



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE
EN EXTRACTOS DE CÁSCARA DE MANDARINA (*CITRUS
RETICULATA*)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

DIANA GARCÍA ANDALUZ



CDMX

AÑO 2024



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: Lino Joel Reyes Trejo

VOCAL: Bertha Julieta Sandoval Guillén

SECRETARIO: Eva Florencia Lejarazo Gómez

1er. SUPLENTE: Ma. Rosa González Tepale

2° SUPLENTE: Benito Reyes Trejo

SITIOS DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 208, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, EDIFICIO B, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES, ÁREA DE QUÍMICA, DEPARTAMENTO DE PREPARATORIA AGRÍCOLA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO.

ASESOR DEL TEMA: Dr. LINO JOEL REYES TREJO

SUPERVISOR TÉCNICO: Dr. BENITO REYES TREJO

SUSTENTANTE: DIANA GARCÍA ANDALUZ

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

SADER	Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
TBHQ	Terbutilhidroquinona
EM	Extracción por maceración
FC	Folin Ciocalteu
EAU	Extracción Asistida por Ultrasonido
EAM	Extracción Asistida por Microondas
SFE	Extracción por Fluidos Súper Críticos
FRAP	Poder Antioxidante Reductor Férrico
DPPH	2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
ABTS	2,2-Azinobis-3-etil-benzo-tiazolina-6-ácido sulfónico

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS	2
2.1 Objetivo General	2
2.2 Objetivos Particulares	2
2.3 Hipótesis del trabajo	2
3. ANTECEDENTES	3
➤ 3.1 Residuos sólidos alimentarios	3
➤ 3.1.1 Valorización de residuos alimentarios	4
➤ 3.1.2 Valorización de residuos de cítricos	5
➤ 3.1.3 Valorización de residuos de mandarina (<i>Citrus reticulata</i>)	5
➤ 3.2 Antioxidantes	7
➤ 3.3 Técnicas de extracción de antioxidantes	9
➤ 3.3.1 Extracción por maceración (EM)	10
➤ 3.3.2 Extracción por Soxhlet	10
➤ 3.3.3 Extracción asistida por ultrasonido (EAU)	10
➤ 3.3.4 Extracción asistida por microondas (EAM)	11
➤ 3.3.5 Extracción asistida por fluidos supercríticos	12
➤ 3.4 Métodos para la evaluación de los antioxidantes	13
➤ 3.4.1 Método de Folin-Ciocalteu	13
➤ 3.4.2 Método FRAP	14
➤ 3.4.3 Método DPPH	14
➤ 3.4.4 Método ABTS	14
➤ 3.5 Estabilidad oxidativa de compuestos lipídicos	14
➤ 3.5.1 Índice de acidez	15
➤ 3.5.2 Índice de yodo	15
➤ 3.5.3 Índice de peróxidos	16
4. METODOLOGÍA	17
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
6. CONCLUSIONES	41
7. BIBLIOGRAFÍA	42
8. ANEXO	53

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Nombre	Página
Figura 1.	Residuos Alimentarios	4
Figura 2.	Partes que componen la anatomía de un cítrico	6
Figura 3.	Estructuras químicas de algunos antioxidantes naturales	8
Figura 4.	Estructuras químicas de algunos antioxidantes artificiales	8
Figura 5.	Estructuras químicas de algunos antioxidantes presentes en la cáscara de mandarina	9
Figura 6.	A) Representación: célula vegetal y burbujas, B) Ruptura de la pared celular y C) Difusión del disolvente y liberación de los compuestos	11
Figura 7.	Extracción Asistida por Microondas (EAM)	12
Figura 8.	Diagrama de obtención y evaluación de extractos de cáscara de mandarina (<i>citrus reticulata</i>)	17
Figura 9.	Trozos de cáscara de mandarina	19
Figura 10.	Secado en horno	19
Figura 11.	Cáscara seca	20
Figura 12.	Molienda de la cáscara	20
Figura 13.	Tamizado de la cáscara de mandarina molida	20
Figura 14.	Determinación de humedad	21
Figura 15.	Extracción de grasa por método Soxhlet	21
Figura 16.	Evaporación	22
Figura 17.	Maceración con metanol	23
Figura 18.	Maceración con etanol	23
Figura 19.	Extracción por Ultrasonido	23
Figura 20.	Disolución del extracto	24
Figura 21.	Microplaca para el método (FC)	24
Figura 22.	Lector de microplacas	25
Figura 23.	Microplaca para el método (FRAP)	25
Figura 24.	Muestras de aceite	26
Figura 25.	Determinación de la estabilidad oxidativa	26

ÍNDICE DE GRÁFICAS

No. Gráfica	Nombre	Página
Gráfica 1.	Rendimiento promedio de los extractos de cáscara de mandarina.	31
Gráfica 2.	Contenido de fenoles totales presentes en los extractos de cáscara de mandarina.	32
Gráfica 3.	Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de cáscara de mandarina.	33
Gráfica 4.	Índice de acidez de las muestras a través del tiempo usando aceite de soya como control, aceite de soya adicionado con extracto de cáscara de mandarina y aceite de soya adicionado con BHT a 55°C por 28 días.	35
Gráfica 5.	Índice de yodo de las muestras a través del tiempo usando aceite de soya como control, aceite de soya adicionado con extracto de cáscara de mandarina y aceite de soya adicionado con BHT a 55°C por 28 días.	37
Gráfica 6.	Índice de peróxidos de las muestras a través del tiempo usando aceite de soya como control, aceite de soya adicionado con extracto de cáscara de mandarina y aceite de soya adicionado con BHT a 55°C por 28 días.	39

ÍNDICE DE TABLAS

No. Tabla	Nombre	Página
Tabla 1.	Composición fitoquímica de la mandarina.	6
Tabla 2.	Dimensiones promedio de mandarinas (<i>Citrus reticulata</i>).	29
Tabla 3.	Extracción de grasa por el método Soxhlet y maceración.	30
Tabla 4.	Resultados del porcentaje de acidez expresado en g ácido oleico/100g muestra en aceite de soya con extracto de cáscara de mandarina, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.	36
Tabla 5.	Resultados del índice de yodo expresado en g I ₂ /g muestra en aceite de soya con extracto de cáscara de mandarina, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.	38
Tabla 6.	Resultados del índice de peróxidos expresado en meq peróxidos/kg muestra en aceite de soya con extracto de cáscara de mandarina, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.	40
Tabla 7.	Rendimientos promedio de los extractos obtenidos en cada extracción.	53
Tabla 8.	Contenido de fenoles totales presentes en los extractos de cáscara de mandarina.	53
Tabla 9.	Actividad antioxidante de los extractos de cáscara de mandarina.	54

1. INTRODUCCIÓN

Los desperdicios de alimentos se encuentran entre los residuos de mayor producción a nivel mundial, la FAO ha estimado que alrededor de un tercio de las fuentes alimentarias (alrededor de 1.300 millones de toneladas por año) se descartan y desperdician en todo el mundo.

Las investigaciones realizadas sobre desechos de frutas y hortalizas han revelado que las cáscaras, comúnmente consideradas residuos, contienen un alto porcentaje de fitoconstituyentes valiosos y compuestos bioactivos.

Los cítricos son el cultivo frutal arbóreo más producido en el mundo, con más de 130 millones de toneladas al año. Alrededor del 33% de los cítricos se procesan industrialmente para la producción de jugo, por lo que se generan más de 15 millones de toneladas de desechos por año, principalmente cáscaras, membranas y semillas, Estos desechos cítricos en particular la cáscara, son ricos en compuestos bioactivos.

La mandarina cuyo género y especie es *Citrus reticulata*, pertenece a la familia de las Rutáceas. A nivel nacional, en el 2022 se tuvo una producción de casi 300 mil toneladas. Su cultivo se da en 20 entidades del país, siendo Puebla, Veracruz y Nuevo León líderes en su producción. Es común encontrar este fruto por el comportamiento de su estacionalidad desde octubre hasta febrero (SADER 2022).

La industria alimentaria requiere grandes cantidades de antioxidantes fenólicos sintéticos como BHA, BHT y TBHQ, los cuales se han utilizado durante más de 60 años como retardantes de la oxidación (Fereidoon et al, 2015). Sin embargo, existen estudios que demuestran la toxicidad de estos compuestos, causando problemas hepáticos y cancerígenos.

Se han llevado a cabo investigaciones para emplear antioxidantes naturales con el propósito de obtener alternativas más seguras y efectivas que puedan sustituir a los antioxidantes sintéticos que se utilizan como conservadores de alimentos.

La mandarina es reconocida por su riqueza en nutrientes y compuestos bioactivos que presentan propiedades medicinales (Wang et al, 2019), así como capacidad antioxidante para atenuar los procesos oxidativos.

El presente trabajo tiene como objetivo extraer, cuantificar y evaluar la actividad antioxidante de los polifenoles presentes en la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*) con el propósito de incorporar el extracto obtenido y usarlo como antioxidante en un aceite comestible.

2. OBJETIVO GENERAL E HIPÓTESIS

2.1 Objetivo General

Extraer, cuantificar y evaluar el poder antioxidante de los polifenoles que se encuentran en la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), con la finalidad de poder incorporar el extracto más activo y así poder utilizarlo como antioxidante en la estabilización de un aceite comestible.

2.2 Objetivos Particulares

- Definir el método de extracción (maceración, Soxhlet y extracción asistida por ultrasonido), así como el disolvente (acetona, etanol, metanol y etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético) de manera secuencial con el cual se obtendrá el mayor rendimiento.
- Determinar que procedimiento y disolvente presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos empleando el método de Folin-Ciocalteu (FC), así como la actividad antioxidante empleando el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).
- Evaluar la estabilidad oxidativa en el aceite de soya del extracto con mayor actividad antioxidante de la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), el cual sería empleado como posible antioxidante natural, comparándolo con un antioxidante sintético (BHT), tomando en consideración algunos parámetros de calidad del aceite: índice de acidez, índice de yodo e índice de peróxidos.

2.3 Hipótesis de trabajo

El extracto de mayor actividad antioxidante obtenido de la cáscara de mandarina será probado para estabilizar una muestra de aceite comercial, con lo cual se espera un mayor retraso en el deterioro del aceite con respecto a los antioxidantes sintéticos.

3. ANTECEDENTES

3.1 Residuos sólidos alimentarios

El aumento constante de la población humana exige una mayor cantidad de alimentos y productos alimenticios, por lo que se acumulan desechos agrícolas y alimentarios (Awasthi et al, 2018). El desperdicio de alimentos es actualmente un problema importante, tanto en los países en desarrollo como en los países no desarrollados. Las pérdidas se refieren a la disminución de la masa disponible de alimentos para el consumo humano en las fases de producción, post-cosecha, almacenamiento y transporte. El desperdicio de alimentos se refiere a las pérdidas derivadas de la decisión de desechar los alimentos que todavía tienen valor y se asocia principalmente con el comportamiento de los vendedores mayoristas y minoristas, servicios de venta de comida y consumidores (FAO, 2023).

A nivel global, entre un cuarto y un tercio de los alimentos producidos anualmente para consumo humano se pierde o desperdicia. Esto equivale a cerca de 1 300 millones de toneladas de alimentos, lo que incluye el 30% de los cereales, entre el 40 y el 50% de las raíces, frutas, hortalizas y semillas oleaginosas, el 20% de la carne y productos lácteos y el 35 % de los pescados (FAO, 2023)

El desperdicio de alimentos contamina el medio ambiente, provocando al mismo tiempo una pérdida abundante de nutrientes valiosos. Los desechos de alimentos se han reciclado tradicionalmente como alimento para animales y fertilizantes, o se han depositado en vertederos junto con otros desechos. Sin embargo, la creciente demanda de protección ambiental, junto con el deseo de conservación de recursos, están fomentando una valorización más eficiente de los residuos de alimentos para la producción de ingredientes alimentarios, productos químicos y biocombustibles con valor agregado (Lin et al, 2013).

Con el concepto de desarrollo sostenible, los investigadores están realizando esfuerzos continuos para mejorar los residuos y convertirlos en productos de alto valor (Sindhu et al,2019). Ver Figura 1.



Figura 1. Residuos alimentarios. (Huerta et al, 2018).

3. 1.1 Valorización de residuos de alimentos

La valorización de los residuos se refiere a la reutilización, reciclaje o compostaje de desechos, productos o fuentes de energía, generalmente a través de un proceso industrial en el que los residuos se recuperan y transforman en materias primas para ser utilizadas en el ciclo de vida de otro producto (Avellán et al, 2022).

En particular, los desechos y/o subproductos de frutas y verduras acumulados por las agroindustrias alimentarias generalmente están compuestos por semillas, cáscaras y orujos (Mahato et al, 2019). Independientemente del origen, estas biomásas residuales subexplotadas son ricas en diferentes ingredientes bioactivos funcionales, incluidos carotenoides, compuestos fenólicos, fibra dietética, ácidos grasos poliinsaturados, etc. Por lo que se están buscando alternativas para poder aprovechar estos recursos.

El orujo de manzana, la cáscara de cítricos y la pulpa de remolacha azucarera son las principales fuentes para la recuperación y producción de pectina comercial (Naqash et al, 2017). Sin embargo, se han considerado otras fuentes como: cáscaras de plátano, granada, mango y papaya (Nascimento et al, 2018; Khamsucharit et al, 2018; Koubala et al, 2014; Yang et al, 2018). El D-limoneno, que se puede extraer de la cáscara de naranja, es otro terpeno importante debido a sus propiedades bioactivas, especialmente acción antimicrobiana, así como a su viabilidad económica (Mamma et al, 2014). La cáscara de mango contiene ácidos protocatéquicos, mangiferina y β -caroteno, conocidos por sus propiedades antimicrobianas, antidiabéticas, antiinflamatorias y anticancerígenas (Mirza et al, 2021).

3.1.2 Valorización de residuos de cítricos

Los cítricos se cultivan ampliamente en todo el mundo y se convierten principalmente en productos alimenticios como: bebidas, frutas enlatadas y mermeladas (Cai et al, 2020, Huang et al, 2021). El valor nutricional de los cítricos es bien reconocido. Numerosas investigaciones científicas han demostrado las propiedades beneficiosas de los productos alimenticios a base de cítricos sobre enfermedades degenerativas, como las enfermedades cardiovasculares, la reducción de la glucosa en la sangre, el cáncer y la hipertensión (Grupta et al, 2021, Park et al, 2021). Las cáscaras, semillas y residuos de membranas de cítricos generados en la industria procesadora, representan aproximadamente entre el 50% y el 60% del peso total de la fruta (Mahato et al, 2019). Por tanto, existe una necesidad urgente de explorar la posible conversión de estos residuos en productos económicamente valiosos. En consecuencia, muchos estudios se han centrado en conocer los usos potenciales de la cáscara de cítricos en aplicaciones alimentarias industriales, debido a que las cáscaras contienen varios componentes activos como: fibra dietética, pectina, proteínas, pigmentos, flavonoides y aceites esenciales (Huang et al, 2021). Por lo que se están llevando a cabo técnicas de extracción efectivas para obtener estos compuestos (Zárate-Vilet et al, 2020). Los estudios han demostrado un gran campo de aplicaciones de estos compuestos bioactivos en muchas industrias, incluida la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica, dirigidas a diferentes propiedades biológicas, como actividades antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, antiinflamatorias y antidiabéticas (Liu et al, 2021, Panwar et al, 2021).

Entre los desechos de cítricos, el orujo de cítricos también puede incluirse como fuente de pectina (Zannini et al, 2021). Las semillas de cítricos, que son ricas en aceites naturales, también se utilizan en la industria cosmética para la preparación de jabones, lociones corporales, aerosoles corporales y otros productos cosméticos (Rosa et al, 2019).

