

15
29-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

ESTUDIO ANALITICO DEL JUGO DE MANDARINAS
NACIONALES
(Citrus reticulata)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
RAUL FLORES CEBALLOS



MEXICO, D. F.

1998.

IMPRESO CON
Papel de ORIGEN

259085



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Francisca Aida Iturbe Chiñas

Vocal: Prof. María De Los Ángeles Valdivia López

Secretario: Prof. Marco Antonio León Felix

1er. Suplente: Prof. Carlos A. Torres Ávila

2do. Suplente: Prof. Bertha Julieta Sandoval Guillén

El presente trabajo se desarrolló en:

Facultad de Química, Edificio E: Laboratorio 322 y 323.
Departamento de Alimentos.

ASESOR DEL TEMA


M. en C. María De Los Ángeles Valdivia López

SUSTENTANTE


Raúl Flores Ceballos

Agradezco:

A mis padres Raúl y Tere, a quienes debo la dicha de haber llegado a este momento. Gracias por su incansable ayuda, no solo para la realización de mi tesis, sino por todo el apoyo que me brindaron desde el primer momento de mi vida.

Con especial cariño:

A Dios, al que le agradezco la vida y su permiso para poder llegar hasta este momento tan importante. Le doy las gracias por haber estado conmigo en todo momento y ayudarme en los momentos difíciles que pase.

Con respeto y cariño:

A la M. en C. Ma. De Los Ángeles Valdivia López por todo el tiempo brindado, su invaluable apoyo, conocimientos aportados y sus valiosos comentarios para el enriquecimiento en la realización de esta tesis, así como la confianza que depositó en mí.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.	1
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO I	5
ANTECEDENTES	
1.1 Caracterización de la Mandarina	5
1.1.1 Climas y Suelos	
1.1.2 Descripción botánica y variedades	
1.1.3 Características generales del árbol	
1.1.4 Variedades Nacionales de Mandarina	
1.2 Composición Química de la Mandarina	18
1.2.1 Partes que conforman al fruto	
1.2.2 Sólidos solubles, azúcares y ácidos orgánicos en mandarina	
1.3 Los Flavonoides	23
1.3.1 Importancia de la Naringina	
1.3.2 Importancia de la Hesperidina en la elaboración de jugos	
1.4 Caracterización espectrofotométrica de jugos cítricos y productos relacionados	39
1.4.1 Jugo de naranja	
1.4.2 Extracción acuosa de sólidos solubles de naranja	
1.5 Cromatografía Líquida de Alta Presión	40

CAPÍTULO II **41**
DESARROLLO EXPERIMENTAL

- 2.1 Metodología
- 2.2 Materia prima

CAPÍTULO III **65**
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- 3.1 Flavonas Glucosiladas
- 3.2 Flavonas Metoxiladas
- 3.3 Carbohidratos
- 3.4 Barridos Espectrofotométricos

CONCLUSIONES **91**

BIBLIOGRAFÍA **94**

INTRODUCCIÓN

En nuestro país contamos con una gran diversidad de productos naturales, entre ellos destacan los frutos. Muchos de esos frutos de gran importancia para México no cuentan con una clasificación y análisis adecuado de sus principales componentes, un ejemplo de esto es la mandarina mexicana.

Actualmente no se encuentra información sobre la caracterización y análisis de las variedades de mandarinas mexicanas, solo están siendo reportados los análisis a nivel macro y micro de las variedades de naranjas del país. Con la realización de este proyecto se busca aportar información sobre la composición de mandarinas nacionales. Este proyecto se enfocará principalmente al estudio de carbohidratos solubles y de los compuestos flavonoides de la mandarina los cuales eventualmente pueden permitir establecer parámetros definidos.

Parte de este trabajo esta orientado a la aportación de datos importantes para poder detectar la posible adulteración de los concentrados de mandarina con la adición de otros cítricos como lo son la naranja y la toronja, incluso con la adición de otros compuestos como azúcares, agua o ácidos orgánicos .

La adulteración de los cítricos procesados, como los jugos y aceites esenciales, continúa siendo un problema serio en la economía mundial y en la regulación de este problema. La adulteración de los jugos de cítricos ha progresado de una simple dilución con agua, azúcar y ácidos, hasta sofisticados métodos que utilizan adulterantes diseñados para no ser detectados (adulteración oscura) (3). En respuesta a este problema los organismos de normalización de la calidad de estos productos han mejorado y desarrollado metodologías para detectar la adulteración. Para la detección de estas adulteraciones existen algunas metodologías que ofrecen buenos resultados como son: análisis de compuestos flavonoides y realización de barridos espectrofotométricos

El estudio de los compuestos flavonoides en este proyecto, además de servir para poder determinar el perfil del jugo de mandarina sentará las bases para eventualmente lograr determinar la adulteración de los concentrados de este cítrico. En la industria de los cítricos las flavonas han tenido un especial lugar dentro de la investigación debido a que causan una serie de problemas en el momento de la obtención del jugo y en la concentración del mismo.

Con la realización de los barridos espectrofotométricos se podrá obtener una huella digital del jugo que servirá como punto de partida para su identificación en concentrados de otro cítrico o en néctares y jugos de frutas cítricas.

Se realizó la determinación de los carbohidratos presentes en las distintas variedades de mandarinas y concentrados para obtener la relación que mantienen entre si cada carbohidrato y tener más elementos para poder caracterizar el jugo de mandarina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Conocer y establecer la composición de compuestos flavonoides, carbohidratos y perfiles espectrofotométricos en jugos de mandarinas nacionales como herramientas para poder conocer la identidad de jugos y concentrados de mandarina.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- ◆ Establecer el perfil y lograr la cuantificación de las flavonas glucosiladas y flavonas metoxiladas en cada concentrado y variedad de mandarina.

- ◆ Cuantificar y establecer la proporción de los carbohidratos solubles en cada muestra.

- ◆ Determinar el perfil espectrofotométrico de cada variedad de mandarina y concentrado.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MANDARINA.

Para hablar del origen de la mandarina, es necesario considerar que los cítricos son originarios de una vasta región comprendida por la Conchinchina, el Archipiélago Malayo y partes adyacentes del continente Asiático.

El conocimiento sobre la utilización de sus frutos, así como también sobre el cultivo de los árboles, se extendió desde China e India, pasando a través de Persia y Palestina, hasta conocerse en Africa del Norte y Europa en las áreas cercanas a la cuenca del Mediterráneo.

Las primeras especies conocidas fueron: la cidra, naranjo agrio y limonero, introducidas en Europa alrededor del año 1200. El naranjo dulce se considera originario de China, donde se cultivó siglos antes de que fuera difundido en el resto del mundo. Cuando Cristóbal Colón realizó sus primeros viajes, se llevó consigo semillas de naranjo dulce. En esa época, los cítricos estaban ya distribuidos en los países de la cuenca del Mediterráneo, especialmente en España, Italia y Grecia.

De acuerdo con González Sicilia, los portugueses fueron quienes introdujeron el naranjo dulce en Europa desde la India y China durante los viajes que realizaban a través del Cabo de Buena Esperanza.

El "mandarino" presumiblemente originario de Japón, China y Conchinchina, adquirió gran desarrollo y actualmente Japón se ubica como el primer lugar entre los países productores de dicha fruta (figura 1).

En 1493, durante el segundo viaje de Colón, se introdujeron semillas de agrios en las islas: La Española (Santo Domingo) y la Isabela (Bahamas). Posteriormente se difundieron hacia Cuba y a nuestro país en 1517 (19).

