids and their antioxidant activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 62(3-4), 179-188.

-Márquez-Ruiz, G., Ruiz-Méndez, M. V., & Velasco, J. (2014). Antioxidants in frying: analysis and evaluation of efficacy. *European journal of lipid science and technology*, 116(11), 1441-1450.

Matthäus, B. (2010). Oxidation of edible oils. *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Volume 2: Management in different industry sectors*, 183-238

-Mohdaly, A. A. A., Sarhan, M. A., Mahmoud, A., Ramadan, M. F., & Smetanska, I. (2010). Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. *Food Chemistry*, 123(4), 1019-1026.

- Mirabella, N., Castellani, V., & Sala, S. (2014). Current options for the valorization of food manufacturing waste: a review. *Journal of cleaner production*, 65, 28-41.

- Mohammadpour, M., Sadeghi, A., Fassihi, A., Saghaei, L., Movahedian, A., & Rostami, M. (2012). Synthesis and antioxidant evaluation of some novel ortho-hydroxypyridine-4-one iron chelators. *Research in pharmaceutical sciences*, 7(3), 171.

- Nielsen, S. S. (Ed.). (2010). *Food analysis* (pp. 139-141). New York: Springer.

- NMX-F-089-S-1978. Determinación de extracto etéreo (método soxhlet) en alimentos. foodstuff-determination of ether extract (soxhlet). normas mexicanas. dirección general de normas

-NMX-F-101. Método de prueba para la determinación del índice de acidez en aceites y grasas vegetales o animales.

- NMX-F-109-1982. Alimentos-aceite de oliva-especificaciones

-NMX-F-152-S. Alimentos para humanos. Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de yodo por el método de Wijs.

-NMX-F-154. Método de prueba para la determinación del índice de peróxido en aceites y grasas vegetales o animales.

-NMX-F-428-1982. ALIMENTOS. DETERMINACIÓN DE HUMEDAD (MÉTODO RÁPIDO DE LA TERMOBALANZA).

- NOM-043-SSA2-2012, servicios básicos de salud. Promoción y educación para la salud en materia alimentaria. Criterios para brindar orientación.

-Oboh, G., & Ademosun, A. O. (2012). Characterization of the antioxidant properties of phenolic extracts from some citrus peels. *Journal of food science and technology*, 49(6), 729-736.

- O'Keefe, S. F., & Pike, O. A. (2010). Fat characterization. In *Food analysis* (4^a ed.) Springer, Boston, EUA. (pp. 239-260).

- Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International*, 74, 10-36.

- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(11), 3122-3128.

Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agr Food Chem*. 2001;49:4619-26.

-Palacios S., Bertoni A., Rossi Y., Santander R., Urzúa A. (2009). Efficacy of Essential Oils from Edible Plants as Insecticides Against the House Fly, *Musca Domestica* L. *Molecules*, 14, 1938-1947.

-Parfitt, J., Barthel, M., & Macnaughton, S. (2010). Food waste within food supply chains: quantification and potential for change to 2050. *Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences*, 365(1554), 3065-3081.

Páucar, G. R., López, E. V., Glorio, P., & Baquerizo, M. (2015). Oxidative stability and estimate of the shelf life of sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Scientia Agropecuaria*, 6(3), 155-163

-Payne, M., W. Hurst, K. Miller, C. Rank y D. Stuart. 2010. Impact of fermentation, drying, roasting, and Dutch processing on epicatechin and catechin content of cacao beans and cocoa ingredients. *J. Agr. Food Chem.* 58(19), 10518-10527.

- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem*, 1(1), 106.

-Rasheed, S., Imran, M., Rehman, S., Farooq, A., Begum, I., Kanwal, F., & Mitu, L. (2017). Scavenging Activity of Grapefruit Peel and Seed Extract, a Natural Source of Antioxidant for the Stabilization of Soybean and Sunflower Oil. *REVISTA DE CHIMIE*, 68(7), 1466-1469.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.

-Reyes, B., Guerra, D., & Zuleta, H. (2014). *Annona diversifolia* seed oil as a promising nonedible feedstock for biodiesel production. *Industrial Crop and Products*. 52, 400-404.

-Safdar M., Kausar T., Jabbar S., Mumtaz A., Ahad K., Saddozai A. (2017). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of food and drug analysis*, 25, 488 – 500.

-SAGARPA, (2016). Planeación agrícola nacional (2016-2030) CITRICOS, LIMON, NARANJA Y TORONJA. SAGARPA [En línea] Disponible en:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257073/Potencial-Citricos-parte_uno.pdf

[Último acceso 11/10/2019]

Sadeghi, E., Mahtabani, A., Etmianan, A., & Karami, F. (2016). Stabilization of soybean oil during accelerated storage by essential oil of *Ferulago angulata* Boiss. *Journal of food science and technology*, 53(2), 1199-1204.

-Satari, B., & Karimi, K. (2018). Citrus processing wastes: Environmental impacts, recent advances, and future perspectives in total valorization. *Resources, Conservation and Recycling*, 129, 153-167.