3.1.3 Valorización de residuos de mandarina (*Citrus reticulata*)

La mandarina común (*Citrus reticulata*) es un cítrico milenario, reconocido por su riqueza en nutrientes y compuestos bioactivos que presentan potenciales valores medicinales (Wang et al, 2019) y capacidad antioxidante, la anatomía general de los frutos cítricos (cómo la mandarina) se ilustra en la Figura 2. Además de la mandarina común, existen variedades de mandarinas y sus híbridos, que probablemente se producen como resultado de una mutación natural (Putnik et al, 2017).

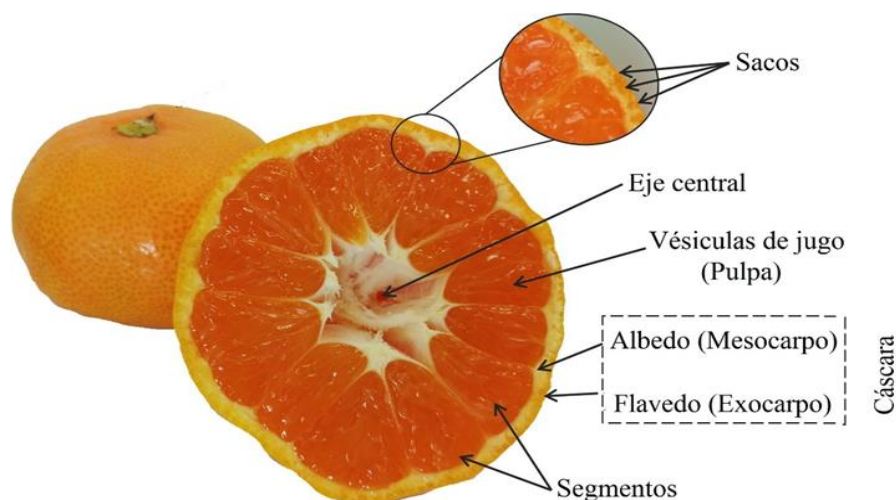


Figura 2. Partes que componen la anatomía de un cítrico. (Sigurnjak et al, 2023).

Estos atributos de la mandarina se deben a su abundancia en compuestos fitoquímicos, que incluyen metabolitos primarios y secundarios (Lado et al, 2018). Sus metabolitos primarios están compuestos principalmente de azúcares, ácidos orgánicos, lípidos y vitaminas, mientras que los metabolitos secundarios están representados por fenólicos, flavonoides y limonoides para determinar su sabor y otros beneficios para la salud, (Saini et al, 2019). Ver Tabla 1.

Tabla 1. Composición fitoquímica de la mandarina.

Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
Ácidos orgánicos: ácido cítrico	Ácidos fenólicos: ácido hidroxicinámico: ácido felúrico, p-cumárico, cafeico y sinápico
Lípidos: triacigliceroles	Flavonoides: Hesperidina, tangeretina y naringina
Azúcares: Glucosa, fructosa y sacarosa	Limonoides: limonina y nomilina
Aminoácidos: aminoácidos no esenciales: alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, serina y prolina.	Carotenoides: β -criptoxantina y violaxantina
	Vitaminas y minerales: Potasio y vitamina C
	Aceite esencial: D-Limoneno
	Alcaloides: Sinefrina

El uso de la cáscara exhibe muchas propiedades beneficiosas en los alimentos, como mejorar el rendimiento de cocción, reducir los costos de formulación y mejorar la textura de los alimentos (Mahato et al, 2019), es una rica fuente de ácido ascórbico, flavonoides, hesperidina, naringina y eriocitrina,

Estos compuestos fitoquímicos poseen potencial antioxidante, inhibiendo así las reacciones enzimáticas responsables del daño oxidativo (Nishad et al, 2018). También son una excelente fuente de carotenoides. Estos pigmentos naturales han llamado la atención en la industria alimentaria como excelentes soluciones a los colorantes alimentarios sintéticos nocivos (Rózyło et al, 2020).

Se utilizan las cáscaras en muchas industrias alimentarias como ingredientes aromatizantes (Cohen et al, 2019). Además de su amplia utilización como agentes aromatizantes en alimentos y medicinas, los aceites esenciales también exhiben propiedades antibacterianas, antifúngicas e insecticidas (Fakayode et al, 2018).

3.2 ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes que se encuentran en los alimentos son una categoría heterogénea de moléculas (Tuberoso et al, 2013). Los antioxidantes son compuestos o sistemas que pueden interactuar de forma segura con los radicales libres y detener la reacción en cadena antes de que se dañen las moléculas vitales.

Pueden emplear varios mecanismos: a) evitar la formación de peróxidos, b) quelar iones metálicos para que estos no puedan producir especies reactivas o descomponer peróxidos, c) eliminando especies que inicien la peroxidación, d) romper la reacción en cadena autooxidativa y e) reducir las concentraciones localizadas de O₂ (Asimi et al, 2013).

Generalmente, los antioxidantes se clasifican en dos tipos, sintéticos y naturales, según su fuente (Gulcin et al, 2020). Los antioxidantes naturales, como la vitamina C, los tocoferoles, los carotenoides y los flavonoides, se encuentran con frecuencia en frutas, verduras, nueces y cereales (Gulcin et al, 2020; Petcu et al, 2023; Chaudhary et al, 2023). Ver Figura 3.

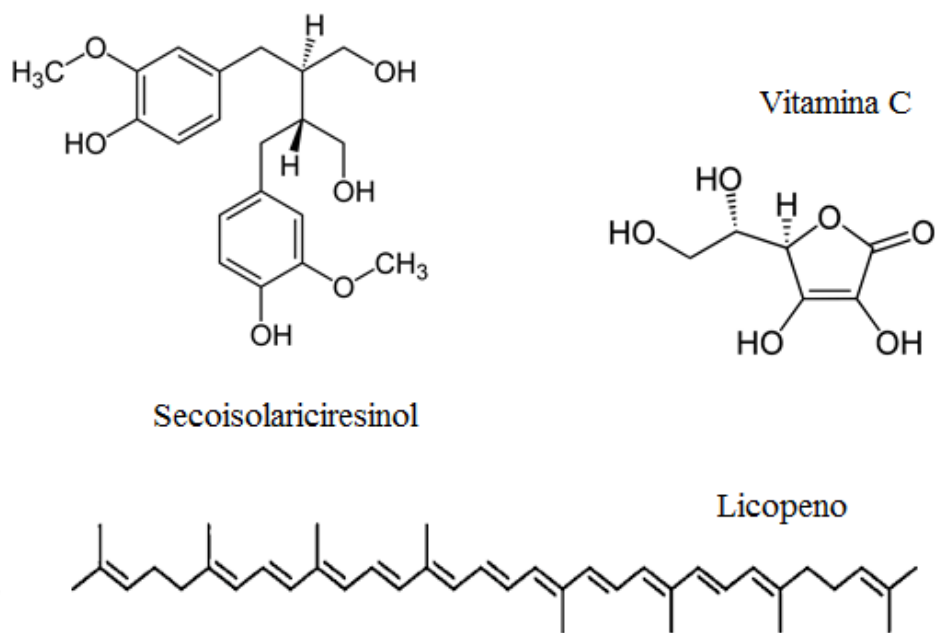


Figura 3. Estructuras químicas de algunos antioxidantes naturales (Gulcin et al, 2020).

Por otro lado, los antioxidantes sintéticos, como el hidroxianisol butilado y el isohidroxitolueno butilado (BHA, BHT) y la terc-butilhidroquinona (TBHQ), se sintetizan mediante métodos químicos (Gulcin et al, 2012).

Los antioxidantes sintéticos suelen tener mejores propiedades antioxidantes, pero también poseen mayores efectos secundarios que los antioxidantes naturales. Por ejemplo, BHA y BHT son tóxicos y cancerígenos. (Gulcin et al, 2020; Anraku et al, 2018; Anbudhasan et al, 2014; Kornienko et al, 2019). Ver Figura 4.

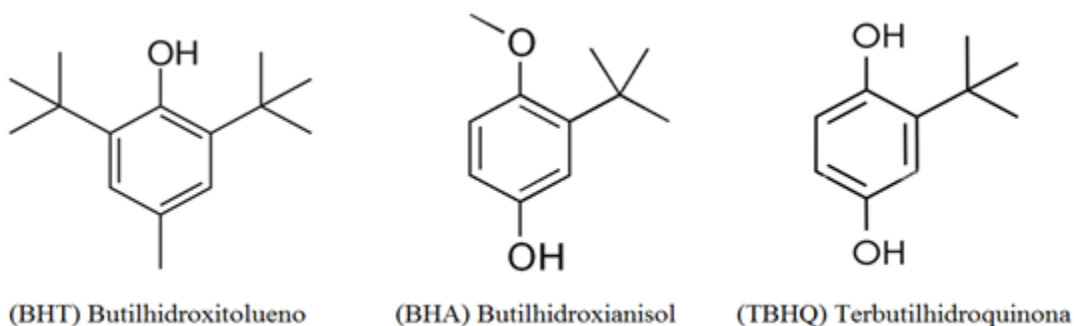


Figura 4. Estructuras químicas de algunos antioxidantes artificiales. (Landines et al, 2009)

La cáscara de mandarina presenta un fuerte potencial de actividad antioxidante debido a su enriquecimiento en flavonoides como hesperidina, naringina, tangeritina, nobiletina y rutina que representan el 86%, por otro lado, en el caso de los carotenoides se tiene a la β -criptoxantina (Ferreira et al, 2018), Entre los ácidos fenólicos tenemos el ácido hidroxicinámico, es decir, principalmente ácido ferúlico, ácidos p-cumárico, cafeico y sinápico (Putnik et al, 2017). Ver Figura 5.

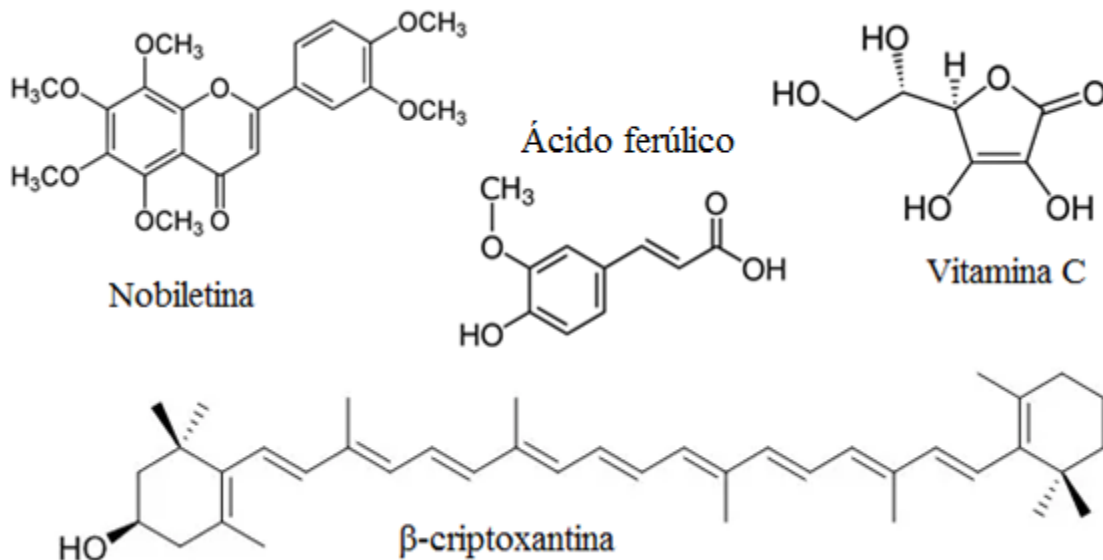


Figura 5. Estructuras químicas de algunos antioxidantes presentes en la cáscara de mandarina (Saini et al, 2019).

3.3 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE ANTIOXIDANTES

Las técnicas de extracción utilizadas para la recuperación de compuestos bioactivos se pueden distinguir en dos categorías: métodos convencionales (maceración y Soxhlet) y métodos de extracción ecológicos (extracción asistida por ultrasonido, extracción asistida por microondas y extracción asistida por fluidos supercríticos) por mencionar algunos ejemplos. En cualquier caso, todas las técnicas extractivas tienen los siguientes objetivos: (a) extraer los compuestos deseados, minimizando su degradación y sin alterar sus propiedades; (b) obtener el extracto en la forma más estable y pura; (d) aumentar el rendimiento de extracción de los compuestos deseados; y (e) reducir los costos y el tiempo de proceso (Rifna et al, 2021).

3.3.1 EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN (EM)

El método por maceración ha encontrado uso en la extracción de compuestos bioactivos de residuos debido a su ventaja de ser aplicable a compuestos termolábiles (Zhang et al, 2018). Consiste en mezclar la matriz sólida con el disolvente de extracción adecuado. Primero, el material sólido se reduce a pequeños trozos para aumentar la superficie de contacto con el disolvente. El sistema se puede colocar bajo agitación o una fuente de calor para aumentar el rendimiento de extracción (Albuquerque et al, 2018). La maceración es un método simple pero la duración del tiempo de extracción es larga y la cantidad de solvente requerida es mayor.

3.3.2 EXTRACCIÓN POR SOXHLET

La técnica de extracción Soxhlet fue desarrollada originalmente por Franz Ritter Von Soxhlet para la extracción de lípidos de un material sólido y, desde entonces, también se ha adaptado para compuestos bioactivos de diversas fuentes naturales. La extracción por Soxhlet consiste en colocar el material sólido en la parte central del extractor, el cual está conectado directamente a un matraz de destilación que contiene el disolvente. Este último se lleva a ebullición haciéndolo pasar a través de la cámara de extracción hasta el condensador. El disolvente vuelve a caer en forma de condensado llevando consigo los analitos extraídos (Lama et al, 2020; Aravind et al, 2021). En comparación con la maceración, esta técnica requiere una menor cantidad de disolvente porque sufre un proceso de reciclaje. Es un método muy sencillo que no requiere filtración tras la extracción. Sin embargo, el tiempo del proceso es muy largo (Rasul et al, 2018).

3.3.3 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDO (EAU)

La aplicación ultrasónica, comúnmente conocida como extracción asistida por ultrasonido (EAU), es una tecnología no convencional que utiliza ondas con una frecuencia superior a 10 MHz (Chandrapala et al, 2015). En un principio su aplicación se centró en la conservación de alimentos, pero en la última década también se ha utilizado para la extracción de compuestos bioactivos (principalmente polifenoles). Debido a la facilidad del proceso se han descrito ventajas como reducción del tiempo de extracción, aumento del rendimiento del extracto, uso de agua como disolvente para evitar el uso de disolventes orgánicos y así disminuir los riesgos ambientales. Por estas razones, los EAU se consideran un "método de extracción ecológico" (Chemat et al, 2017).

Las ondas ultrasónicas pueden alterar las paredes celulares, ya que algunas son lo suficientemente fuertes como para formar burbujas en el líquido, las cuales colapsan y aumentan la interacción entre el solvente y los compuestos presentes en las muestras; Este fenómeno se conoce como cavitación (Kaderides et al, 2015; Winggaard et al, 2012). El colapso provocado produce suficiente energía para las reacciones químicas, por lo que las extracciones realizadas por ultrasonidos (USN) son de mayor rendimiento y calidad que las obtenidas por métodos convencionales (Knorr et al, 2011). Ver Figura 6.