1.1.1 CLIMAS Y SUELOS.

El cultivo mundial de la mandarina, está ubicado de manera general en dos grandes franjas delineadas por los paralelos 20 y 40 en ambos hemisferios del globo terráqueo (Norte y Sur).

La temperatura ideal para su cultivo varía de los 15 a los 30°C, ya que temperaturas muy extremosas dañan seriamente a los frutos. En México se tiene un promedio anual entre 20 y los 25°C de temperatura; excelentes para el cultivo de la mandarina.

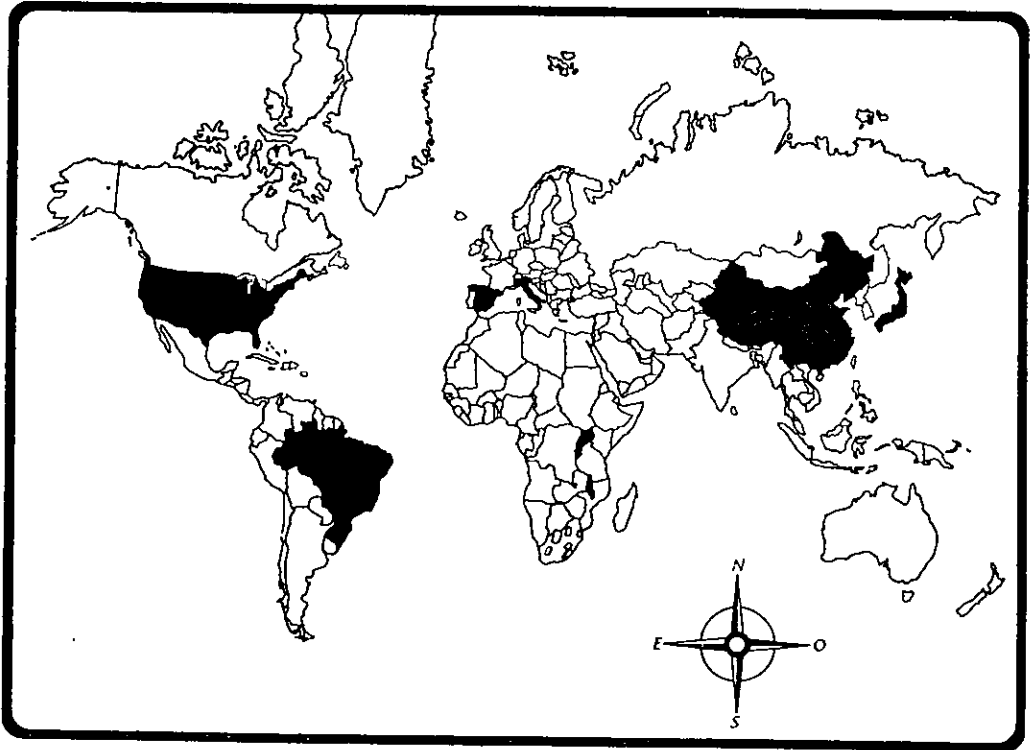


Figura 1.
Principales países productores de Mandarinas.

En cuanto al tipo de suelo ideal para el cultivo; los cítricos prosperan mejor en suelos que contienen como fracciones principales: Limo, Arcilla y de manera general se podría indicar como mejores tierras aquellas que contengan más del 50% de arena, y el otro 50% repartido entre Limo y Arcilla (19).

Otros factores importantes a considerar son : que el mandarino es el cítrico más exigente en lo que a potasio se refiere, y por tal motivo, su tipo de suelo lo requiere.

El pH recomendado del suelo será de 5.5 - 7.0. En plantaciones muy jóvenes hay que aportar " Cal " para que el pH no disminuya por debajo de 5.5.

Como se puede observar, hay varios parámetros importantes para la composición de un suelo ideal, sin embargo cabe señalar que condiciones como: el tipo de suelo y el clima, podrán encontrarse en muchas regiones del mundo.

1.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y VARIEDADES.

Nombre vulgar de la planta: Mandarino o Naranja Mandarino.

Nombre vulgar del fruto: Mandarina o Naranja Mandarina.

Reino: Vegetal.

Genéro: Citrus.

Especie: Reticulata.

Familia: Rutáceas.

Subfamilia: Auriancioideas.

Sinónimos: *Citrus nobilis*, *Citrus deliciosa Tenore*, *Citrus unshiu*,
Citrus Poonensis y el más común : *Citrus Reticulata Blanco*.

Para poder describir botánicamente a la mandarina es necesario clasificarla, pero la diversidad de sus formas es todavía la causa de opiniones muy divergentes con respecto a su clasificación (27).

Sin embargo una de las clasificaciones más aceptadas en el ámbito de los agrios, es la propuesta por " Chapot " en 1952, resaltando cuatro grupos muy importantes:

C. Nobilis: Mandarinas del grupo " King ".

C. Unshiu: Mandarinas del grupo " Satsuma ".

C. Deliciosa: " Mandarina Común "

C. Poonensis: Que es una " Tangerina ". (Grupo menos común en el medio).

Todas estas especies son introducidas a una especie generalizada, conocida como: " CITRUS RETICULATA BLANCO ", la cual es considerada como la base de donde se derivan las demás variedades.

Es casi imposible precisar todas las variedades existentes de mandarina, ya que un estudio realizado por "Ford" en 1961, y que abarca la composición de 70 colecciones de agrios repartidos en: Africa, Asia, Australia, Europa y América ha permitido trazar el siguiente repertorio en lo que a mandarina se refiere:

462 denominaciones de Mandarina.

72 denominaciones de Tangelos.

454 denominaciones de Híbridos de diversos cítricos.

Además 237 denominaciones latinas para designar especies, pseudoespecies, variedades botánicas y hortícolas diversas. Incluso si se deja un lugar muy amplio para los sinónimos, es evidente que el número de especies es casi imposible de precisar.

En lo que a sus características hotícolas se refiere, las variedades de mandarino se clasifican de acuerdo a diferentes parámetros, como son:

- Temporada de maduración:

Variedades de maduración muy precoz: Ej: " Satsuma " .

Variedades de maduración intermedia: Ej: " Dancy " .

Variedades de maduración tardía: Ej: " King " .

- Tamaño del fruto:

Muy pequeño: " Cleopatria " , " Kino-Kuni " , etc.

Mediano: " Satzuma " , " Común " , " Dancy " , etc.

Grande: " King " , " Ortánico " , etc.

- Color:

Amarillo-Anaranjado: " Común " , etc.

Rojizo (Tangerina): " Dancy " , etc.

- Adherencia de la piel:

Bastante fuerte a fuerte: " Naartje " , " Ellendale " , etc.

Poca a ninguna: " Común " , " Satzuma " , etc (28).

1.1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ÁRBOL.

Este es pequeño, espinoso, con ramas delgadas, hojas lanceoladas, anchas o estrechas, flores solitarias o en racimos pequeños en la axilas de las hojas. Frutas redondas más o menos achatadas, piel delgada fácilmente desprendible, color naranja vivo escarlata, semillas pequeñas, puntiagudas en una de sus extremidades, embriones de color verde, muy resistentes al frío, al igual que toda la planta; pero el fruto es muy susceptible al frío, sin embargo, cuando las heladas llegan, normalmente la fruta ya ha sido cortada, y

por lo tanto es delicada al transporte, por lo que requiere de los cuidados necesarios al confeccionarla (6) .

-MANDARINO SATZUMA: (*Citrus unshiu-Marcovith*).