Saval, S. (2012). Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro. *BioTecnología*, 16(2), 14-46.

Schulz, H., Schrader, B., Quilitzsch, R., & Steuer, B. (2002). Quantitative analysis of various citrus oils by ATR/FT-IR and NIR-FT Raman spectroscopy. *Applied spectroscopy*, 56(1), 117-124

-SEDEMA inventario de residuos sólidos 2017 – CDMX . [en línea] Disponible en: <https://www.sedema.cdmx.gob.mx/programas/programa/residuos-solidos>

[Último acceso 13/08/2019]

-Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.

-Shahidi, F., & Zhong Y. (2005). Measurement of antioxidant activity. *Journal Functional Foods*. 18 (B), 757 – 781.

-Sharma K., Mahato N., Cho M.W., Ph.D., Lee Y.R., 2017, Converting citrus wastes into value-added products: Economic and environmentally friendly approaches, *Nutrition* 34 (2017) 29–46

-Siddhuraju, P (2007). Antioxidant activity of poliphenolic compounds extractes from defatted raw and dry heated Tamarindus seed coat. *Food science and technology*. (40), 982-990.

-Singh, V., Gupta, A., & Verma, A. (2013). Review on natural compounds used for antioxidant activity. *Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical*. 4(2), 936-949.

-Singleton, V., Orthofer, R., & Lamuela, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. (14) 299, 152-178.

-Soquetta, M. B., Terra, L. D. M., & Bastos, C. P. (2018). Green technologies for the extraction of bioactive compounds in fruits and vegetables. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 400-412.

-Song J., Kim J., Lee N., Yang J., Lee H. (2016) Acaricidal and Insecticidal Activities of Essential Oils against a Stored-Food Mite and Stored-Grain Insects, *Journal of Food Protection*, Vol. 79, No. 1, Pages 174-178.

-Sotelo, L., Alvis, A., & Arrázola, G. (2015). Evaluación de epicatequina, teobromina y cafeína en cáscaras de cacao (*Theobroma cacao* L.), determinación de su capacidad antioxidante. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 9(1), 124-134.

-Sotelo, S. E. C., & Benítez, S. O. (2013). Gestión sostenible de los residuos sólidos urbanos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(3), 7-8.

-Sumaya-Martínez, M. T., Diéguez, T. S., Cansino, N. D. S. C., García, E. A., & Sampedro, J. G. (2010). Innovación de productos de alto valor agregado a partir de la tuna mexicana. *Revista mexicana de agronegocios*, 27, 435-441.

-Turan, S. (2014). Efficiency of various plant essential oils in stabilization of canola oil and of its purified triacylglycerols. *Journal of Essential Oil Research*, 26(3), 166-176.

-Uçkun Kiran, E., Trzcinski, A. P., & Liu, Y. (2015). Platform chemical production from food wastes using a biorefinery concept. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(8), 1364-1379.

- Wu, C., Wang, F., Liu, J., Zou, Y., & Chen, X. (2015). A comparison of volatile fractions obtained from *Lonicera macranthoides* via different extraction processes: ultrasound, microwave, Soxhlet extraction, hydrodistillation, and cold maceration. *Integrative medicine research*, 4(3), 171-177.

-Xi W., Zhang G., Jiang D., Zhou Z. (2015) Phenolic compositions and antioxidant activities of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfadyen) varieties cultivated in China, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 66:8, 858-866.

Xiong, X., Iris, K. M., Tsang, D. C., Bolan, N. S., Ok, Y. S., Igalavithana, A., ... & Vikrant, K. (2019). Value-added Chemicals from Food Supply Chain Wastes: State-of-the-art Review and Future Prospects. *Chemical Engineering Journal*, 121983.

-Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 55(2), 330-335.

- Yang, S. A., Jeon, S. K., Lee, E. J., Shim, C. H., & Lee, I. S. (2010). Comparative study of the chemical composition and antioxidant activity of six essential oils and their components. *Natural Product Research*, 24(2), 140-151.

-Yim, H. S., Chye, F. Y., Liow, M. L., & Ho, C. W. (2013). Antioxidant potential of *Pleurotus porrigens* Extract and application in sunflower oil during accelerated storage. *Chiang Mai J. Sci*, 40(1), 34-48.

-Zahoor S., Anwar F., Mehmood T., Sultana B., Gadir R. (2016). Variation in antioxidant attributes and individual phenolics of citrus fruit peels in relation to different species and extraction solvents. *J. Chil. Chem. Soc.*, 61, nº 2, 2884 - 2889

-Zhang, J. (2007). Flavonoids in Grapefruit and commercial grapefruit juices: concentration, distribution, and potential health benefits. In *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* (Vol. 120, pp. 288-294).

-Zhang, Y., Yang, L., X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplement with carnosic acid compared with synthetic antioxidant during accelerated storage. *Food Chemistry*. 118.656-662.