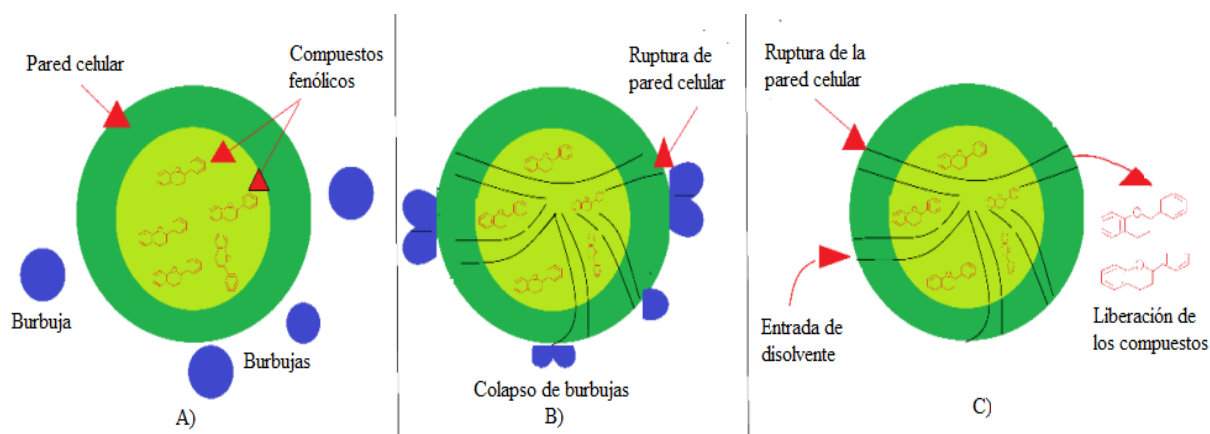


Figura 6. A) Representación: célula vegetal y burbujas, B) Ruptura de la pared celular y C) Difusión del disolvente y liberación de los compuestos.

3.3.4 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (EAM)

En la extracción asistida por microondas (MAE), se caracteriza por utilizar ondas electromagnéticas, donde se genera calor dentro del material debido a la conducción iónica y la rotación dipolar de las moléculas internas. Este calor generado es responsable de la ruptura de la pared celular, lo cual ayuda a que los compuestos bioactivos salgan al sistema de extracción (Chuyen et al, 2018). También, la porosidad provoca que se favorezca la transferencia de moléculas de desecho y como consecuencia, una mejora en el rendimiento de los extractos (Wang et al, 2006; Gil et al, 2013) sin afectar los compuestos. Los bajos tiempos de extracción y consumo de energía son las principales ventajas. Por otro lado, el corto tiempo requerido para su aplicación reduce el uso de disolventes y mejora su efectividad en comparación con otros métodos de extracción (Bouras et al, 2015). Ver Figura 7.

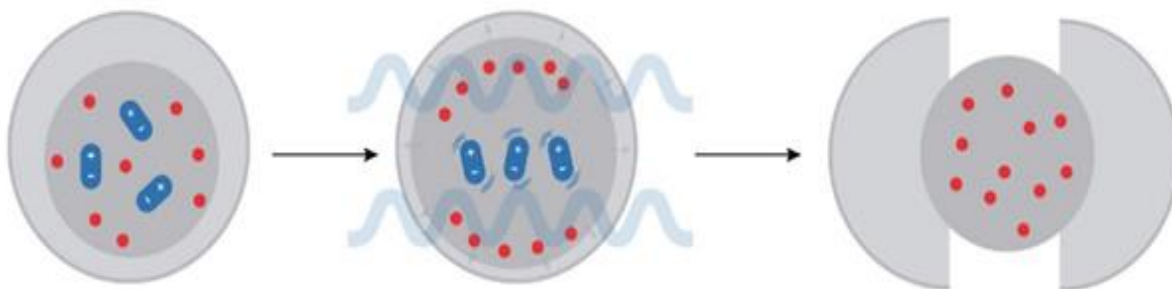


Figura 7. Extracción asistida por microondas (EAM)

3.3.5 EXTRACCIÓN ASISTIDA POR FLUIDOS SUPERCRTICOS

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es un procedimiento que combina fluidos a altas temperaturas y presiones con valores cercanos a los puntos críticos. Estos fluidos tienen una alta difusividad y baja densidad, viscosidad y tensión superficial en comparación con los disolventes orgánicos (Reinoso et al, 2006). Debido a estas características, los materiales sólidos porosos pueden ingresar de manera más efectiva que con solventes líquidos, lo que resulta en una transferencia de masa y extracción más rápida que con los métodos de extracción con solventes. Esta técnica está diseñada para reemplazar las técnicas tradicionales de preparación de muestras que incluyen varios pasos y que utilizan grandes cantidades de disolventes orgánicos (Stratakos et al, 2016).

El dióxido de carbono (CO_2) es el fluido supercrítico más utilizado en este método, a menudo para la extracción de compuestos bioactivos de forma segura, amigable con el medio ambiente y con la ventaja de afectar mínimamente a los compuestos extraídos (Ndayishimiye et al, 2018). Diferentes parámetros como la temperatura, la presión, SFE- CO_2 y la presencia de cosolventes como etanol y metanol, podrían influir en la eficiencia de este método (M'hiri et al, 2014). El poder de solvatación del fluido SFE- CO_2 se puede aumentar o disminuir manipulando la presión y/o la temperatura, lo que da como resultado una alta selectividad y separación de solutos disueltos (Ndayishimiye et al, 2018).

3.4 MÉTODOS PARA LA EVALUACION DE LOS ANTIOXIDANTES

Los métodos e instrumentos utilizados para medir la actividad de los antioxidantes han logrado avances notables en las últimas décadas. Los primeros métodos miden la eficacia de los antioxidantes contra la formación de especies particulares de productos de oxidación y, por tanto, se basan en medir la oxidación de lípidos. Se han utilizado varias pruebas químicas junto con tecnologías de detección automatizadas y altamente sensibles para evaluar la actividad antioxidante mediante métodos especiales, como por ejemplo la actividad eliminadora de diferentes tipos de radicales libres (Shahidi et al, 2015).

3.4.1 Método de Folin-Ciocalteu

La prueba de Folin-Ciocalteu es un método bien conocido destinado a determinar el contenido fenólico total (TPC). Se utilizó ampliamente en estudios clínicos y nutricionales para medir el contenido de polifenoles totales en alimentos de origen vegetal y muestras biológicas. Este método fue diseñado originalmente para analizar proteínas, pero luego fue adoptado por Singleton, Orthofer y Lamuela-Raventos (1999) para analizar los componentes fenólicos del vino, después de lo cual se convirtió en una prueba de rutina para la evaluación antioxidante de alimentos y plantas (Blainski et al, 2013).

Este método se basa en la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu con compuestos fenólicos en estado alcalino. La naturaleza química exacta del reactivo de Folin-Ciocalteu no está claramente definida, pero se cree que puede contener un complejo de ácido fosfomolibdico/fospotungstico que se reduce para obtener un cromóforo azul con máxima absorción a 765 nm (Magalhaes et al, 2008).

La prueba de Folin-Ciocalteu está asociada al poder reductor de los antioxidantes fenólicos. El ácido gálico es el estándar de referencia comúnmente utilizado y los resultados del TPC generalmente se expresan como equivalente de ácido gálico (Karadag et al, 2009).

3.4.2 Método FRAP

El método FRAP (poder antioxidante reductor férrico) el cual se basa en la reducción mediante antioxidantes del complejo ion férrico-TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina), en donde la unión de Fe^{2+} al ligando da una tonalidad azul marino muy fuerte. La absorbancia se puede medir para cuantificar la cantidad de hierro reducida y se puede correlacionar con la cantidad de antioxidantes (Pellegrini et al, 2003; Thaipong et al, 2006; Gil et al, 2002). Se han utilizado como referencias trolox o ácido ascórbico (Pisoschi et al, 2009).

3.4.3 Método DPPH

La prueba de neutralización DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) se basa en la donación de electrones de los antioxidantes para neutralizar el radical DPPH. La reacción va acompañada de un cambio del color del DPPH medido a 517 nm, y la decoloración actúa como un indicador. La actividad antioxidante mediante el método de neutralización de DPPH a menudo se informa como CE_{50} , que se define como la concentración eficiente del antioxidante necesaria para reducir la concentración inicial de DPPH en un 50% (Foti et al, 2015).

3.4.4 Método ABTS

La prueba mide la capacidad de los antioxidantes para neutralizar el radical catión estable (2,2'-azinobis (3 – ácido etilbenzotiazolina-6-sulfónico)) (ABTS \bullet +), un cromóforo azul-verde de máxima absorción a 734 nm, cuya intensidad disminuye en presencia de antioxidantes ABTS. El grado de decoloración del color azul-verde, cuantificado como una caída repentina de la absorbancia a 734 nm, depende de la duración de la reacción, la actividad antioxidante intrínseca y la concentración de la muestra (Durmaz et al, 2012).

3.5 ESTABILIDAD OXIDATIVA DE COMPUESTOS LIPÍDICOS

Las grasas y los aceites, especialmente aquellos que contienen un alto nivel de ácidos grasos insaturados, pueden sufrir reacciones de oxidación con la formación de productos secundarios peligrosos, sobre todo después de tratamientos térmicos drásticos (Groodveld et al, 2020). Se pueden utilizar numerosas estrategias para aumentar la estabilidad oxidativa del aceite durante el procesamiento y almacenamiento, que incluyen: evitar la luz, el oxígeno y las altas temperaturas, cambiar las condiciones de extracción del aceite para aumentar el contenido de compuestos bioactivos y agregar compuestos antioxidantes (Grosshagauer et al, 2019).

El hidroxitolueno butilado (BHT) y el hidroxianisol butilado (BHA), pero también la butilhidroquinona terciaria (TBHQ), son ejemplos comunes de antioxidantes sintéticos utilizados en la industria del aceite vegetal para retardar las reacciones de oxidación (Carocho et al, 2013). Dado que se han informado algunos efectos nocivos de los antioxidantes sintéticos (EFSA 2012), las autoridades reguladoras internacionales han establecido límites a las cantidades de antioxidantes sintéticos permitidas en los alimentos.

Durante la última década, en todo el mundo, la preferencia de los consumidores por sustitutos naturales de los aditivos sintéticos está aumentando (EFSA 2012), principalmente por razones ideacionales/emocionales (Scott et al, 2020). Esta preferencia se basa principalmente en la idea de que los compuestos naturales son más saludables que los sintéticos (Rozin et al, 2004).

3.5.1 Índice de acidez

El índice de acidez está relacionado con el proceso de oxidación lipídica de un aceite, es decir, representa una medida del grado de descomposición del aceite por acción de lipasas u otras causas. Este proceso tiende a acelerarse con la luz y el calor (Flores et al, 2021).

Por otro lado, el índice de acidez de un aceite o grasa se define como la cantidad de miligramos de hidróxido de potasio (KOH) que se necesitan para neutralizar la acidez libre por gramo de muestra. Este valor del grado de acidez se expresa haciendo referencia al porcentaje de ácido oleico. En algunos casos, puede referirse al ácido palmítico, al ácido láurico u otros (Rodríguez et al, 2019).

3.5.2 Índice de Yodo

El índice de yodo, es un método para determinar las insaturaciones del aceite. Por lo que se puede determinar disolviendo una muestra del aceite en un disolvente que sea no polar como el ciclohexano, que va a reaccionar con el ácido acético glacial en una reacción redox. Esta reacción se lleva a cabo en condiciones de oscuridad para evitar reacciones laterales de radicales inducidos por la luz que podrían afectar el resultado (Flores et al, 2021).

El índice de yodo, se expresa de manera convencional por el peso de yodo absorbido por cien partes en peso de grasa. Para la determinación de este índice, el método de Wijs es el más utilizado, el lípido debe reaccionar con una solución de monoclóruo de yodo, en una mezcla de ácido acético y tetraclóruo de carbono, liberando el exceso de yodo y valorándolo con tiosulfato de sodio (Lam et al, 2020).

3.5.3 Índice de Peróxidos

Los productos iniciales en la oxidación (rancidez) de aceites y de grasas son los hidroperóxidos (R-OOH); sin embargo, se denominan normalmente peróxidos. La determinación de peróxidos se basa en su capacidad de liberar yodo de una disolución de yoduro de potasio en ácido acético glacial (Herrera et al, 2003). El yodo formado se valora con una disolución patrón de tiosulfato de sodio, utilizando una disolución de almidón como indicador.

El índice de peróxidos se expresa en miliequivalentes de peróxido por kg de aceite o grasa (Herrera et al, 2003).

4. METODOLOGÍA

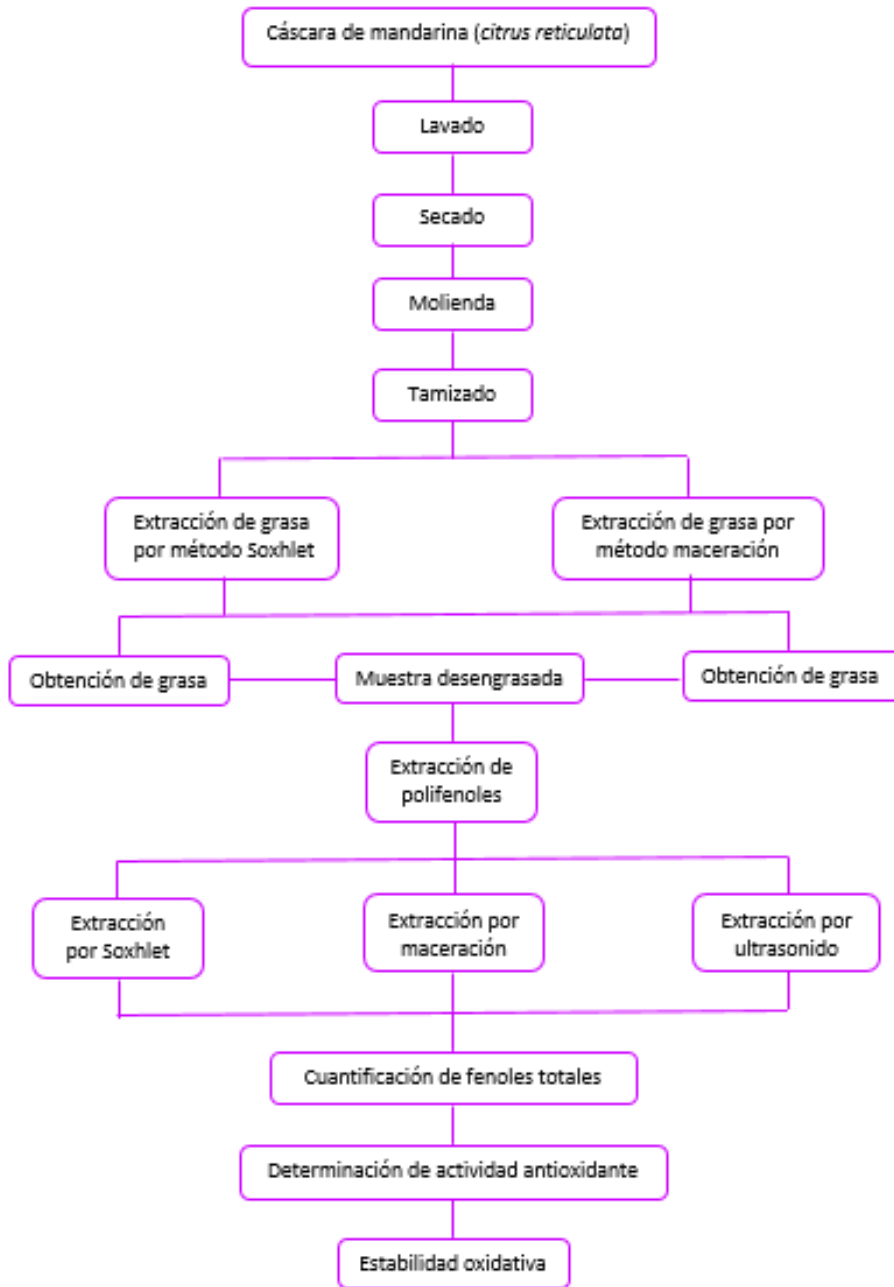


Figura 8. Diagrama de obtención y evaluación de extractos de cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*).

4.1 Equipos

Los equipos que se mencionan a continuación permitieron obtener los extractos naturales en la cáscara de mandarina (*citrus reticulata*), para después determinar y cuantificar los antioxidantes presentes.