Originario de Japón. El mandarino Satzuma, por ser la especie más resistente al frío, está particularmente bien adaptada a las zonas más elevadas en latitud del área de cultivo como las del sur de Japón. Estos frutos suelen consumirse frescos pero hace algunos años viene desarrollándose una industria de gajos de Satzuma en su jugo y conservas en general.

En Japón se distinguen 5 grupos de Satzuma, siendo los principales " Wase " y " Owari " .

Wase: Reúne las variedades precoces de orígenes diversos. Sus frutos maduran muy pronto (finales de Septiembre principios de Octubre), los árboles son enanos, poco vigorosos y de crecimiento lento. Las variedades de este grupo son numerosas.

Owari: Es el más importante. Del grupo de las variedades tardías, o sea las que maduran en Noviembre-Diciembre. Es un árbol de vigor mediano, muy productivo. Fruto aplanado de tamaño superior al de la mandarina común; sin pepitas y con pulpa de color anaranjado denso, muy tierna y jugosa. En la maduración la piel del fruto no suele estar completamente coloreada, lo que requiere su recolección cuando la piel

es bastante verde. Después de la maduración, los frutos no pueden ser mantenidos mucho tiempo en el árbol.

-MANDARINO KING: (*Citrus nobilis Loureiro*).

Mandarino de frutos grandes que tiene características parecidas al naranjo lo que permite suponer un origen híbrido entre estas dos especies. Este grupo es poco conocido ya que su cultivo ha quedado limitado al sudeste asiático.

Los mandarinos " *King* " son muy sensibles a las condiciones del medio, necesitan mucho calor, y de ahí que se adapte muy bien a climas tropicales y semitropicales. En Florida, injertados en naranjo amargo y cultivados en terreno denso, aporta frutos excelentes.

" *King of Siam* ": Fruto grande aplanado en los polos; piel gruesa, bastante adherente y a menudo muy verrugosa; cuando madura, su coloración va de anaranjada-amarillenta a anaranjada; pulpa color anaranjado oscuro, tierna y perfumada. El árbol es medianamente corpulento y de porte bastante erecto.

-MANDARINO MEDITERRANO. (*Citrus deliciosa Tenore*).

Esta especie solo comprende prácticamente una variedad que es la mandarina " Común ", designada con diferentes apelaciones según el lugar de cultivo.

" Avana " en Italia, " Baladi " en Egipto, y así en otros lugares. Se duda la validez de esta especie, pues no posee caracteres botánicos muy diferentes para quedar completamente separada de *Citrus reticulata*.

" Común " : Árbol de vigor y talla medianos, redondeados, ramas finas, hojas pequeñas, estrechas y lanceoladas. Fruto de forma esférica aplanado en los polos; piel fina no adherente y lisa; color amarillo-naranja en la madurez, pulpa color anaranjado claro, jugosa, tierna y de perfume agradable; numerosa en pepitas. En las últimas décadas el cultivo de esta variedad ha perdido importancia debido a la competencia de otras mandarinas, sobre todo la clementina; sin embargo ocupa un lugar bastante importante en países como España, Argelia, Brasil y Argentina.

-CITRUS RETICULATA BLANCO:

Todas las formas de mandarina, aparte de las de *Citrus unshiu*, *nobilis* y *deliciosa*, han sido introducidas en esta especie que por lo tanto es muy variable. Entre estas variedades podemos mencionar a: Murcott, Ellendale, Beauty (mandarina Australiana muy próxima a la Dancy), etc. En éste grupo se encuentra la " Clementina " cuyo origen tiene diversidad de opiniones.

El clementino es la mejor variedad precoz de mandarina, sus frutos son aplanados en el lado del ápice y redondeados en la base. Tienen la piel brillante, anaranjada-rojiza finamente granulada; pulpa

jugosa de color anaranjado oscuro, tierna y perfumada, las pepitas son monoembrionicas.

La Clementina es la variedad más común de este género, figurando también la " Dancy ", originaria de Florida; sin embargo, como ya se mencionó: " Emperor ", " Murcott ", " Ortánica ", " Ponkan ", " Caravalhal ", " Malvasio ", etc, son variedades de menor importancia pero también incluidas en este género.

Muchas son las variedades de mandarina en el mundo, y si agregamos apelaciones latinas para diversas formas de mandarinas, como lo es el caso de: " Cleopatra " y " Calamondin ", sería imposible tener un dato exacto de las variedades precisas de mandarina, sin embargo las ya mencionadas son las más comunes y por tanto las de mayor importancia.

1.1.4 VARIEDADES NACIONALES DE MANDARINA.

Así como existe una serie de países productores de mandarinas, México es un país de importancia en el cultivo de este fruto a nivel nacional. En nuestro país se cultivan diversas variedades de la mandarina, unas con mayor importancia que otras de acuerdo a su nivel de producción.

Las variedades que se cultivan principalmente en territorio Nacional son:

- TANGERINA.
- MANDARINA COMÚN.
- SATZUMA.
- MANDARINA MEDITERRANEA.

Los cultivos de estas variedades se desarrollan generalmente en climas tales como el tropical y sub-tropical, al igual que los demás cítricos (30).

Los principales estados productores de mandarina del territorio Nacional son los siguientes:

1. Veracruz.
2. Nuevo León.
3. S. L. P.
4. Tamaulipas.
5. Oaxaca.
6. Jalisco.
7. Campeche.
8. B. C. N.
9. Querétaro.
10. Tabasco.
11. Morelos.
12. Hidalgo.
13. Sonora.
14. Sinaloa.

15. Yucatán.

16. Guerrero.

Nota: El orden de aparición de cada uno de los Estados en la lista se debe a su importancia en la producción Nacional.

En la figura 2 se representan las principales entidades y municipios productores de mandarina en México.



Figura 2.

Principales Entidades y Municipios Productores de la Mandarina.

1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA MANDARINA.

1.2.1 PARTES QUE CONFORMAN AL FRUTO.

Las principales secciones del fruto son las siguientes:

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

2. - **El Albedo.** Se encuentra debajo del flavedo; Es un tejido esponjoso, blanco y celulósico, el cuál constituye la mayor parte de la corteza.

El mismo tejido forma el corazón o eje central del fruto y ambos contienen los vasos que proporcionan a la mandarina, el agua y los materiales nutritivos.

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

Al prensar estas vesículas, se separa el zumo que contiene componentes solubles y partículas en suspensión tales como: colorantes, tejidos que se encuentran desintegrados y pectinas, entre otros.

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

4.- **Las Semillas.** De cubierta dura, lignocelulósica, contienen una importante cantidad de grasa (28).

En la figura 3 se pueden apreciar las partes del fruto:

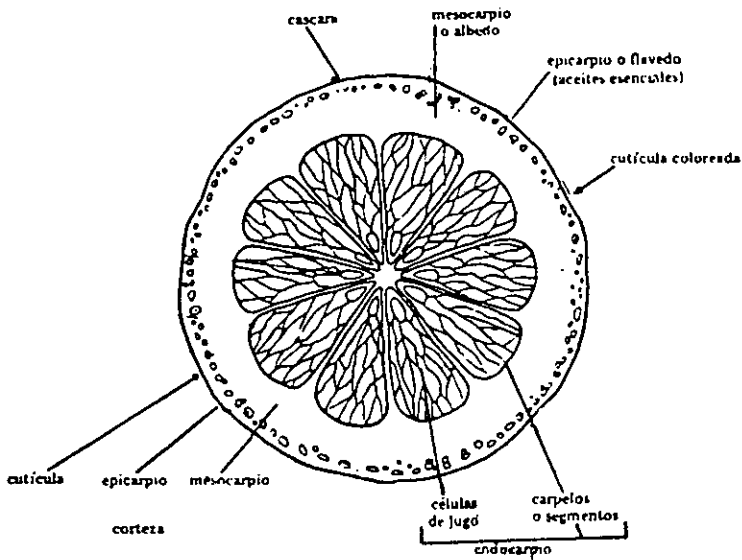


Figura 3.

Partes que conforman la mandarina.

Los productos industriales más importantes derivados de los cítricos son: el zumo natural, el zumo concentrado y el concentrado congelado.

Son también importantes los aceite esenciales, el pienso de corteza, las pectinas y los segmentos de mandarina enlatados. También presentan cierta importancia aunque en menor grado, los líquidos del prensado de las cortezas y el aceite de las semillas, lo mismo que otros productos más sofisticados.

1.2.2 SÓLIDOS SOLUBLES, AZÚCARES Y ÁCIDOS ORGÁNICOS EN MANDARINA.

SÓLIDOS SOLUBLES:

Los sólidos solubles están formados fundamentalmente por los azúcares reductores, no reductores y por los ácidos que conforman al jugo.

AZÚCARES:

Los hidratos de carbono se sintetizan por las plantas verdes mediante el concurso de la luz, a partir del anhídrido carbónico del aire y con la ayuda de la clorofila.

Se clasifican usualmente en tres grupos: monosacáridos o azúcares sencillos, tales como la glucosa, fructosa, manosa, etc; disacáridos, constituidos por monosacáridos y muy parecidos a ellos, como la sacarosa, maltosa y lactosa, y polisacáridos, que son productos de la condensación de los azúcares sencillos sin las propiedades de estos; incluyendo en este grupo las pentosanas, almidones, glucógeno, celulosa y pectinas.

En los cítricos, en especial en la mandarina, los carbohidratos son los sólidos solubles que se encuentran en mayor proporción seguidos de los ácidos orgánicos. Los principales azúcares en los zumos de las frutas cítricas son: sacarosa, glucosa y fructosa, con menores cantidades de galactosa.

Durante el tratamiento y almacenamiento de los zumos, los azúcares se ven afectados, en especial la sacarosa debido a que se va hidrolizando azúcares reductores: Glucosa y Fructosa gracias a las condiciones de temperatura a las cuales es tratado el jugo del cítrico y por la presencia de los ácidos orgánicos del propio fruto.

ÁCIDOS ORGÁNICOS:

Los frutos cítricos, se acostumbra clasificarlos como frutos ácidos, debido a que sus sólidos solubles están compuestos

principalmente por ácidos orgánicos y azúcares; Esta acidez es provocada principalmente por: el ácido cítrico y el ácido málico, aunque existen en menor cantidad los ácidos: tartárico, benzoico, succínico, oxálico y fórmico.

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

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

Por convención, la razón: sólidos solubles / acidez se ha establecido como índice de madurez apropiado.

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

Durante la maduración de las naranjas, pomelos y mandarinas, hay un aumento en la concentración de sólidos solubles sobre todo de los azúcares, y un descenso importante de la acidez (10).

Por esta razón, la relación °Brix / acidez, aumenta cuando avanza la maduración y se toma universalmente como índice de madurez (I. M.). El descenso de la acidez es continuo, pero el contenido en sólidos solubles aumenta al principio hasta alcanzar un máximo y después, se mantiene o disminuye conforme avanza la maduración.

1.3 LOS FLAVONOIDES

Existe una gran variedad de compuestos naturales que forman parte de los cítricos, los cuales generalmente se distribuyen en diferentes concentraciones a través de los tejidos de los frutos. Entre estos compuestos se encuentran los flavonoides, los cuales han llamado poderosamente la atención dentro de las industrias procesadoras de los cítricos, principalmente aquellos que alteran las propiedades sensoriales y funcionales de los jugos, concentrados y néctares (14).

Además, se han descubierto recientemente que algunos flavonoides tienen actividad terapéutica, por lo que los subproductos de las industrias procesadoras de cítricos han adquirido gran

importancia para la industria farmacéutica (14). Dichos compuestos han sido agrupados bajo los términos de "vitamina P" o vitamina de la permeabilidad y "bioflavonoides".

Los flavonoides hidroxilados y glicosilados se almacenan principalmente en las membranas capilares en la zona de unión del albedo con los gajos. Las flavonas polimetoxiladas y las flavanonas se encuentran solamente como compuestos libres en los sacos del aceite del flavedo de ciertos cítricos (14).

La estructura química base de los flavonoides es la siguiente:

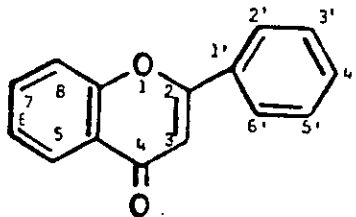


Figura 4.

Estructura química base de flavonoides.

Los flavonoides que predominan en los cítricos son las flavanonas y las flavonas, los flavon-3-oles o catequinas se encuentran sólo en pequeñas cantidades. Los iones flavilion conocidos comúnmente como antocianinas están restringidos a una pequeña variedad de cítricos. Otros flavonoides como las chalconas, las leucoantocianinas, las isoflavonas y las dehidrochalconas ya han sido detectables pero no aisladas.

En la bibliografía se reportan tablas de una gran variedad de flavonoides que han sido bien identificados en los cítricos (Tabla I). De estos, los más conocidos y que se encuentran en alta concentración son la naringina, la cual predomina en las toronjas, las naranjas ácidas, amargas y en los pomelos, y la hesperidina presente en las naranjas, los limones y algunas clases de mandarina.

NOMBRE	ESTRUCTURA QUÍMICA
Acacetina	5, 7-Dihidroxi-4' -metoxiflavona
Apigenina	4', 5, 7-Trihidroxiflavona
Aurantenina	3, 4', 6, 7, 8-Pentametoxiflavona
Cirantina	Idéntica con hespidina
Citromitina	3', 4', 5, 6, 7, 8-Hexametoxiflavanona
Cianidina	3, 3', 4, 5, 7-Pentahidroxiflavilio
Crisoeriol	4', 5, 7-Trihidroxi-3'-metoxiflavona
Critrofoliosido	Idéntico con poncirina
Delfinidina	3, 3', 4', 5, 5', 7-Hexahidroxiflavilio
Didimina	Isosakuranetin-7-rutinósido
Dihidrokaempferol	3, 4', 5, 7-Tetrahidroxiflavanona
Diosmetina	3', 5, 7-Trihidroxi-4'-metoxiflavona
Diosmina	Diosmetin-7-rutinósido
Enocitrina	Enodietiol-7-rutinósido
Enodietol	3', 4', 5, 7-Tetrahidroxiflavanona
Fortunelina	Acacetin-7-neohespidósido
Hesperetina	3', 4, 7-Trihidroxi-4'-metoxiflavanona
Hesperidina	Hesperetin-7-rutinósido
Isolimocitol	3, 3', 5, 7-Tetrahidroxi-4', 6, 8-trimetoxiflavona
Isoramnetin	3, 4', 5, 7-Tetrahidroxi-3'-metoxiflavona
Isosakuranetina	5, 7-Dihidroxi-4'-metoxiflavanona
Kaempferol	3, 4', 5, 7-Tetrahidroxiflavona
Limocitrina	3, 4', 5, 7-Tetrahidroxi-3', 8-dimetoxiflavona
Limocitrol	3, 4', 5, 7-Tetrahidroxi-3', 6 8-trimetoxiflavona
Luteolina	3', 4', 5, 7-Tetrahidroxiflavona
Naringenina	4', 5, 7-Trihidroxiflavanona
Naringina	Naringenin-7-neohespidósido
Narirutina	Naringenin-7-rutinósido
Neohesperidina	Hesperitin-7-neohesperidósido
Neoponcirina	Isosakuranetin-7-rutinósido
Nobiletina	3', 4', 5, 6, 7, 8-Hexametoxiflavona
Poncirina	Isosakuranetin-7-neohespidósido
Ponkanetina	Idéntico con tangeritina
Quercetina	3, 3', 4', 5, 7-pentehidroxiflavona
Roifolina	Apigenin-7-neohespidósido
Rutina	Quercetin-3-rutinósido
Simensetina	3', 4', 5, 6, 7-Pentametoxiflavona
Sudachitina	4', 5, 7-Trihidroxi-3, 6, 8-trimetoxiflavona
Tangeretina	4, 5, 6, 7, 8-Pentametoxiflavona
Tetrametilseutellareina	4', 5, 6, 7-Tetrametoxiflavona
Vitexina	Apigenin-8-C-glucósido