Los equipos que se utilizaron son: vernier marca Pretul, balanza analítica marca Sientech modelo SAT 20 con un rango de 0.01g a 80g, licuadora marca Oster ® modelo 6640- 13, parrilla eléctrica. Otros equipos más sofisticados como: evaporador rotativo (rotavapor) marca Büchi modelo R124, termobalanza marca Ohaus modelo MB45, lector de microplacas con dispensadores automáticos marca Bio Tek modelo Synergy 2, sonicador ultrasonic cleaner marca sper scientific modelo 100 004 con frecuencia de 42KHz 60 W, incubadora marca ECOSHEL modelo 9165.

4.2 Reactivos

En el caso de los reactivos se emplearon disolventes como hexano, el cual tiene la función de extraer la materia grasa, también se utilizaron otros disolventes como: agua destilada, acetona, etanol, metanol, etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético, los cuales se emplearon para la obtención de los extractos naturales de la cáscara de mandarina. Después se emplearon otro tipo de reactivos como: TROLOX (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), TPTZ (2,4,6 Tripiridil-s triazina), reactivo de Folin-Ciocalteu, los cuales fueron utilizados para la determinación de la actividad antioxidante (FRAP) y para la cuantificación de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).

Para el análisis de la estabilidad oxidativa del aceite de soya comercial se emplearon ácidos, bases e indicadores de pH, así como el reactivo de Wijs los cuales ayudaron a monitorear los cambios en la estabilidad oxidativa que se efectuaban en el aceite de prueba.

4.3 Material vegetal

Se colectaron 26 kg de mandarina (*citrus reticulata*) de la Central de Abasto de la Ciudad de México, ubicada en la alcaldía Iztapalapa en la Zona Metropolitana, proveniente del estado de Veracruz (municipio de Tlapacoyan) durante los meses de enero y febrero.

4.4 Limpieza y secado

Se limpió con agua corriente y después con agua destilada la mandarina (*citrus reticulata*) para eliminar rastros de suciedad o presencia de algún organismo vivo en ellas, posteriormente se procedió a secar cada una sobre un papel absorbente para luego pelar manualmente las mandarinas y poder retirar el exocarpo con la menor cantidad de mesocarpo, luego proceder a cortar en trozos pequeños (1 cm x 1 cm), nuevamente se colocaron sobre un papel absorbente para eliminar cualquier resto de humedad. La cáscara de mandarina se secó en un horno durante 48 horas a una temperatura de 40°C. Con lo anterior se obtuvo un total de 1.63 Kg de harina de cáscara de mandarina. Ver Figura 9 y 10.



Figura 9. Trozos de cascara de mandarina.



Figura 10. Secado en horno.

4.5 Determinación de las características físicas de las mandarinas

Se tomaron 30 mandarinas al azar, de las cuales se procedió a medir el grosor, largo y ancho de cada una con un Vernier de resolución 0.05 cm y su masa, con los datos obtenidos se obtuvo el promedio y la desviación estándar del tamaño de las mandarinas.

4.6 Molienda

Las cáscaras secas fueron sometidas a un proceso de molienda empleando una licuadora marca Oster®, esto para obtener un polvo fino con la finalidad de facilitar la liberación de los extractos de interés. Ver Figura 11 y 12.



Figura 11. Cáscara seca.



Figura 12. Molienda de la cáscara.

4.7 Tamizado y homogeneizado

El polvo fino es tamizado a través de un tamiz de malla #20 con el fin de obtener un tamaño de partícula de 0.8 mm. Ver Figura 13.



Figura 13. Tamizado de la cáscara de mandarina molida.

4.8 Determinación de la humedad

La determinación de la humedad presente en 0.5 g de muestra limpia y seca (cáscara en polvo fino) en una termobalanza de la marca OHAUS modelo MB45, se realizaron las determinaciones a 100°C realizando la determinación por triplicado. Ver Figura 14.



Figura 14. Determinación de humedad.

4.9 Extracción de grasa o desengrasado por método de Soxhlet

Se pesaron 30 g de una muestra de cáscara de mandarina seca, limpia, molida y tamizada, la cual se introdujo en un cartucho de papel filtro, el cual se colocó en el extractor Soxhlet con 300 mL de hexano (para desgrasar la muestra) durante un tiempo de 6 h (Apraj et al, 2016) con algunas modificaciones. Una vez terminado el tiempo de extracción, se filtró y concentró el extracto para evaporar a presión reducida con ayuda de un evaporador rotatorio Büchi modelo R124 para eliminar el disolvente y obtener solamente el extracto puro (Apraj et al, 2016) con algunas modificaciones). Ver Figura 15.



Figura 15. Extracción de grasa por método Soxhlet.

4.10 Extracción secuencial de polifenoles por el método de Soxhlet

El método de extracción se realizó empleando 4 disolventes distintos con diferente polaridad cada uno, estos son: acetona, etanol, metanol y etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético como disolvente. Una vez desengrasada la muestra, se pesaron 30 g de está colocándolos nuevamente en el extractor Soxhlet junto con 300 mL de disolvente por 6 horas. Lo anterior se realizó por cuadruplicado, sometiendo el extracto de cada uno de los disolventes mencionados a evaporación a presión reducida, empleando un evaporador rotatorio marca Büchi modelo R124 (Apraj et al, 2016) con algunas modificaciones. Ver Figura 16.



Figura 16. Evaporación.

4.11 Extracción secuencial de polifenoles por el método de maceración

Se realizó una extracción secuencial empleando 4 disolventes distintos con diferente polaridad cada uno, estos son: acetona, etanol, metanol y etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético como disolvente. Una vez desengrasada la muestra. En un matraz Erlenmeyer se pesaron 50 g de esta y se adicionó el disolvente en proporción 1:5 y se dejó reposar durante 24 horas, el cambio de lavado con el mismo disolvente se realizó cada 24 horas 3 veces consecutivas. Lo anterior se realizó por cuadruplicado, sometiendo cada uno de los extractos de cada uno de los disolventes a evaporación a presión reducida, empleando un evaporador rotatorio marca Büchi modelo R124 (Mohamed et al, 2021) con algunas modificaciones. Ver Figura 17 y 18.



Figura 17. Maceración con metanol.



Figura 18. Maceración con etanol.

4.12 Extracción secuencial de polifenoles por ultrasonido (EUA)

Se realizó una extracción secuencial empleando 4 disolventes distintos con diferente polaridad cada uno, estos son: acetona, etanol, metanol y etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético como disolvente. En 5 matraces Erlenmeyer de 125 mL, se pesaron 10 g de muestra seca y desengrasada para después adicionar el disolvente en proporción 1:10. Los matraces se colocaron en un equipo de ultrasonido Ultrasonic cleaner marca sper scientific modelo 100 04: frecuencia 42 KHz, 60 W a 25°C. Se realizaron a cinco tiempos diferentes: 0 min, 30 min, 45min, 60min y 75 min para evaluar el tiempo óptimo de extracción. Después de concluir el tiempo de extracción se filtraron los extractos al vacío y posteriormente se sometió el extracto a evaporación a presión reducida, empleando un evaporador rotatorio marca Büchi modelo R124 con la finalidad de concentrar el extracto obtenido. Se calculó el rendimiento de los extractos obtenidos para posteriormente mantener en refrigeración. Todo el proceso se realizó por triplicado (Mašković et al, 2016). Ver Figura 19.



Figura 19. Extracción por ultrasonido.

4.13 Cuantificación de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

El contenido de fenoles totales en los extractos se llevó a cabo con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Alioune et al., 2019), realizando algunas modificaciones y empleando un lector de microplacas con dispensadores automáticos Bio Tek, modelo Synergy 2.

En un tubo falcon de 115 mm x 30 m, con capacidad de 50 mL, se pesó 0.1g de extracto, se adicionó 10 mL de metanol al 80% para disolución. Posteriormente se realizó la preparación de una curva de ácido gálico, se pesaron 12.5 mg de ácido gálico en un 1 mL de etanol, se aforó a 25 mL con agua destilada. A partir de esta disolución se tomaron alícuotas de: 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 y 180 μL aforando a 1000 μL con agua destilada. Ver Figura 20.

Para realizar la lectura en una microplaca se le adicionaron 25 μL de las disoluciones de ácido gálico o extracto de la muestra, 125 μL agua destilada, 20 μL de disolución Folin-Ciocalteu y 30 μL Na_2CO_3 al 20%. Como blanco se usó una mezcla de 150 μL agua destilada, 20 μL de disolución Folin-Ciocalteu y 30 μL Na_2CO_3 al 20%. La microplaca se dejó reposar en oscuridad durante 30 minutos hasta observar una coloración azul y llevarla al equipo lector de microplacas programando la lectura de absorbancia a 760 nm (Mašković., et al 2016; Farahmandfar., et al 2019; Oikeh., et al 2020). A partir de los datos de la curva de calibración, se calculó el contenido fenólico expresado como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg de EAG/g de extracto). Ver Figura 21.

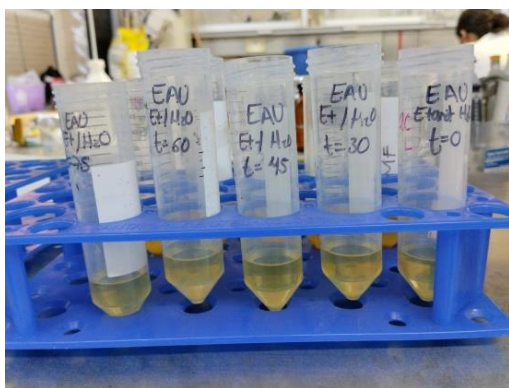


Figura 20. Disolución del extracto.

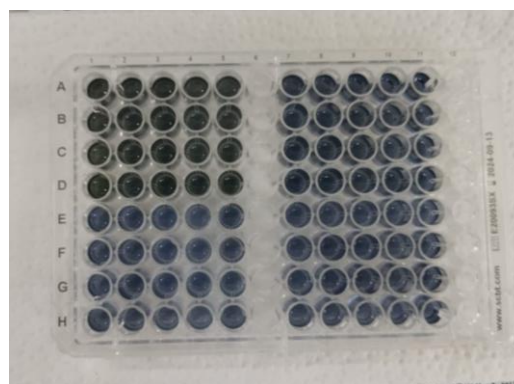


Figura 21. Microplaca para el método (FC).

4.14 Determinación de la actividad antioxidante por el método de FRAP

La actividad antioxidante en los extractos se determinó mediante el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), donde se empleó un lector de microplacas Bio Tek modelo Synergy 2. Ver Figura 22.

En un tubo falcon de 115 mm x 30 m, con capacidad de 50 mL, se pesó 0.1g de extracto, se adicionó 10 mL de metanol al 80% para disolución. Se realizó la preparación de una curva de Trolox, pesando 12.5 mg de Trolox aforando a 50 mL con metanol al 80%. A partir de esta disolución se tomaron alícuotas de: 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 y 600 μ L aforando a 1 mL.

El reactivo FRAP es una disolución que se prepara con 1 mL de TPTZ 10 mM (31.233 mg de TPTZ en 10 mL de HCl 40 mM), 1 mL de una disolución de cloruro férrico hexahidratado 20 mM (54.03 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de agua destilada) y 10 mL de un buffer de acetato 300 mM a pH 3.6 (4.624 g de acetato de sodio trihidratado y 18.2 mL de ácido acético glacial en 100 mL de agua destilada). Para realizar la lectura se le adicionaron: 20 μ L de las disoluciones de Trolox o dilución óptima del extracto, 180 μ L de la disolución FRAP y 60 μ L agua destilada. Como blanco se usaron 260 μ L FRAP. Se dejó reposar la reacción en oscuridad durante 10 minutos. Posteriormente, transcurrido el tiempo se tomó la lectura de absorbancia a 595 nm. A partir de los datos de la curva, la actividad antioxidante fue calculada mediante un modelo de regresión lineal y los valores se reportaron como micromol de Equivalentes de TROLOX por gramo de extracto (μmol de ET/g de extracto) (Singanusong., et al 2014; Farahmandfar., et al 2019). Ver Figura 23.



Figura 22. Lector de microplacas.

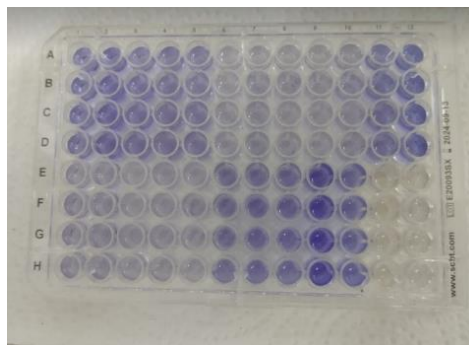


Figura 23. Microplaca para el método (FRAP).

4.15 Estabilidad oxidativa

Analizando los resultados obtenidos en la determinación de fenoles totales y de la actividad antioxidante de los extractos de cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), se escogió el extracto que tuvo el valor más alto de actividad antioxidante para probar así su eficacia como antioxidante natural en una muestra comercial de aceite de soya, el cual se utilizó a una concentración menor (150 ppm) que la indicada en la norma mexicana NMX-F-223-SCFI-2011 en el caso del BHT se declara como máximo permitido 200 ppm de antioxidante sintético, por lo que se va a comparar la estabilidad oxidativa de una muestra con antioxidante natural (extracto de cáscara de mandarina), una muestra de aceite con el antioxidante sintético (BHT) contra el aceite sin antioxidante (muestra control).

La evaluación se llevó a cabo realizando previamente seis lavados con etanol al aceite de soya (Nutrioli) para eliminar cualquier antioxidante presente que pudiera intervenir en las lecturas.

Una vez limpia la muestra se dividió por triplicado en tres lotes de 20 mL cada uno, en el cual el primer lote de aceite (muestra control) no se le adicionó ningún tipo de antioxidante, al segundo lote se le añadieron 0.009 mg del extracto más activo (el que presentó mayor actividad antioxidante) y al tercer lote se le añadieron 0.009 mg del antioxidante sintético (BHT), en ambos casos la adición de extracto natural y BHT se disolvió previamente en metanol. Los viales fueron sometidos a una temperatura de 55°C en incubadora marca ECOSHEL modelo 9165, posteriormente se llevaron a cabo monitoreos cada 7 días durante 4 semanas, para después determinar el índice de acidez (NMX-F-101-SCFI-2012), índice de yodo (NMX-F-152-SCFI-2011) e índice de peróxidos (NMX-F-154-SCFI-2010) por triplicado para cada muestra de aceite. Ver Figura 24 y 25.

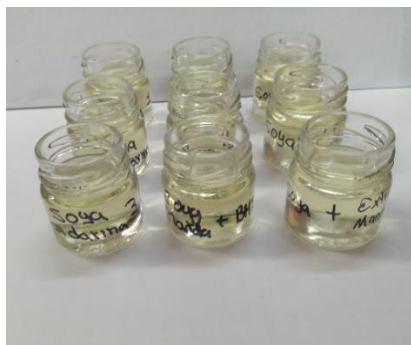


Figura 24. Muestras de aceite.



Figura 25. Determinación de la estabilidad oxidativa.

4.15.1 Índice de acidez

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesaron 1.0 g de aceite y se adicionaron 25 mL de etanol al 95% con 5 gotas de fenolftaleína. La mezcla se calentó a 50°C para después titularse con una solución normalizada de KOH 0.0086 N y agitación vigorosa hasta alcanzar un cambio de tonalidad rosa pálido estable por 30 segundos. Este método se efectuó por triplicado y un blanco como referencia. Posteriormente, se registró el volumen utilizado de KOH en cada caso para poder determinar el índice de acidez de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Acidez } \left(\frac{\text{g ácido oléico}}{100 \text{ g de aceite}} \right) = \frac{(V_1 - V_2)(N)(0.282 \text{ g/mEq})(100)}{\text{g de aceite}}$$

Dónde: V_1 y V_2 corresponden al volumen gastado de KOH empleado para la muestra y el blanco, respectivamente, N representa la normalidad de la solución de KOH y 0.282 es el miliequivalente químico del ácido oleico. Los valores obtenidos de índice de acidez se expresan como porcentaje de ácidos grasos libres, tomando como referencia en este caso el ácido oleico, por cien gramos de aceite.