Tabla I. Flavonoides presentes en los cítricos.

Estudios realizados, permitieron establecer que las diferencias estructurales que existen entre los flavonoides de sabor amargo y los insípidos, radica en la posición del enlace entre las dos moléculas de azúcares que se enlazan a la flavona por el C7.

En la figura 5 se presenta la estructura química de la hesperidina, que es insípida y en la figura 6 la de la neohesperidina de sabor amargo presentes ambas en algunas variedades de cítricos como las naranjas. Los dos compuestos son 7-glicósidos de la hesperidina y después de su hidrólisis se obtienen como productos hesperitina, ramnosa y glucosa. Como se observa en la figura 4, en la hesperidina el C1 de la ramnosa está unido al C6 de la glucosa, este disacárido recibe el nombre de rutinosa (6-ramnoglucosa). Por otro lado, en la neohesperidina el C1 de la ramnosa se enlaza al C2 de la molécula de glucosa, este disacárido se conoce como ramnosilglucosa (14).

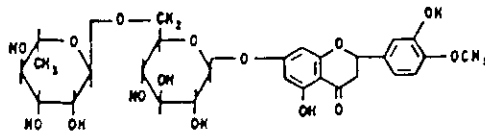


Figura 5.
HESPERIDINA.

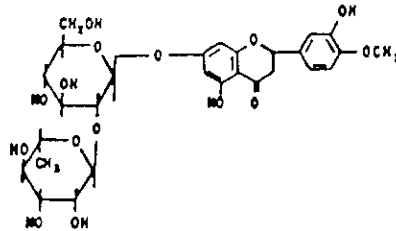


Figura 6.
NEOHESPERIDINA.

Como se mencionó , no se ha podido esclarecer hasta la fecha la función precisa de los flavonoides en los frutos y en las plantas de los cítricos. No obstante se ha encontrado que la nobiletina, 5, 6, 7, 8, 3', 4' - hexametoxiflavona, presente en algunas variedades de mandarina, muestra actividad fungistática contra el hongo Deuterophoma tracheiphila. Este hongo patógeno provoca el "mal seco" en ciertos árboles de los cítricos como son los limones, las naranjas y las toronjas. Así mismo, se encontró que la tangeretina, presente en la tangerina, tiene una ligera acción fungistática, mientras que la hesperidina muestra un efecto estimulador hacia dicha plaga . En otros estudios se encontró que la naringenina, que es el aglicón de la naringina, se presenta en los brotes de las flores de durazno y actúa como regulador, inhibiendo su crecimiento.

Aunque en general se considera que el contenido de flavonoides en los cítricos disminuye con la maduración, esto no ha sido demostrado claramente. Huet en 1902, encontró que el contenido de flavonoides en naranjas y toronjas disminuye en ciertas temporadas, mientras que en otras se mantiene constante. Por otro lado, se encontró que el contenido de neohesperidina en la naranja ácida y de poncirina en el pomelo, desaparece con la maduración, mientras que la naringina permanece constante (14).

En otros estudios se sugirió que la disminución de la concentración de un flavonoide durante la maduración se debía a un cambio en la estructura química más que a su degradación. En el caso de la naringina, Rowell y Biesel encontraron una conversión a roifolina (4', 5, 7-trihidroxi-flavona), un ramnosido insípido de la apigenina, mientras que Horowitz planteó la posibilidad de una transglicosilación del 2-ramnoglucósido al 6-ramnoglucósido, el cual ya no es amargo. Posteriormente Hagen y colaboradores sugirieron que la disminución de la concentración de la naringina se debió adicionalmente a un efecto de dilución al aumentar el tamaño de la fruta, ya que la concentración relativa de los diferentes flavonoides cuantificados permaneció constante durante la maduración.

1.3.1 IMPORTANCIA DE LA NARINGINA.

En la industria de los cítricos el flavonoide que más ha llamado la atención es la naringina, presente principalmente en la toronja. La naringina cuyo nombre químico es el naringenin-7-neohesperidósido, es el principal sabor amargo del fruto. A este respecto, se ha descubierto que la limonina, un triterpenoide dilactónico también contribuye de manera sustancial al sabor amargo presente en el jugo de la fruta. La estructura química de la naringina se muestra en la figura 7.

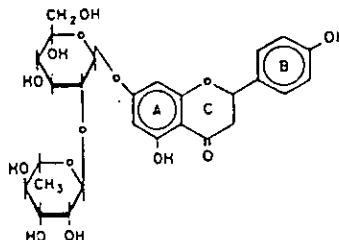


Figura 7.
NARINGINA

La naringina es insoluble en agua, por lo que cuando esta presente en altas concentraciones, puede provocar otras alteraciones al jugo durante su procesamiento o almacenamiento. Cuando este se calienta para ser pasteurizado, la naringina queda suspendida en el

líquido; al enfriarse el jugo, el flavonoide cristaliza y precipita, lo que trae consigo problemas en la manipulación.

La naringina fue descubierta en 1857 por De Vry en las flores de la toronja crecidas en Java. Posteriormente se detectó su presencia en la fruta, en las semillas y en el albedo, incluyendo las membranas que dividen los gajos del fruto (13).

Poco se sabe de los caminos biosintéticos de la naringina y la limonina en la toronja. Algunos estudios han mostrado que el anillo A lactónico de la limonina se sintetiza en las hojas y en los tallos y se transloca a las semillas principalmente. Por su parte la naringina puede ser sintetizada por cualquier tejido de la planta o de la fruta. Ambos compuestos no están ni estructural ni biosintéticamente relacionados, por lo que sus patrones de distribución en la fruta son independientes.

Las frutas intactas naturalmente no contienen limonina pero si, el anillo A lactónico del ácido limónico, un precursor no amargo. Este último se convierte gradualmente en limonina después de la extracción del jugo, por lo que el sabor amargo que imparte al jugo comúnmente se denomina "amargor tardío". Otros limonoides de sabor amargo como la romilina, el ácido nomilínico y la ichangina también están presentes en el jugo de toronja para su efecto es despreciado porque se encuentran en muy bajas concentraciones.

McIntosh y colaboradores, determinaron estadísticamente que no había correlación entre los niveles de naringina y limonina presentes en el jugo, por lo que la cuantificación de uno no permite predecir la concentración del otro. Los niveles de ambos compuestos en los diferentes tejidos de la planta son muy variados y dependen del estado de desarrollo y edad del tejido.