4.15.2 Índice de yodo

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesaron 1.0 g de aceite y se adicionaron 5 mL de diclorometano para poder disolver el aceite y posteriormente añadir 5mL de reactivo de Wijs, se cubrió y se dejó reaccionar por 30 minutos en oscuridad con agitación ocasional. Después de retirar de la oscuridad, se le adicionaron 4 mL de solución de yoduro de potasio al 15% junto con 50 mL de agua destilada previamente hervida y a temperatura ambiente. Esta mezcla se tituló con agitación constante utilizando una solución estandarizada de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.093 N hasta alcanzar una tonalidad amarillo pálido, momento en el cual se adiciona 1 mL de solución de almidón al 1% como indicador y se continúa con la titulación hasta que desaparezca la coloración azul. Este método se efectuó por triplicado y un blanco como referencia. Posteriormente, se registró el volumen utilizado de tiosulfato de sodio en cada caso para poder determinar el índice de yodo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de yodo} \left(\frac{\text{g de } I_2}{100 \text{ g de muestra}} \right) = \frac{(V_1 - V_2)(N) \left(126.9 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right)}{\text{g de muestra}} \times 100$$

Dónde: V_1 y V_2 corresponden al volumen gastado de tiosulfato de sodio empleado para la muestra y el blanco, respectivamente, N representa la normalidad de la solución de tiosulfato de sodio y 126.9 es el peso molecular del yodo. Los valores obtenidos de índice de yodo se expresan como gramos de yodo absorbido por cien gramos de aceite o muestra.

4.15.3 Índice de peróxidos

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesaron 2.0 g de aceite y se disolvieron en 25 mL de una mezcla de ácido acético y diclorometano (3:2) con agitación y se adicionaron 1 mL de solución saturada de yoduro de potasio. La mezcla se cubrió y dejó reposar por un minuto en la oscuridad, posteriormente, se añadieron 30 mL de agua destilada previamente hervida y a temperatura ambiente. Esta mezcla se tituló con tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.093 N hasta alcanzar una tonalidad amarillo pálido, momento en el cual se adiciona 1 mL de solución de almidón al 1% como indicador y se continúa con la titulación hasta que desaparezca la coloración azul. Este método se efectuó por triplicado y un blanco como referencia. Posteriormente, se registró el volumen utilizado de tiosulfato de sodio en cada caso para poder determinar el índice de peróxidos de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de peróxidos} \left(\frac{\text{mEq de peróxidos}}{\text{kg de muestra}} \right) = \frac{(V_1 - V_2)(N)(1000)}{\text{g de muestra}}$$

Dónde: V_1 y V_2 corresponden al volumen gastado de tiosulfato de sodio empleado para la muestra y el blanco, respectivamente, N representa la normalidad de la solución de tiosulfato de sodio. Los valores obtenidos de índice de peróxidos se expresan como miliequivalentes de peróxidos por kilogramo de muestra o aceite.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Calidad de la cáscara de mandarina (limpieza y sanidad).

Limpieza y sanidad: La cáscara de mandarina (*Citrus Reticulata*) recolectada proviene de la Central de Abasto de la Ciudad de México y ubicada en la alcaldía Iztapalapa en la Zona Metropolitana y esta, a su vez proveniente del estado de Veracruz (municipio de Tlapacoyan) durante los meses de enero y febrero, se encontró sana, limpia, exenta de cualquier materia extraña visible.

5.2 Caracterización física de las mandarinas:

En la Tabla 2 se muestran las dimensiones promedio de mandarinas (*Citrus reticulata*) empleadas.

Tabla 2. Dimensiones promedio de mandarinas (*Citrus reticulata*).

Dimensión	Largo(cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)	Peso (g)
Valor	6.13 ± 0.72	7.47 ± 0.65	0.38 ± 0.13	168.46 ± 28.69

n= 30 \pm desviación estándar

Las dimensiones de peso, largo y ancho de las mandarinas de esta muestra resultan muy similares a las reportadas (Majid et al, 2011), tomando en cuenta un total de estas en la desviación estándar, ya que reportaron por separado las medidas de mínimo y máximo para cada característica de la mandarina.

5.3 Obtención de la harina a partir de la cáscara de mandarina seca.

Para poder aumentar la superficie de contacto y obtener mayor rendimiento en la obtención del extracto, la cáscara fue secada en un horno y molida, una vez obtenida la harina se realizó un tamizaje en malla No.20, y de esta manera poder obtener un tamaño de partícula equivalente a 0.84 mm.

5.4 Determinación de humedad

La estimación del porcentaje de humedad en la cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*) revela un promedio de $8.46 \pm 0.84\%$, este valor es cercano al porcentaje de humedad reportado, el cual tiene un intervalo del 7-10% (Domínguez et al, 2016).

5.5 Extracción del aceite de cáscara de mandarina (*Citrus Reticulata*)

En la Tabla 3. Se presentan los resultados promedio y rendimiento en la extracción de aceite por el método de Soxhlet y maceración.

Tabla 3. Extracción de grasa por el método de Soxhlet y maceración.

		Aceite extraído (g)	Rendimiento (%)
Soxhlet	Promedio	0.94	3.12
	Desviación Estándar	0.053	0.0013
Maceración	Promedio	3.28	6.56
	Desviación Estándar	0.061	0.0007

n=3 \pm desviación estándar

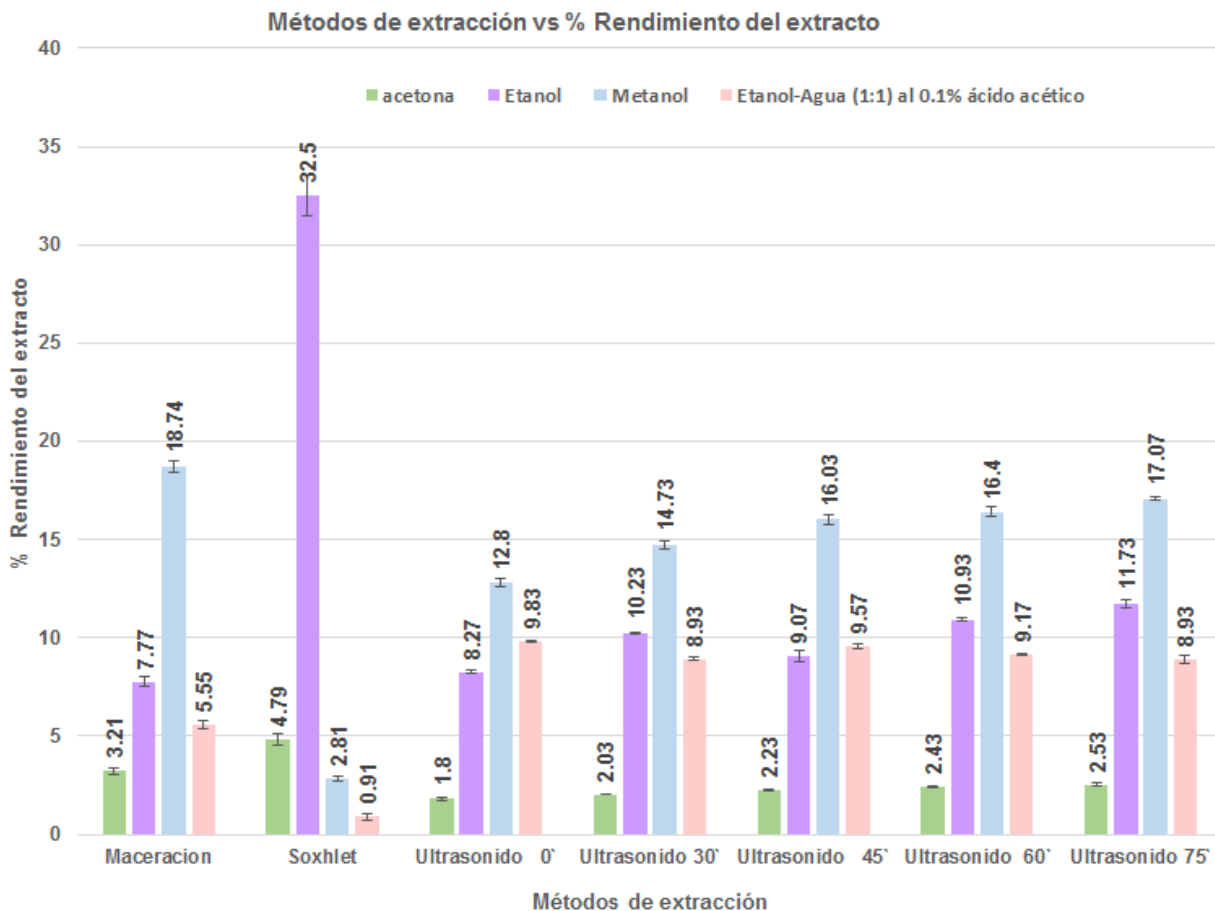
El porcentaje de aceite extraído por Soxhlet fue de $3.12 \pm 0.0013\%$, en el caso de maceración el porcentaje de aceite extraído fue de $6.56 \pm 0.0007\%$. Al comparar ambos métodos se observa un mayor porcentaje de rendimiento por el método de maceración en comparación con el método de Soxhlet.

5.6 Rendimientos obtenidos en la extracción de cáscara de mandarina (*Citrus Reticulata*)

Extracción mediante la técnica de maceración, Soxhlet y ultrasonido.

De la harina desengrasada obtenida de la cáscara de mandarina, se llevó a cabo la extracción de polifenoles empleando como métodos de extracción maceración, Soxhlet, y ultrasonido, cada método se llevó a cabo de manera secuencial la extracción con cuatro disolventes, en orden de polaridad creciente: acetona, etanol, metanol y etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético.

Los resultados obtenidos para el rendimiento promedio en cada extracción se presentan en la Gráfica 1 y Tabla 7 en el anexo.



Gráfica 1. Rendimiento promedio de los extractos de cáscara de mandarina.

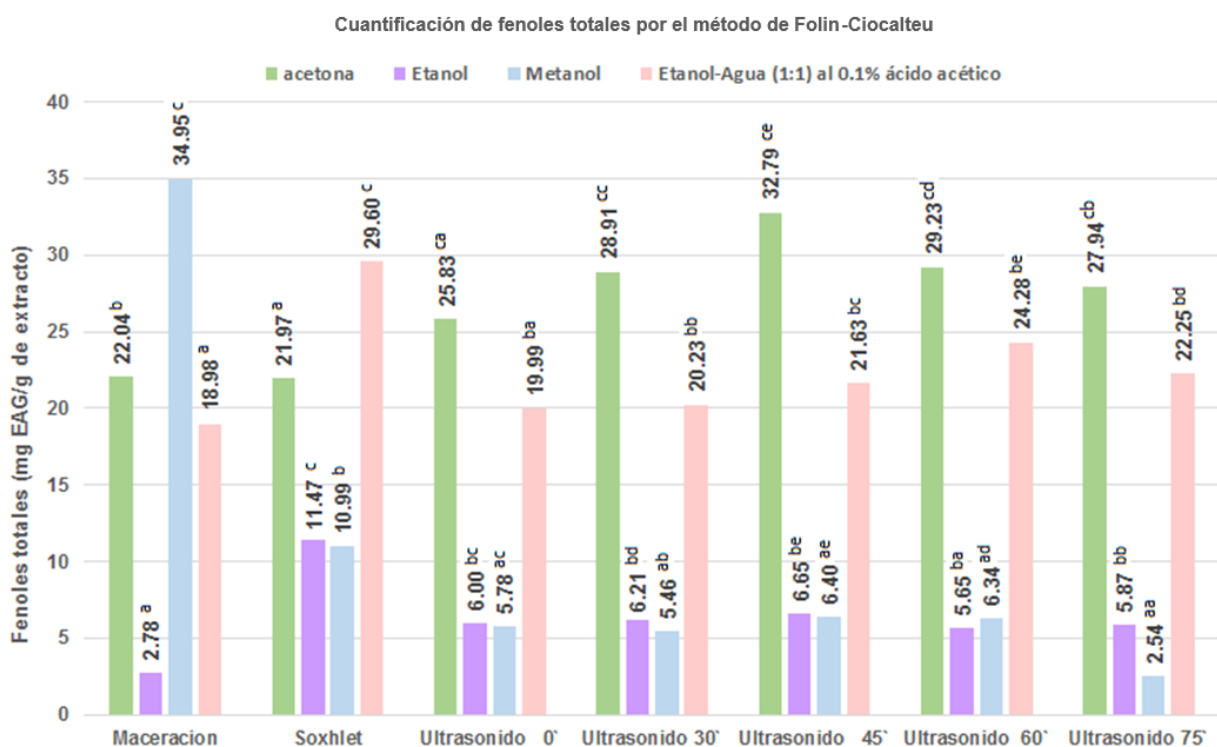
El método con mayor rendimiento de extracto es por Soxhlet utilizando etanol ($32.5 \pm 1.06\%$) como disolvente y en maceración utilizando metanol ($18.74 \pm 0.30\%$), para ultrasonido se obtuvo el mayor rendimiento con metanol a $75'$ ($17.07 \pm 0.07\%$), sin embargo, en el caso de ultrasonido utilizando diferentes disolventes y en sus demás tiempos se obtuvieron rendimientos más bajos, el mayor rendimiento se obtuvo para los extractos metanólicos seguido de los extractos etanólicos en comparación con los de acetona que son notoriamente los más bajos.

Los resultados obtenidos nos indican que el metanol y el etanol son disolventes más eficientes para extraer compuestos bioactivos de las cáscaras de mandarina, por otro lado, de estos dos disolventes se obtuvieron rendimientos más altos en el extracto metanólico, lo que indica que es eficaz para la extracción de este tipo de compuestos.

5.7 Cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu (FC)

La cáscara de mandarina contiene compuestos fenólicos, los cuales tienen actividad antioxidante, por lo anterior se cuantificó el contenido de fenoles totales en los diferentes extractos obtenidos empleando el método de Folin-Ciocalteu (Magalhaes et al, 2008).

En la Gráfica 2 y Tabla 8 en el anexo, se resume los resultados obtenidos del contenido de fenoles totales presentes en los extractos de cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), extraídos por diferentes métodos y disolventes.



Gráfica 2. Contenido de fenoles totales presentes en los extractos de cáscara de mandarina.