Si bien es cierto que el sabor amargo del jugo de toronja es apreciado por algunos consumidores, también es la principal razón por la que su consumo no se ha generalizado. Aunque su bajo nivel de naringina es deseable para identificar el sabor característico del jugo de toronja el problema se presenta cuando el nivel de concentración está por arriba de 700 ppm (mg/l). Generalmente esto ocurre cuando la fruta se somete a una excesiva extracción mecánica para tratar de obtener altos rendimientos de jugo.

Por lo general se acepta que la calidad de las toronjas varía de una estación a otra. Sin embargo, con el fin de normalizar la calidad del jugo, el Departamento de Cítricos del Estado de Florida en Estados Unidos de Norteamérica, estableció una regulación para evitar que los niveles de naringina y limonina causen un sabor excesivamente amargo que lo haga inaceptable al paladar. La regulación solo se aplica del 1o. De Agosto al 1o. de Diciembre de cada año, por lo que afecta a un pequeño porcentaje del total de fruta procesada anualmente. La regulación establece que un jugo como producto enlatado deberá reunir por lo menos uno de los siguientes requisitos:

a) contener menos de 600 ppm (mg/ml) de naringina o bien b) contener menos de 5 ppm (mg/ml) de limonina medida por técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (13).

1.3.2 IMPORTANCIA DE LA HESPERIDINA EN LA ELABORACIÓN DE JUGOS.

La hesperidina, el 7-(6-ramnósido- β -glucósido) de la 4'-metoxi-3', 5, 7-trihidroxi-flavona (hesparitina), predominan en las naranjas, limones y mandarinas. Cuando se presenta en altas concentraciones se forma un flóculo que precipita en los jugos como resultado de la cristalización durante el almacenamiento (29).

Pocos métodos se han desarrollado para reducir o eliminar la concentración de la hesperidina en los jugos, principalmente el de mandarina. Se reportó la adición de metilcelulosa a los jugos antes del enlatado. Posteriormente, el uso de columnas con resinas de estireno, lo cual evita la formación del flóculo durante el almacenamiento y el jugo conserva su turbidez y color propios.

Por otro lado también se ha utilizado hesperidinasas para la degradación enzimática del flavonoide a un glucósido más soluble, como lo es la hesperetina. Okade y colaboradores aislaron la enzima que fue obtenida simultáneamente al la naringinasa, a partir de cepas de Aspergillus niger y demostraron su especificidad hacia el sustrato.

1.4 CARACTERIZACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE JUGOS CÍTRICOS Y PRODUCTOS RELACIONADOS.

Durante los pasados 25 años las características espectrales, incluyendo tanto ultravioleta como el visible a específicas longitudes de onda, han sido estudiadas para poder monitorear las propiedades deseables y las no deseables de los jugos cítricos.

Las investigaciones realizadas han incluido el efecto de las variables del procesamiento del jugo en la absorción ultravioleta del jugo de toronja; determinación del contenido de hesperidina en jugo de naranja y extractos de cáscara por absorción ultravioleta; el análisis espectral de carotenoides y extracción de carotenos de muestras comerciales de concentrados de jugo de naranja congelado marca Florida y de otros cítricos como el de la mandarina; determinación del contenido de polifenoles en jugo de limón por absorción ultravioleta y las características ultravioletas espectrales de jugo de limón bajo condiciones adversas de almacenamiento (21,25).

Las múltiples variables asociadas con el crecimiento y procesamiento de las frutas cítricas dificultan la aportación exacta de la naturaleza tanto química como física de un producto cítrico. Sin embargo, los análisis espectrofotométricos han probado ser una poderosa herramienta para poder definir esas características físico-químicas de los cítricos (21,24).

1.4.1 JUGO DE NARANJA.

Petrus y Dougherty (24) se dieron cuenta de que una gran cantidad de información podría ser de mucha utilidad, obteniendo los espectros de absorción del ultravioleta y del visible de un extracto alcohólico de una muestra de jugo de naranja. Para este fin, estos investigadores emplearon esta técnica para mostrar los cambios en los jugos de naranjas Florida Hamlin y Valencia así como en el jugo de piña durante la maduración del fruto y su procesamiento. Un espectro típico de absorción ultravioleta-visible del jugo de naranja Valencia es mostrado en la figura 8. Las curvas espectrales para piña y jugo de naranja Hamlin fueron similares, excepto por ligeras diferencias en las intensidades de absorción.

La figura 8 muestra varios picos a los 465, 443 y 425nm en el espectro visible y a 325, 280 y 245nm en el espectro ultravioleta. Los picos presentes en el espectro visible nos indican la presencia de los carotenoides (24,26). Petrus y colaboradores (26) demostraron que la suma de las absorbancias de los carotenoides a los 465, 443 y 425nm fueron altamente correlacionados ($r = 0.973$) con los datos obtenidos con el Colorímetro de cítricos Hunter modelo D-45. El Colorímetro Hunter es un instrumento de refractancia que mide la proporción de los colores rojos y amarillos del jugo y es empleado en la industria de los cítricos para determinar el color de los jugos de naranja y otros cítricos.

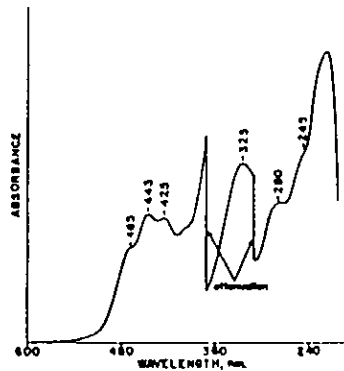


Figura 8.

Espectro de absorción de jugo de naranja Florida Valencia (5).

El espectro ultravioleta que se muestra en la figura 8 se debe a la presencia del ácido ascórbico (245nm), flavonoides totales (280nm) y polifenoles totales (325nm) (25). La absorbancia a los 280nm indica el contenido de los flavonoides; de cualquier manera, es importante hacer notar que la mayoría de los flavonoides no tienen sus máximos de absorbancia en esta longitud de onda.

Horowitz y Gentili (11) recopilaron una extensa lista de longitudes de onda máximas de absorción al ultravioleta para muchas flavonas Glucosiladas, flavanonas Glucosiladas, C-glicosilflavonas y flavonas aglicones encontrados en las frutas cítricas. Los flavonoides más encontrados en el jugo de naranja y sus λ máximas (11) son: Hesperidina (285nm), naringina 7B-rutinósido (285nm), isosakuranetina 7B-rutinósido (283nm), naringina 7B-rutinósido 4'B-D-glicósido (283nm) y eriocitrina (285nm).

La absorbancia en la región de 325-335nm ha sido empleada por Vandercook y Rolle para medir la cantidad total de los polifenoles en el jugo de limón y por Petrus y Dougherty (24) en jugo de naranja y pulpa lavada de naranja. Vandercook y Rolle mostraron que existe una gran correlación entre la absorbancia a 325nm (fenoles totales) y el contenido de ácido cítrico en jugo de limón.

Se han realizado estudios de como varían las proporciones de cada uno de los compuestos analizados por esta técnica en jugo de naranja Valencia (24). De acuerdo a estos estudios se pudo concluir la cantidad de carotenoides (443nm) se incrementó con la maduración sin ser afectada con la presión de extracción del jugo. La absorción a 325nm (polifenoles totales) y a 280nm (flavonas totales) se incrementó con la maduración y con la presión de extracción del jugo; Las presiones altas de extracción causan una mayor incorporación de membranas capilares y de albedo al jugo obtenido del cítrico, entre mayor sean las concentraciones de flavonoides y los principios de acidez en el jugo, la calidad de este se ve reducida, cuando proporciones excesivas de estos constituyentes son procesadas junto con el producto. Soluciones alcohólicas de las membranas capilares y albedo presentan grandes absorbancias a los 325nm y 280nm (24).