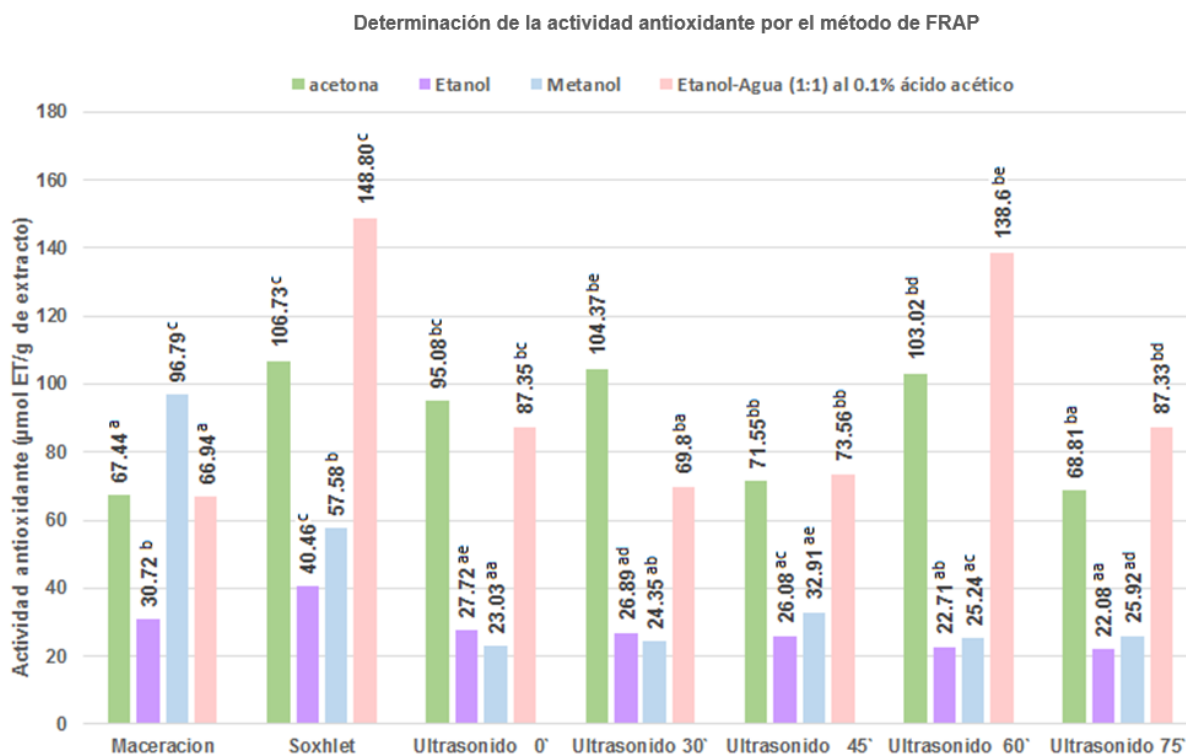
Como se puede observar el extracto con mayor contenido de fenoles es el obtenido por el método de maceración con metanol como disolvente (34.95 ± 4.43 mg de EAG/g de extracto) el cual coincide con el reportado en la literatura (Costanzo et al, 2022), seguido del extracto obtenido por el método de ultrasonido empleando como disolvente acetona a 45' (32.79 ± 3.38 mg de EAG/g de extracto), posteriormente el extracto obtenido por el método de Soxhlet con etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético como disolvente (29.60 ± 1.04 mg de EAG/g de extracto).

Haciendo una comparación entre los métodos de extracción los extractos obtenidos con acetona y etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético como disolvente presentan el mayor contenido de fenoles a excepción del extracto con mayor contenido de fenoles que como mencionamos es con metanol por el método de maceración. Por otro lado, los extractos con menor contenido de fenoles se obtuvieron con metanol y etanol como disolvente en los tres métodos utilizados, donde el extracto con menor contenido de fenoles totales es en la extracción asistida por ultrasonido empleando como disolvente metanol a 75' (2.54 ± 0.12 mg de EAG/g de extracto).

5.8 Determinación de la actividad antioxidante por el método de FRAP

Se determinó la actividad antioxidante de todos los extractos obtenidos por el método de FRAP.

En la Gráfica 3 y Tabla 9 en el anexo, se resume los resultados de la actividad antioxidante determinada por el método FRAP en los extractos de cáscara de mandarina (*Citrus reticulata*), extraídos por diferentes métodos y disolventes.



Gráfica 3. Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de cáscara de mandarina.

El método de extracción que obtuvo mayor actividad antioxidante fue la extracción por el método de Soxhlet utilizando etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético como disolvente ($148.80 \pm 1.98 \mu\text{mol}$ de ET/g de extracto), seguido de la extracción asistida por ultrasonido al tiempo 60' ($138.60 \pm 11.29 \mu\text{mol}$ de ET/g de extracto) utilizando el disolvente anterior y Soxhlet utilizando acetona como disolvente ($106.73 \pm 5.67 \mu\text{mol}$ de ET/g de extracto). En el caso de maceración el extracto metanólico fue el que presentó mayor actividad antioxidante ($96.79 \pm 7.50 \mu\text{mol}$ de ET/g de extracto).

Entre la cuantificación de fenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos no existe una relación directa, ya que el extracto obtenido a partir de maceración con metanol presenta la mayor concentración de fenoles totales ($34.95 \pm 4.43 \text{ mg}$ de EAG/g de extracto), sin embargo, no resultó tener la mayor actividad antioxidante ($96.79 \pm 7.50 \mu\text{mol}$ de ET/g de extracto).

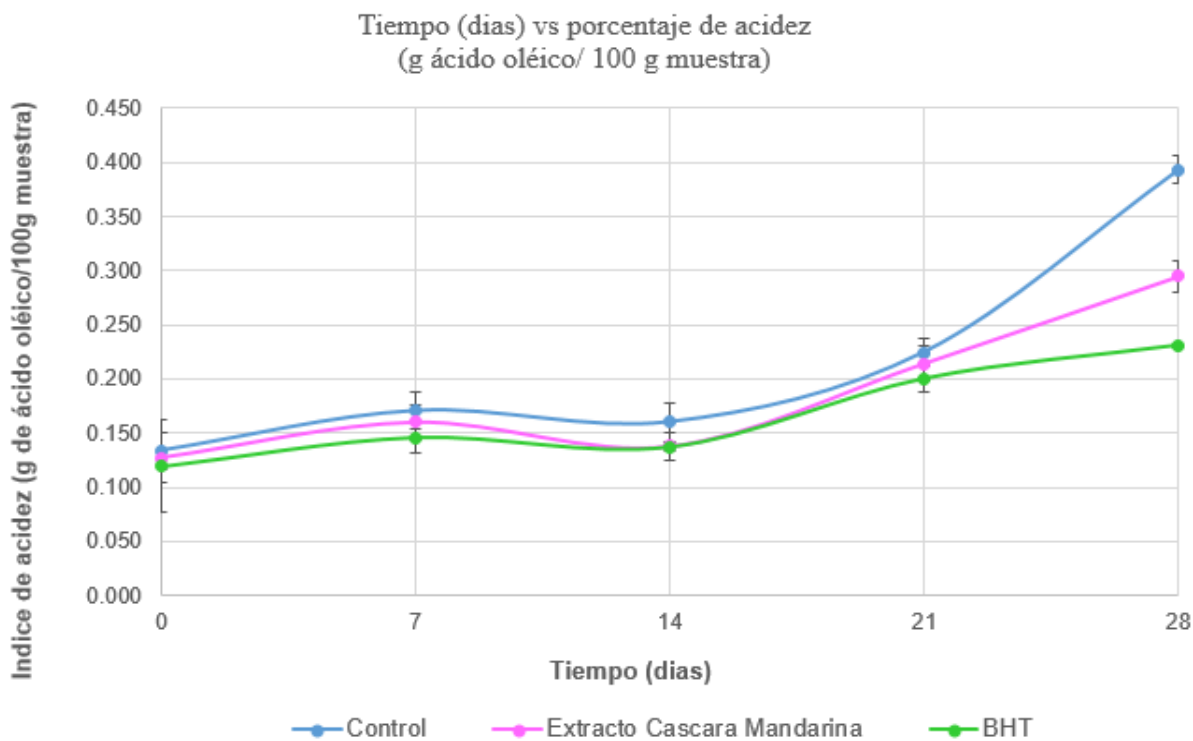
Los cítricos muestran fuertes propiedades antioxidantes, especialmente las cáscaras y semillas por lo que son de alto valor en la industria alimentaria (Sharma et al, 2017; Wikandari et al, 2015).

5.9 Estabilidad oxidativa del aceite de soya

5.9.1. Determinación del Índice de acidez de las muestras

El índice de acidez se utiliza para determinar los ácidos grasos libres contenidos en el aceite y cambios oxidativos (rancidez hidrolítica) en los aceites que es el incremento en su contenido de ácidos grasos libres, este aumenta debido al hidrólisis de los triglicéridos. La ruptura hidrolítica de los triglicéridos en los aceites tiene como resultado la liberación de ácidos grasos libres, que pueden ser monitoreados a través del índice de acidez (O'Keefe et al, 2010).

En la gráfica 4 se observa un aumento de acidez en la muestra control en los días 21 al 28. Por otro lado, el aceite adicionado con BHT y el aceite adicionado con extracto de cáscara de mandarina muestran un comportamiento similar y presentan un menor índice de acidez respecto a la muestra control.



Gráfica 4. Índice de acidez de las muestras a través del tiempo usando aceite de soya como control, aceite de soya adicionado con extracto de cáscara de mandarina y aceite de soya adicionado con BHT a 55°C por 28 días.

Los resultados indican que no hay diferencia significativa del índice de acidez entre la muestra con el extracto y la adicionada con BHT del día 0 al 21, sin embargo, del día 21 al 28 si hubo un aumento en la acidez del aceite con el extracto de mandarina, pero esta a su vez no mayor que la muestra control. Se puede decir que el aceite adicionada con BHT presenta una menor hidrólisis, seguido del aceite con extracto y posteriormente el control. De acuerdo con el CODEX STAN 210-1999, el valor máximo permitido para el índice de acidez es de 0.6 g por 100 g de aceite, por lo que en ningún momento del análisis se supera el intervalo permitido.

En la Tabla 4, se muestran los resultados de la determinación del porcentaje de acidez expresado en g ácido oleico/100g muestra.

Tabla 4. Resultados del porcentaje de acidez expresado en g ácido oleico/100g muestra en aceite de soya con extracto de cáscara de mandarina, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.

Determinación del porcentaje de acidez expresado en g ácido oleico/100g muestra					
Tiempo	0	7	14	21	28
Muestra Control	0.134 ± 0.013 ^a	0.170 ± 0.016 ^a	0.160 ± 0.017 ^a	0.225 ± 0.019 ^a	0.393 ± 0.012 ^b
Extracto de cáscara de mandarina	0.127 ± 0.015 ^a	0.160 ± 0.023 ^a	0.138 ± 0.016 ^a	0.214 ± 0.005 ^a	0.295 ± 0.017 ^a
BHT	0.119 ± 0.002 ^a	0.146 ± 0.042 ^a	0.138 ± 0.014 ^a	0.200 ± 0.013 ^a	0.231 ± 0.012 ^a

n= 3 promedio ± desviación estándar.

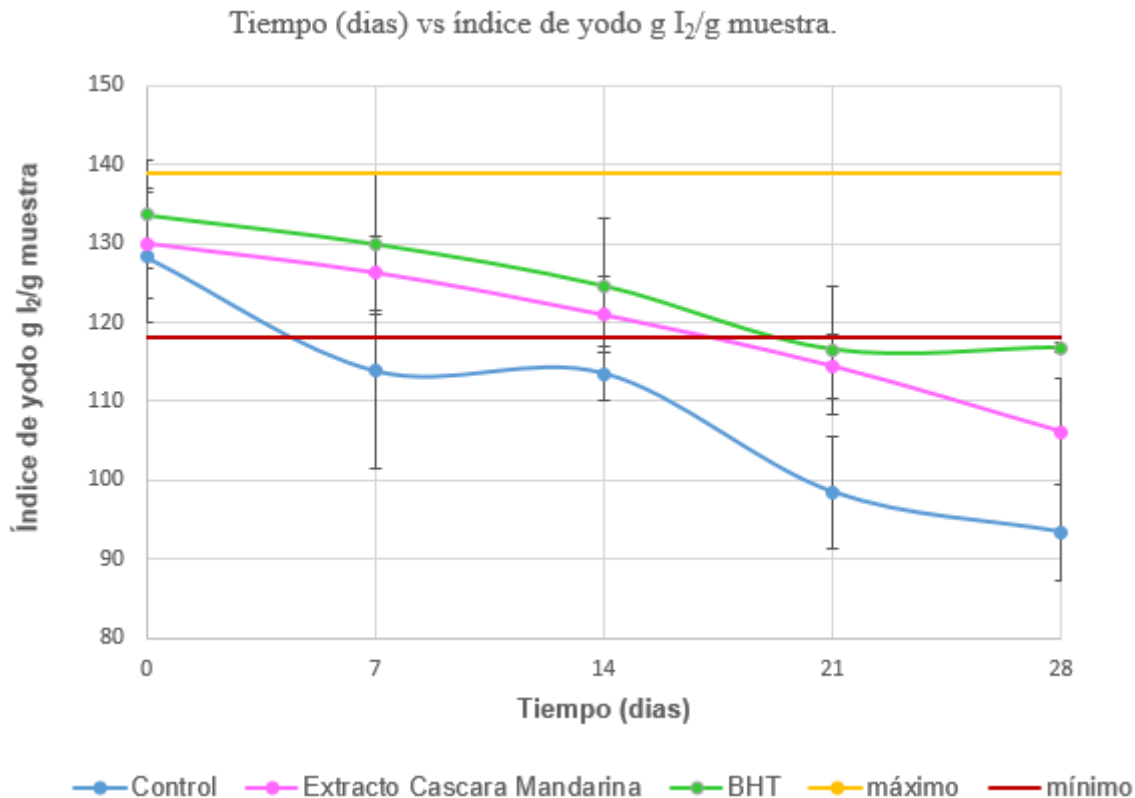
Análisis estadístico para índice de acidez por día (columna). Superíndices ^{a-b} significan diferencia significativa (p<0.05), donde ^a es menor índice y ^b es mayor índice.

Al analizar estadísticamente por día, si existe diferencia significativa en el día 28 del aceite control respecto a la muestra con extracto y con BHT.

5.9.2. Determinación del Índice de yodo de las muestras

En el índice de yodo se refiere a la medida del grado de insaturación, en relación con la cantidad de aceite, cuanto mayor sea la cantidad de insaturaciones, más yodo se absorbe y por lo tanto mayor es el índice de yodo (O'Keefe et al, 2010).

En la Gráfica 5, se observa como el aceite de soya adicionado con BHT y con extracto de cáscara de mandarina retardan la disminución de las insaturaciones presentes en el aceite comparado con el control que presenta un descenso en los valores de índice de yodo lo que es indicativo del aumento en la velocidad de oxidación.



Gráfica 5. Índice de yodo de las muestras a través del tiempo usando aceite de soya como control, aceite de soya adicionado con extracto de cáscara de mandarina y aceite de soya adicionado con BHT a 55°C por 28 días.

De acuerdo a la norma NMX-F-252-SCFI-2005 el valor de índice de yodo para aceite de soya debe ser de entre 118-139 gI₂/g muestra, las tres muestras en el día cero cumplen con el límite máximo permitido por la NMX, sin embargo, en el día 14 el control ya no cumple con el mínimo establecido, en el caso del aceite con extracto de cáscara de mandarina cumple 7 días más comparado con el control, ya que en el día 21 tampoco cumple con el mínimo valor permitido por la NMX a comparación de la muestra con BHT, mientras tanto la muestra adicionada con BHT si cumple la NMX durante todo el tiempo que se estuvo monitoreando.

En la Tabla 5, se muestran los resultados del índice de yodo expresado en g I₂/g muestra.

Tabla 5. Resultados del índice de yodo expresado en g I₂/g muestra en aceite de soya con extracto de cáscara de mandarina, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.

Determinación del índice de yodo expresado en g I ₂ /100g muestra					
Tiempo Muestra	0	7	14	21	28
Control	128.252±6.184 ^a	113.833±8.318 ^a	113.530±12.278 ^a	98.494±3.439 ^a	93.425±7.107 ^a
Extracto de cáscara de mandarina	129.972±6.738 ^a	126.269±7.021 ^a	120.932±4.747 ^a	114.464±4.836 ^a	106.186±3.974 ^a
BHT	133.676±0.606 ^a	129.972±6.738 ^a	124.636±8.933 ^a	116.508±8.524 ^a	116.783±8.119 ^a

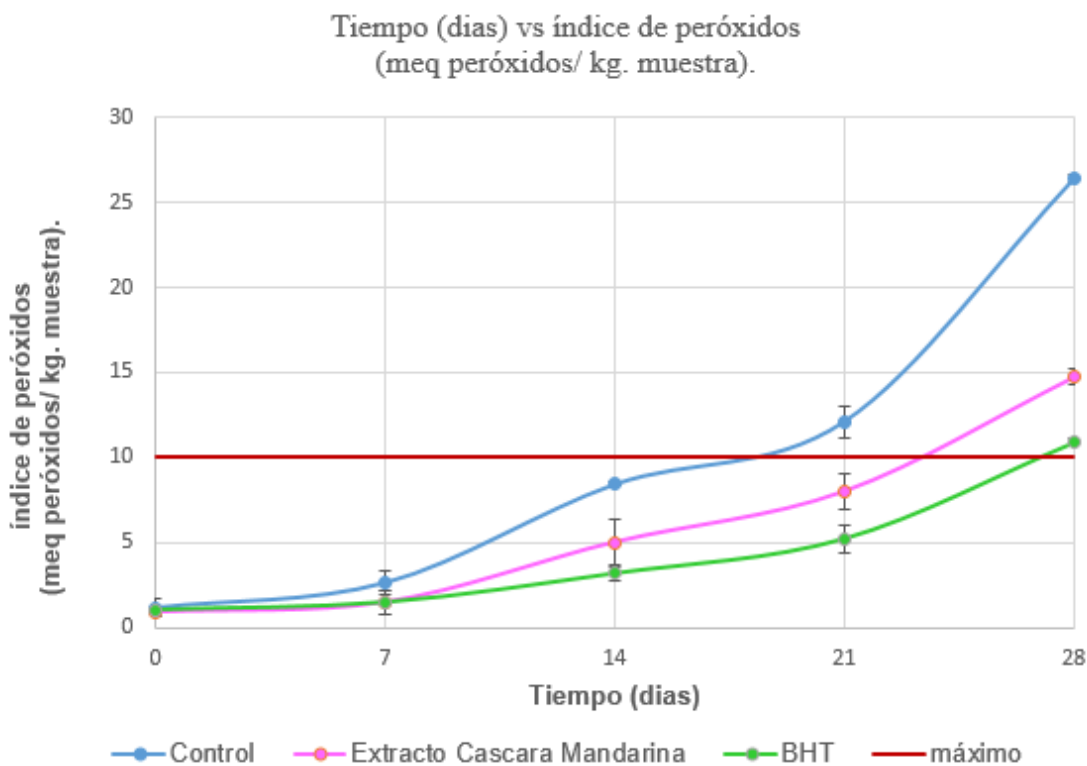
n= 3 promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico para índice de yodo por día (columna). El superíndice ^a significa que no hubo diferencia significativa (p<0.05) entre los valores.

5.9.3. Determinación del Índice de peróxidos de las muestras

El índice de peróxido es un parámetro que se puede probar y que indica la calidad de los aceites comestibles. Esta prueba permite determinar el inicio de la oxidación en el aceite. Los ácidos grasos insaturados están presentes de forma natural en los aceites. Cuando reaccionan con el oxígeno, se crea peróxido, y entonces los aceites se oxidan (Badui et al., 2006).

En la Gráfica 6, se puede observar que inicialmente la muestra con extracto de cáscara de mandarina, el control y la muestra con BHT inician con un índice de peróxidos muy similar, sin embargo, el índice de peróxidos para la muestra control va incrementando considerablemente mucho más rápido hasta el día 28. Por otro lado, en el aceite adicionado con extracto de cáscara de mandarina y el aceite adicionado con BHT se puede observar que el índice de peróxidos aumenta conforme pasa el tiempo de una manera más moderada en comparación con la muestra control.



Gráfica 6. Índice de peróxidos de las muestras a través del tiempo usando aceite de soya como control, aceite de soya adicionado con extracto de cáscara de mandarina y aceite de soya adicionado con BHT a 55°C por 28 días.

De acuerdo con el CODEX STAN 19-1981, el valor máximo permitido de índice de peróxidos es de 10 meq peróxido/kg de aceite, para la muestra control después del día 18 ya no cumple con el valor máximo permitido, sin embargo, en el aceite adicionado con extracto de cáscara de mandarina ya no cumple con el valor máximo permitido en el día 23 y el adicionado con BHT ya no cumple con el valor máximo permitido un poco antes del día 28, por lo que la eficiencia del extracto y el BHT si presenta un poco de diferencia.

En la Tabla 6, se muestran los resultados del índice de peróxidos expresado en meq peróxidos/kg muestra.

Tabla 6. Resultados del índice de peróxidos expresado en meq peróxidos/kg muestra en aceite de soya con extracto de cáscara de mandarina, BHT y control, almacenado bajo condiciones aceleradas a 55°C por 28 días.

Determinación del índice de peróxidos expresado en meq peróxidos/kg muestra					
Tiempo	0	7	14	21	28
Muestra					
Control	1.163 ± 0.231 ^a	2.631 ± 0.487 ^a	8.419 ± 0.694 ^b	12.106 ± 0.125 ^b	26.385 ± 0.903 ^b
Extracto de cáscara de mandarina	0.892 ± 0.461 ^a	1.475 ± 0.231 ^a	5.026 ± 0.713 ^a	8.018 ± 1.291 ^a	14.746 ± 1.022 ^a
BHT	1.029 ± 0.241 ^a	1.471 ± 0.236 ^a	3.178 ± 0.659 ^a	5.216 ± 0.422 ^a	10.885 ± 0.802 ^a

n= 3 promedio ± desviación estándar.

Análisis estadístico para índice de peróxidos por día (columna). Superíndices ^{a-b} significan diferencia significativa (p<0.05), donde ^a es menor índice y ^b es mayor índice.

Al analizar estadísticamente por día, si existe diferencia significativa desde el día 14 hasta el 28 del aceite control respecto a la muestra con extracto y con BHT.

6. CONCLUSIONES

De acuerdo con el objetivo inicial de esta investigación se concluye lo siguiente:

- Para la obtención de extractos se tiene un mayor rendimiento utilizando metanol como disolvente para el método de maceración y ultrasonido. En el caso del método Soxhlet es utilizando etanol.
- El extracto obtenido por maceración con metanol como disolvente, presentó mayor concentración de fenoles totales (34.95 ± 4.43 mg de EAG/g de extracto).
- Empleando el método de extracción por Soxhlet con etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético como disolvente, se obtuvo la mayor actividad antioxidante (148.80 μ mol de ET/g de extracto).
- En el estudio de estabilidad oxidativa del aceite de soya, se comparó la capacidad estabilizante del extracto de cáscara de mandarina con mayor actividad antioxidante (etanol-agua (1:1) al 0.1% ácido acético) con la efectividad del antioxidante BHT para estabilizar este aceite.
- Se observó que el extracto de cáscara de mandarina adicionado al aceite de soya retardó el aumento del índice de acidez, disminuyó el índice de peróxidos y también el índice de yodo con respecto a la muestra control. Sin embargo, su efecto estabilizante fue menos eficiente que el mostrado por el BHT en las condiciones que se llevó a cabo el estudio.
- Si bien el extracto proveniente de la cáscara de mandarina no mostró alta capacidad estabilizante del aceite de soya, este podría recomendarse como aditivo en la conservación de alimentos por su origen natural.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Albuquerque, B. R., Prieto, M. A., Vázquez, J. A., Barreiro, M. F., Barros, L., Ferreira, IC. (2018). Recovery of bioactive compounds from *Arbutus unedo* L. fruits: Comparative study of optimization of extraction techniques by maceration/microwave/ultrasound. *Food Research International*, 109, 455–471.
2. Alioune, A., Khatab, O., Ndiaye, B., Cyrille, N., Cisse, M., Mar, D. (2019). Evaluation of Phenolic Content and Antioxidant Activity of Aqueous Extracts of Three *Carica papaya* Varieties Cultivated in Senegal. *Food and Nutrition Sciences*, 10, 276-289.
3. Anbudhasan, A.S.P., Karkuzhali, S., Sathishkumaran, S. (2014). Natural antioxidants and its benefits. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*. 3(6), 225-232.
4. Anraku, M., Gebicki, J. M., Iohara, D., Tomida, H., Uekama, K., Maruyama, T., Hirayama, F., Otagiri, M. (2018). Antioxidant activities of chitosans and its derivatives in in vitro and in vivo studies. *Carbohydr. Polym.* 199, 141-149.
5. Apraj, V. D. (2016). Evaluation of Skin Anti-aging Potential of Citrus reticulata Blanco Peel. *Pharmacognosy Research*. 8(3), 160-8.
6. Aravind, S., Barik, D., Ragupathi, P., Vignesh, G. (2021). Research on extraction of oil from Spirogyra algae using Soxhlet extraction method. *Mother. Today Proc.* 43, 308–313.
7. Asimi, O. A., Sahu, N. P., Pal, A. K. (2013). Antioxidant capacity of crude water and ethylacetate extracts of some Indian species and their antimicrobial activity against *Vibrio vulnificus* and *Micrococcus luteus*. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(26), 1907–1915.
8. Avellán, T., Nagabhatla, N., Jalan, I., Liao, D. (2022). Chapter 2 - Integrating circularity to achieve sustainability: Examples of various wastewater treatment systems. *Circular Economy and Sustainability, Elsevier*. 21-35.
9. Awasthi, S. K., Joshi, R., Dhar, H., Verma, S., Awasthi, M. K., Varjani, S. J., Sarsaiya, S., Zhang, Z., Kumar, S. (2018). Improving methane yield and quality via co-digestion of cow dung mixed with food waste. *Bioresour Technology*. 251, 259–263.
10. Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. Cuarta edición, México: Pearson educación.

11. Blainski A., Lopes G. C., Mello J. C. (2013). Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content of *Limonium Brasiliense* L. *Molecules*. 18, 6852–6865.
12. Bouras, M., Chadni, M., Barba, F. J., Grimi, N., Bals, O., Vorobiev, E. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Quercus* bark. *Indiana Cultivation. Puncture*. 77, 590–601.
13. Cai, Y., Tian, J., Qin, W., Ogawa, Y. (2020). Effect of particle size of pulverized citrus peel tissue on elution characteristics of intracellular substances as influenced by type of solvent. *Food Hydrocolloids*. 100, 105392.
14. Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. A. (2013). Review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol*. 51, 15–25.
15. Chandrapala, J., Leong, T. (2015). Ultrasonic processing for dairy applications: recent advances. *Food Engineer*. 7, 143-158.
16. Chaudhary, P., Janmeda, P., Docea, A. O., Yeskaliyeva, B., Abdull, A. F., Modu, B., Calina, D., Sharifi-Rad, J. (2023). Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases. *Frontiers in Chemistry*. 11, 1158198.
17. Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound-assisted extraction of foods and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. *A review. Ultrasound. Sonochem*. 34, 540–560.
18. Chuyen, H. V., Nguyen, M. H., Roach, P. D., Golding, J. B., Parks, S. E. (2018). Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. *Food Science and Nutrition*. 6, 189-196.
19. CODEX STAN 19-1981. (2015).
20. CODEX STAN 210-1999. (2015).
21. Cohen, S. M., Eisenbrand, G., Fukushima, S., Guengerich, F. P., Hecht, S. S., Taylor, S. V. (2019). Evaluation of Natural Flavor Complexes: Citrus-Derived Flavoring Ingredients. *Chemical and Food Toxicology*, 124, 192-218

22. Costanzo, G., Vitale, E., Iesce, M. R., Naviglio, D., Amoresano, A., Fontanarosa, C., Spinelli, M., Ciaravolo, M., Arena, C. (2022). Antioxidant properties of the pulp, peel and seeds of Flegren mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) at different stages of fruit ripening. *Antioxidants*. 11, 187.
23. Domínguez, T. M. (2016). Flavonoids extracted from tangelo orange peel (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) and their application as natural antioxidant in vegetable oil. *Agricultural science*, 7(4), 419-431.
24. Durmaz, G. (2012). Freeze-dried ABTS method. A ready-to-use radical powder to assess antioxidant capacity of vegetable oils. *Food Chemistry*. 133, 1658–1663.
25. EFSA. (2012). Scientific Opinion on the re-evaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. *EFSA J*, 10, 2588.
26. Fakayode, O. A., Abobi, K. E. (2018). Optimization of oil and pectin extraction from orange (*Citrus sinensis*) peels: a response surface approach. *Analysis magazine. Science and Technology*. 9 (1).
27. FAO. (2023). FAO – Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado el 11 de octubre del 2023.
28. Farahmandfar, R., Tirgarian, B., Dehghan, B., Nemati, A. (2019). Comparison of different drying methods on bitter orange (*Citrus aurantium* L.) peel waste: changes in physical (density and color) and essential oil (yield, composition, antioxidant and antibacterial) properties of powders. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 14, 862–875.
29. Fereidoon, S., Priyatharini, A. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. 820-897.
30. Flores, M., Avenida, V., Forero-Doria, O., Quitral, V., Bravo, J., Valdés, C., Vilcanqui, J., Ortíz, J. (2021). Edible Oil Parameters during Deteioration Processes. *International Journal of Food Science*. 1-16.
31. Foti M. C. (2015). Use and Abuse of the DPPH • Radical. *J. Agricultural. Food chemistry*. 63, 8765–8776.
32. Gil, G. J., Villa, J. A., Ayala, J. F., Heredia, J. B., Sepúlveda, D., Yahia, E. M., González, G. A. (2013). Technologies for the extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: an overview. *Rev. Food Science. Food safety*. 12, 5–23.

33. Gil, M. I., Tomás, F. A., Hess, B., Kader, A. A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C content of nectarine, peach, and California plum cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(17), 4976–4982.
34. Grootveld, M., Percival, B. C., Leenders, J., Wilson, P. B. (2020). Potential adverse public health effects afforded by the ingestion of dietary lipid oxidation product toxins: Significance of fried food sources. *Nutrients*. 12, 974.
35. Grosshagauer, S., Steinschaden, R., Pignittera, M. (2019). Strategies to increase the oxidative stability of cold pressed oils. *Food Science and Technology*. 106, 72–77.
36. Gulcin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview *Arch. Toxicol.* 86(3), 345-391.
37. Gulcin, I. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview *Arch. Toxicol.* 94(3), 651-715.
38. Gupta, A. K., Mishra, P., Senapati, M., Sahu, P. P. (2021). A novel electrochemical device for naringin quantification and removal from bitter variety of citrus fruits. *Journal of Food Engineering*. 306, 110637.
39. Herrera, C., Bolaños, N., Giselle, L. V. (2003). Química de alimentos: *Manual de laboratorio* C. 1. Ed.-San José, C.R.: Editorial de la universidad de Costa Rica, p 29.
40. Huang, J., Liao, J., Qi, J., Jiang, W., Yang, X. (2021). Structural and physicochemical properties of pectin-rich dietary fiber prepared from citrus peel. *Food Hydrocolloids*. 110, 106140.
41. Huerta, E., Torres, A., Galeana, E., Martínez, E., Cruz, H., Blanco, R., Calderón, A. (2018, marzo). Las cáscaras de frutas podrían sustituir los plásticos sintéticos. *Magazine Plástico*.
Recuperado de: <https://revistamp.net/inicio/las-cascaras-de-frutas-podrian-sustituir-los-plasticos-sinteticos/>
42. Kaderides, K., Goula, A. M., Adamopoulos, K. G. (2015). A process to convert pomegranate peels into a valuable food ingredient through ultrasound-assisted extraction and encapsulation. *Innovation. Food science. Emergent. Technology*, 31, 204–215,
43. Karadag A., Ozcelik B., Saner S., (2009). Review of methods for determining antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41–60.

44. Khamsucharit, P., Laohaphatanalert, K., Gavinlertvatana, P., Sriroth, K., Sangseethong, K. (2018). Characterization of pectin extracted from banana peels of different varieties. *Food Science and Biotechnology*. 27(3), 623-629.
45. Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlüter, O., Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. Year. *A Review Food Science and Technology*. 2, 203–235.
46. Kornienko, J. S., Smirnova, I. S., Pugovkina, N. A., Ivanova, J. S., Shilina, M. A., Grinchu, T. M., Shatrova, A. N., Aksenov, N. D., Zenin, V. V., Nikolsky, N. N., Lyublinskaya, O. G. (2019). High doses of synthetic antioxidants induce premature senescence in cultivated mesenchymal stem cells. *Science. Rep.* 9.
47. Koubala, B. B., Christiaens, S., Kansci, G., Van Loey, A. M., Hendrickx, M. E. (2014). Isolation and structural characterisation of papaya peel pectin. *Food Research International*, 55, 215-221.
48. Lado, J., Gambetta, G., Zacarias, L. (2018). Key determinants of citrus fruit quality: Metabolites and main changes during maturation. *Horticultural science*. 233, 238-248.
49. Lam, H. Y., Roy, P. K. (2020). Chattopadhyay, “Thermal degradation in edible oils using calibrated surface-enhanced Raman spectroscopy with iodine values,” *Vibrational Spectroscopy*. vol. 106, 103018.
50. Lama-Muñoz, A., Contreras, M. D. M., Espínola, F., Moya, M., Romero, I., Castro, E. (2020). Content of phenolic compounds and mannitol in olive leaf extracts of six Spanish cultivars: Extraction with the Soxhlet method and pressurized liquids. *Food chemistry*. 320, 126626.
51. Landines, M., & Zambrano, J. (2009). La oxidación lipídica en la cadena de producción acuícola. *Investigación Agraria y Ambiental*, 2(1), 13-22.
52. Lin, C. S. K., Pfaltzgraff, L. A., Herrero-Davila, L., Mubofu, E. B., Abderrahim, S., Clark, J. H. (2013). Food waste as a valuable resource for the production of chemicals, materials and fuels. Current situation and global perspective. *Energy & Environmental Science*. 6, 426–464.
53. Liu, N., Li, X., Zhao, P., Zhang, X., Qiao, O., Huang, L., Guo, L., Gao, W. (2021). A review of chemical constituents and health-promoting effects of citrus peels. *Food Chemistry*. 365(92), 130585.

54. Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., Lima, J. L. (2008). Methodological aspects on the in vitro evaluation of antioxidant properties. *Food Analytical Chemistry*. 613, 1–19.
55. Mahato, N., Sinha, M., Sharma, K., Koteswararao, R., Cho, M. H. (2019). Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. *Foods*. 8, 523.
56. Majid, R., Fereydoun, R. (2011), Classification of Tangerine Size and Shape Based on Mass and Outer Dimensions, *Agricultural Engineering Research Journal*. 1(3), 51-54.
57. Mamma, D., Christakopoulos, P. M. (2014). Biotransformation of citrus by-products into value added products. *Waste and Biomass Valorization*. 5(4), 529-549.
58. Mašković, P. Z., Diamanto, L. D., Cvetanović, A., Radojković, M., Spasojević, B., Zengin, G. (2016). Optimization of the Extraction Process of Antioxidants from Orange Using Response Surface Methodology. *Food Analytical Methods*. 9(5), 1436–1443.
59. M'hiri, N., Ioannou, I., demon, M., Boudhrioua, N. M. (2014). Extraction methods of phenolic compounds from citrus peel. *Food Review International*. 30, 265–290.
60. Mirza, B., Croley, C. R., Ahmad, M., Pumarol, J., Das, N., Sethi, G., Bishayee, A. M. (2021). A magnificent plant with preventive and anti-cancer therapeutic potential. *Critical Review Food Science. Nutrition*. 61, 2125–2151.
61. Mohamed, G., Shehata, T., Dalal, A., Sobhy, A., Nourhan, M., Mohamed, M. (2021) Antioxidant and antimicrobial activities and UPLC-ESI-MS/MS polyphenolic profile of sweet orange peel extracts. *Ind. Chemistry Eng*. 326-335.
62. Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectina. *Review Carbohydr. Polym*. 168, 227-239.
63. Ndayishimiye, J., Lim, D. J., Chun, B. S. (2018). Antioxidant and antimicrobial activity of oils obtained from a mixture of citrus by-products using modified supercritical carbon dioxide. *J. Ind. Chemistry Eng*. 57, 339–348.
64. Nishad, J., Koley, T. K., Varghese, E., Kaur, C. (2018). Synergistic effects of nutmeg and citrus peel extracts in imparting oxidative stability in meat balls. *Food Research International*. 106, 1026-1036.
65. NMX-F-101-SCFI-2012. Alimentos-Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación de ácidos grasos libres-Método de prueba.

66. NMX-F-152-SCFI-2011. Alimentos-Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del índice de yodo por el método ciclohexano-Método de prueba.
67. NMX-F-154-SCFI-2010. Alimentos-Aceites y grasas vegetales o animales. Determinación del valor de peróxido-Método de prueba.
68. NMX-F-223-SCFI-2011. Alimentos-Aceites vegetal comestible –Especificaciones.
69. NMX-F-252-SCFI-2005 Alimentos – Aceite Comestible Puro de Soya.
70. O’Keefe, S. F., & Pike, O. A. (2010) Fat characterization. In *Food analysis* (4^a ed.) Springer, Boston, EUA. pp. 239-260.
71. Oikeh, E. I., Oviasogie, F. E., Omoregie, E. S. (2020). Quantitative phytochemical analysis and antimicrobial activities of fresh and dry ethanol extracts of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sweet Orange) peels. *Clinical Phytoscience*. 6(1), 46.
72. Panwar, D., Saini, A., Panesar, P. S., Chopra, H. K. (2021). Unraveling the scientific perspectives of citrus by-products utilization: Progress towards circular economy. *Food Science and Technology*. 111, 549-562.
73. Park, H. R., Shin, K. S. (2021). Inhibitory effects of orally administered pectic polysaccharides extracted from the citrus Hallabong peel on lung metástasis. *Food Bioscience*. 43, 101301.
74. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of foods, beverages and vegetable oils consumed in Italy evaluated by three different in vitro assays. *The Journal of Nutrition*. 133(9), 2812–2819.
75. Petcu, C. D., Mihai, O. D., Tapaloaga, D., Gheorghe, R. A., Pogurschi, E. N., Militaru, M., Borda, C., Ghimpeanu, O. M. (2023). Effects of plant-based antioxidants in animal diets and meat products: A review *Foods*. 12 (6).
76. Pisoschi, A. M., Cheregi, M. C., Danet, A. F. (2009). Total antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometric approaches. *Molecules*. 14(1), 480–493.
77. Putnik, P., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Gabrić, D., Shpigelman, A., Cravotto, G., Bursac K. D. (2017). An integrated approach to mandarin processing: Food safety and nutritional quality, consumer preference, and nutrient bioaccessibility. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16(6), 1345-1358

78. Rasul, M. G. (2018). Use of conventional extraction methods in medicinal plants, their advantages and disadvantages. In t. J. Basic sciences. *Apply. Computer.* 2, 10-14.
79. Reinoso, B., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2006). Extraction with supercritical CO₂ and purification of compounds with antioxidant activity. *J. Agricultural Food Chemistry.* 54, 2441–2469.
80. Rifna, E. J., Misra, N. N., Dwivedi, M. (2021). Recent advances in extraction technologies for the recovery of bioactive compounds derived from fruit and vegetable waste peels: A Review. *Critical, Review Food Science, Nutrition,* 1–34.
81. Rodríguez, J., León, A., Echeverría, S., Mendoza, J. (2019) *Determinación de índices de acidez, yodo y saponificación en aceites nuevos y usados,* Universidad de Pamplona.
82. Rosa, A., Era, B., Masala, C., Nieddu, M., Scano, P., Faïs, A., Porcedda, S., Piras, A. (2019). Supercritical CO₂ extraction of waste citrus seeds: chemical composition, nutritional and biological properties of edible fixed oils. *EUR. J. Lipid science. Technology.* 121, 1800502.
83. Rozin, P., Mark Spranca, M., Krieger, Z., Neuhaus, R., Surillo, D., Swerdlin, A., Wood, K. (2004). Preference for natural: Instrumental and ideational/moral motivations, and the contrast between foods and medicines. *Appetite.* 43, 147–154.
84. Różyło, R. (2020). Recent trends in methods used to obtain natural food dyes through freeze-drying. *Trends in Food Science and Technology.* 102, 39-50.
85. SADER. (2022). Portal de la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). Disponible en: <https://www.gob.mx/agricultura>
86. Saini, M. K., Capalash, N., Kaur, C., Singh, S. P. (2019). Targeted metabolic profiling indicates differences in primary and secondary metabolites in Kinnow mandarin from different climatic conditions. *Journal of Food Composition and Analysis.* 83, 103278.
87. Scott, S. E., Rozin, P., Small, D. A. (2020). Consumers prefer “natural” more for preventatives than for curatives. *J. Consum. Res,* ucaa034.
88. Shahidi F., Zhong Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *J. Function. Food.* 18, 757–781.
89. Sharma K., Mahato N., Cho, M. H., Lee, Y. R. (2017). Conversion of citrus waste into value-added products: economical and environmentally friendly approaches. *Nutrition.* 34, 29–46.

90. Sigurnjak, B. M., Maslov, B. L., Vlahoviček-Kahlina, K. (2023). Determination of Bioactive Components in Mandarin Fruits; a review, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 53(7), 1489-1514.
91. Sindhu, R., Gnansounou, E., Rebello, S., Binod, P., Varjani, S., Thakur, I. S., Nair, R. B., Pandey, A. (2019). Conversion of food and kitchen waste to value-added products *J. Environ. Manag.* 241, 619-630.
92. Singanusong, R., Nipornram, S., Tochampa, W., Rattanatraiwong, P. (2014). Low Power Ultrasound-Assisted Extraction of Phenolic Compounds from Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco cv. Sainampung) and Lime (*Citrus aurantifolia*) Peels and the Antioxidant. *Food Analytical Methods*. 8(5), 1112–1123.
93. Stratakos, A. C., Koidis, A. (2016). Methods for extracting essential oils. In *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety; Academic Press: Waltham, MA, USA*. 31–38.
94. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros, L., Hawkins, B. D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays to estimate the antioxidant activity of guava fruit extracts. *Journal of Food Analysis and Composition*. 19(6–7), 669–675.
95. Tuberoso, C. I. G., Boban, M., Bifulco, E., Budimir, D., Pirisi, F. M. (2013). Antioxidant capacity and vasodilatory properties of Mediterranean food: The case of Cannonau wine, myrtle berries liqueur and strawberry-tree honey. *Food Chemistry*. 140(4), 686–691.
96. Wang, F. L., Chen, H., Chen, S., Chen, Y. L. (2019). Analysis of flavonoid metabolites in citrus peels (*Citrus reticulata* “Dahongpao”) using UPLC-ESI-MS/MS *Molecules*. 24 (15), 2680.
97. Wang, L., Weller, CL. (2006). Recent advances in the extraction of nutraceuticals from plants. *Trends Food science. Technology*. 17, 300–312.
98. Wijngaard, H., Hossain, M. B., Rai, D. K., Brunton, N. (2012). Techniques for extracting bioactive compounds from food by-products of plant origin. *Food res*. 46, 505–513.
99. Wikandari R., Nguyen, H., Millati, R., Niklasson, C., Taherzadeh, M. J. (2015). Enhancement of biogas production from orange peel waste through limonene leaching. *BioMed Res. In t*. 494182.

100. Yang, X., Nisar, T., Hou, Y., Gou, X., Sun, L., Guo, Y. (2018). Pomegranate peel pectin can be used as an effective emulsifier. *Food Hydrocolloids*. 85, 30-38.
101. Zannini, D., Dal Poggetto, G., Malinconico, M., Santagata, G., Immirzi, B. (2021). Citrus pomace biomass as a source of pectin and lignocellulose fibers: from waste to improved biocomposites for mulch applications. *Polymers*. 13, 1280.
102. Zarate-Vilet, N., Gué, E., Servent, A., Delalonde, M., Wisniewski, C. (2020). Filtration-compression step as downstream process for flavonoids extraction from citrus peels: Performances and flavonoids dispersion state in the filtrate. *Food and Bioproducts Processing*. 120, 104-113.
103. Zhang, Q.W., Lin, L.G., Ye, W.C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin. Medicine*. 13, 20.

8. ANEXO

Tabla 7: Rendimientos promedio de los extractos obtenidos en cada extracción.

Disolvente Métodos	Acetona	Etanol	Metanol	Etanol-Agua (1:1) al 0.1% ácido acético
Soxhlet	4.79 ± 0.29%	32.5 ± 1.06%	2.81 ± 0.11%	0.91 ± 0.16%
Maceración	3.21 ± 0.16%	7.77 ± 0.28%	18.74 ± 0.30%	5.55 ± 0.20%
EAU 0´	1.8 ± 0.07%	8.27 ± 0.09%	12.8 ± 0.24%	9.83 ± 0.05%
EAU 30´	2.03 ± 0.02%	10.23 ± 0.08%	14.73 ± 0.21%	8.93 ± 0.09%
EAU 45´	2.23 ± 0.06%	9.07 ± 0.26%	16.03 ± 0.23%	9.57 ± 0.12%
EAU 60´	2.43 ± 0.05%	10.93 ± 0.10%	16.4 ± 0.26%	9.17 ± 0.06%
EAU 75´	2.53 ± 0.07%	11.73 ± 0.20%	17.07 ± 0.07%	8.93 ± 0.22%

n= 3 promedio ± desviación estándar.

Tabla 8: Contenido de fenoles totales presentes en los extractos de cáscara de mandarina.

Disolvente Métodos	Acetona	Etanol	Metanol	Etanol-Agua (1:1) al 0.1% ácido acético
Soxhlet	21.97 ± 0.17 ^a	11.47 ± 0.49 ^c	10.99 ± 0.46 ^b	29.60 ± 1.04 ^c
Maceración	22.04 ± 3.13 ^b	2.78 ± 0.27 ^a	34.95 ± 4.43 ^c	18.98 ± 2.69 ^a
EAU 0´	25.83 ± 1.21 ^{ca}	6.00 ± 0.24 ^{bc}	5.78 ± 0.30 ^{ac}	19.99 ± 0.60 ^{ba}
EAU 30´	28.91 ± 1.06 ^{cc}	6.21 ± 0.26 ^{bd}	5.46 ± 0.46 ^{ab}	20.23 ± 0.98 ^{bb}
EAU 45´	32.79 ± 3.78 ^{ce}	6.65 ± 0.19 ^{be}	6.40 ± 0.35 ^{ae}	21.63 ± 0.85 ^{bc}
EAU 60´	29.23 ± 1.42 ^{cd}	5.65 ± 0.45 ^{ba}	6.34 ± 0.11 ^{ad}	24.28 ± 1.63 ^{be}
EAU 75´	27.94 ± 2.83 ^{cb}	5.87 ± 0.14 ^{bb}	2.54 ± 0.12 ^{aa}	22.25 ± 0.48 ^{bd}

n= 3 promedio ± desviación estándar.

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

Tabla 9: Actividad antioxidante de los extractos de cáscara de mandarina.

Disolvente Métodos	Acetona	Etanol	Metanol	Etanol-Agua (1:1) al 0.1% ácido acético
Soxhlet	106.73 ± 5.67 ^c	40.46 ± 3.97 ^c	57.58 ± 4.05 ^b	148.80 ± 1.98 ^c
Maceración	67.44 ± 1.97 ^a	30.72 ± 2.49 ^b	96.79 ± 7.50 ^c	66.94 ± 4.75 ^a
EAU 0´	95.08 ± 6.54 ^{bc}	27.72 ± 2.33 ^{ae}	23.03 ± 1.33 ^{aa}	87.35 ± 5.59 ^{bc}
EAU 30´	104.37 ± 11.77 ^{be}	26.89 ± 1.78 ^{ad}	24.35 ± 2.61 ^{ab}	69.80 ± 6.57 ^{ba}
EAU 45´	71.55 ± 8.84 ^{bb}	26.08 ± 0.52 ^{ac}	32.91 ± 14.07 ^{ae}	73.56 ± 4.94 ^{bb}
EAU 60´	103.02 ± 6.95 ^{bd}	22.71 ± 1.03 ^{ab}	25.24 ± 1.80 ^{ac}	138.60 ± 11.29 ^{be}
EAU 75´	69.81 ± 2.50 ^{ba}	22.08 ± 1.75 ^{aa}	25.92 ± 2.58 ^{ad}	87.33 ± 4.85 ^{bd}

n= 3 promedio ± desviación estándar.

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