La absorción a los 245nm se atribuye a la vitamina C y se incrementa ligeramente durante la maduración del cítrico (naranja Hamlin). Si la presión de extracción del jugo del cítrico aumenta, también aumenta la cantidad de vitamina C en el jugo, esto se debe a

que gran cantidad de esta vitamina se encuentra en la cáscara del cítrico, por lo tanto la absorbancia a los 245nm aumenta considerablemente. En algunos casos como el de la naranja Valencia se ha observado que la cantidad de Vitamina C decrece durante la maduración.

1.4.2 EXTRACCIÓN ACUOSA DE SÓLIDOS SOLUBLES DE NARANJA.

La extracción de los sólidos solubles de la naranja es un subproducto del proceso industrial del proceso de los cítricos. Este subproducto es conocido como lavado de pulpa (pulp wash) o en su defecto como extracción acuosa de sólidos solubles de la naranja (WEOS). Este proceso es llevado a cabo de la siguiente manera: después de la extracción del jugo de las naranjas, el jugo es separado de los residuos el exceso de pulpa, semillas y otros componentes que afecten la calidad final del jugo, por una máquina que finaliza con el proceso de lavado. Los componentes residuales contienen adsorbido el jugo de naranja, para poder extraer ese jugo, esta parte del mismo es procesado con un lavado con agua (para extraer el jugo adherido) empleando una o más etapas de lavado seguidas de una concentración hasta tener de 45 a 65°Brix. La finalidad de esta proceso en la extracción del jugo de naranja es, poder incrementar el rendimiento. Este jugo extra es procesado junto con el jugo original extraído en la primera vez en, concentrados de jugo congelados o empleado como

base de bebidas. Desafortunadamente, el objetivo principal fue distorsionado, y este producto benéfico llegó a ser el mayor adulterante de los jugos y concentrados de estos. El departamento de Cítricos de los Estados Unidos cita en la norma 20-64.07 que prohíbe la adición de la extracción de los sólidos solubles del jugo de naranja a los concentrados del mismo fruto en el estado de Florida.

Mediante el uso de los barridos espectrofotométricos se puede detectar en un concentrado de naranja o de otro cítrico el empleo del lavado de pulpa, debido a que al incorporar una mayor cantidad de pulpa, residuos y sólidos extraídos en la fase acuosa, la absorbancia a las longitudes de 325 y 283nm se ve considerablemente incrementada por la notable extracción de los flavonoides (24,28). Por el contrario la cantidad de carotenos disminuye notablemente, incluso a la mitad al adicionar este lavado de pulpa al jugo del cítrico por efectos de dilución.

1.5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN.

La cromatografía de líquidos de alta presión es una herramienta poderosa muy empleada en el análisis de los alimentos. Una de sus principales aplicaciones es el análisis de los carbohidratos solubles en los jugos y néctares de frutas cítricas. El análisis de estos carbohidratos se realiza con la ayuda de una columna aminada, en donde las fuerzas de unión que se dan en la separación de los mismos son las llamadas bases de Schiff, entre los grupos amino de la columna y los carbohidratos (18).

Otra importante aplicación de la cromatografía líquida de alta presión en el análisis de los alimentos, resulta ser la separación y análisis de los compuestos flavonoides presentes en los jugos cítricos. Esta separación se realiza mediante el empleo de una columna de fase inversa con un empaque enlazado hidrofóbicamente con un grupo funcional octadecilo (C₁₈) u octilo (8) y una fase móvil polar, frecuentemente una fase móvil parcial o totalmente acuosa. El metanol y acetonitrilo son disolventes populares porque tienen baja viscosidad y son fáciles de conseguir con excelente pureza (18, 35).

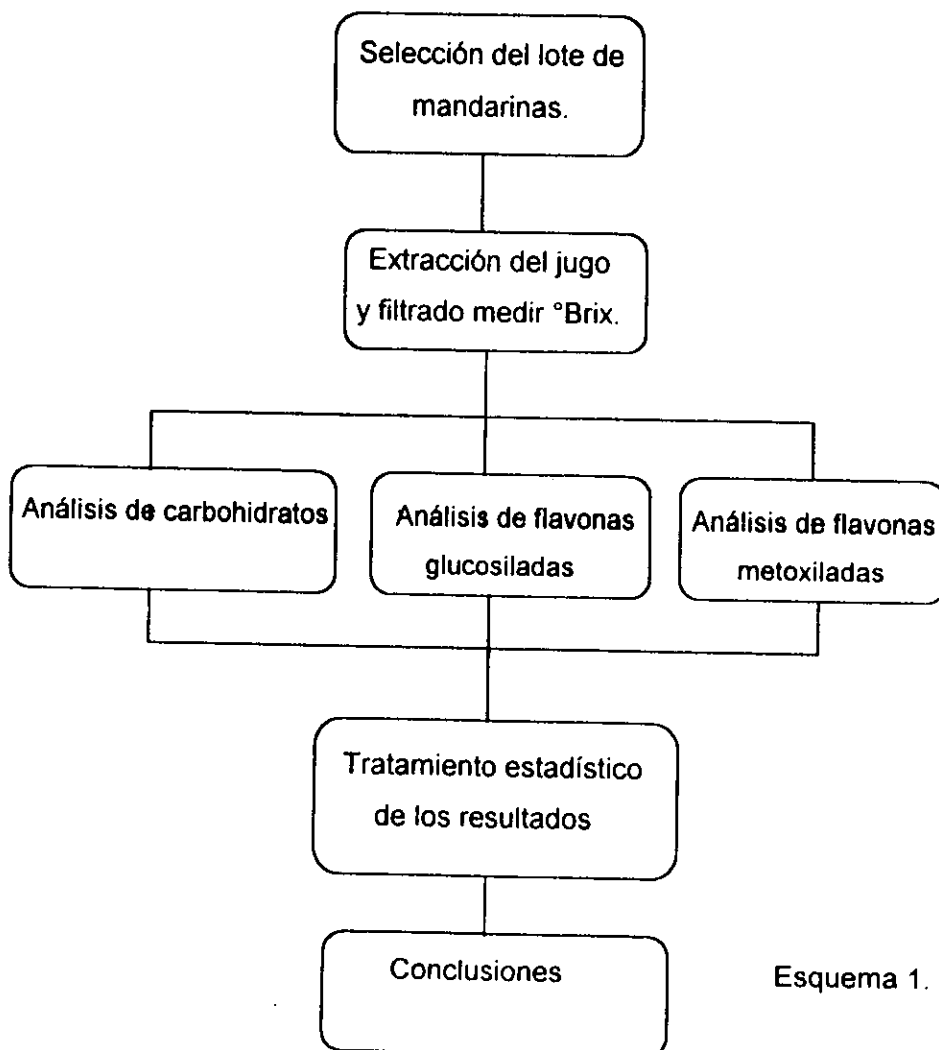
En cromatografía de fase inversa la fuerza motriz de la retención no es la interacción favorable del soluto con la fase estacionaria, sino el efecto del disolvente de la fase móvil para forzar al soluto hacia adentro de la capa hidrocarbonada (18, 35).

CAPÍTULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

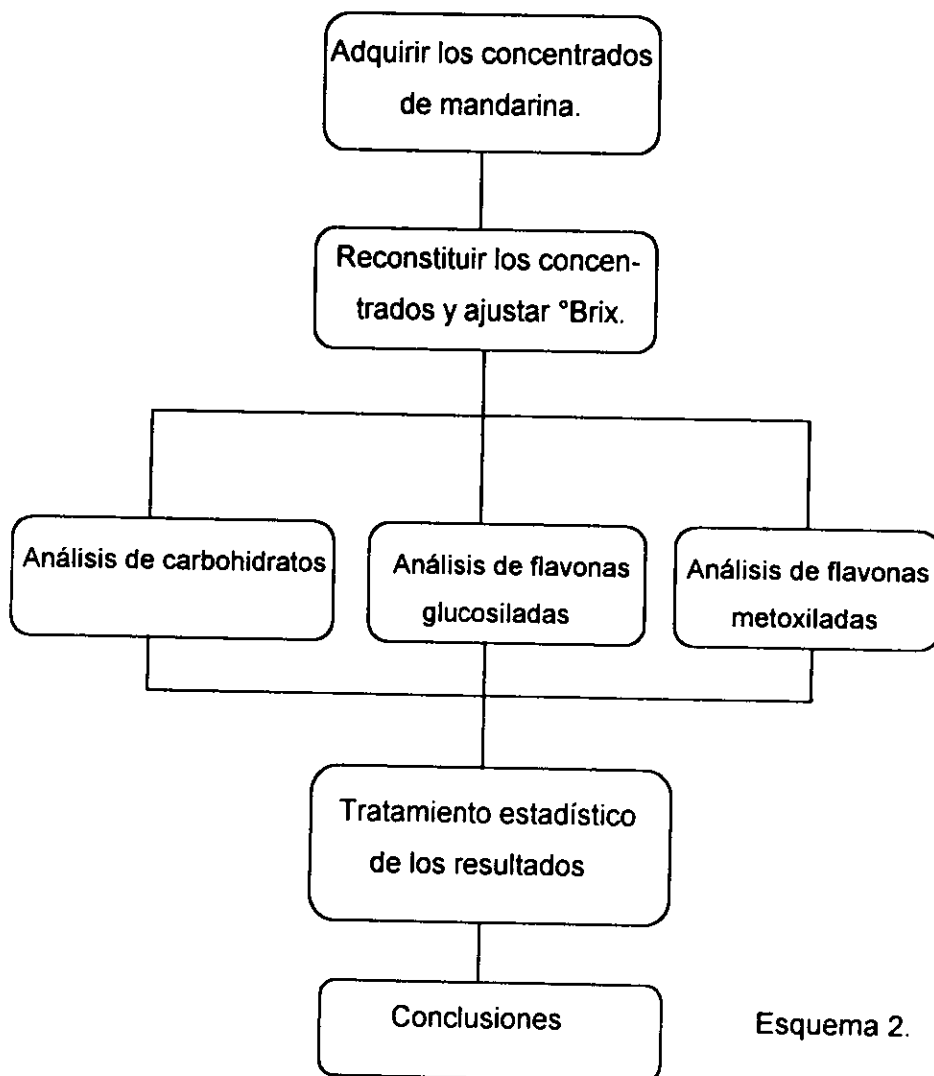
2.1 METODOLOGÍA.

En el esquema 1 se presenta el desarrollo experimental seguido en el análisis del jugo de mandarina:



Esquema 1.

Metodología empleada para el análisis de los concentrados 1, 2.



Esquema 2.

2.2 MATERIA PRIMA.

Las variedades de mandarinas empleadas fueron:

- ◆ Mandarina Mónica. *Citrus Nobilis*.
- ◆ Mandarina Fremon. *Citrus Poonensis*.
- ◆ Mandarina Común. *Citrus deliciosa Tenore*.

Así mismo se analizaron dos concentrados de jugo de mandarina que se identificarán como concentrado 1 (Conc. 1) y concentrado 2 (Conc. 2). Cabe destacar que estos concentrados se reconstituyeron a manera de tener un equivalente a un jugo de mandarina natural, esta parte se explica con mayor detalle en la descripción de la metodología.

SELECCIÓN DEL LOTE DE MANDARINAS.

Para realizar la selección del lote de mandarinas fue necesario esperar a que las mandarinas de las temporadas a analizar estuvieran en su estado de madurez óptimo para poder realizar el estudio y obtener lotes representativos de frutos maduros.

En lo que respecta a la mandarina Mónica, que es la primera que se analizó, la compra de esta se realizó en el mes de Febrero de 1997 en un mercado de la Ciudad de México. En este caso se compraron 10Kg de la mandarina con un estado de madurez homogéneo. La siguiente variedad de mandarina que se compró fue la que

corresponde a la variedad Fremon, esta mandarina se adquirió en el mes de Octubre de 1997. En esta fecha la mandarina se encontraba en su estado de madurez óptimo para ser consumida y poder ser analizada, la compra se realizó en el mismo mercado donde se compró la variedad anterior adquiriendo 10Kg de mandarina para poder seleccionar de la misma el lote a ser analizado.

La última variedad de mandarina estudiada fue la mandarina Normal de invierno, esta se adquirió en el mes de Diciembre de 1997. Al igual que las variedades anteriores se compraron 10Kg de mandarina lo más homogéneas posible y en su estado de madurez óptimo.

Los concentrados de mandarina que se compraron fueron el concentrado 1 y 2. La razón por la cual se decidió hacer el análisis de estos dos concentrados de mandarina es por la gran demanda que tienen en el mercado, así mismo por que pueden ser encontrados durante todo el año en tiendas de autoservicio.

EXTRACCIÓN DEL JUGO Y RECONSTITUCIÓN DE LOS CONCENTRADOS.

Contando con las mandarinas que se habían comprado se procedió a realizar una selección de las mismas. Para hacer la selección del lote a analizar se clasificaron las mandarinas de acuerdo

a su tamaño y al color, después se seleccionaron las mandarinas más homogéneas necesarias para tener 1.5Kg y proceder a realizar la extracción del jugo.

Una vez seleccionadas las mandarinas se procedió a lavarlas y eliminarles todo tipo de suciedad a manera de evitar la posible contaminación del jugo al momento de la extracción. Ya secas, con un cuchillo afilado se cortó cada una de las mandarinas sobre una superficie sólida y limpia, se procedió a extraer el jugo con la ayuda de un exprimidor de jugos de naranja de bajas revoluciones, sin llegar a romper la cáscara. El jugo se recolectó en un recipiente de boca ancha y se vertió sobre una manta de cielo contenida en otro recipiente a manera de poder retener en la misma la mayor cantidad posible de gajos y partículas insolubles que afectaran los análisis por realizar. Al final de estos procedimientos se logró obtener una cantidad aproximada de jugo de 500ml, suficiente para realizar todos los análisis.

El jugo fue almacenado en congelación en recipientes de plástico de 150ml.

En lo que respecta a los concentrados de mandarina, estos al momento de ser comprados se adquirieron congelados, por lo cual se procedió a descongelarlos para poderlos manipular de una forma sencilla. Se pesó la cantidad necesaria para obtener un jugo de mandarina natural de acuerdo a los °Brix, por lo tanto se ajustaron a

los 11°Brix. Al igual que el jugo de mandarina natural se congelaron en viales que permitieron su fácil manejo al momento de analizar.

Para realizar cada uno de los análisis se partió del extracto de jugo de cada variedad o de la solución reconstituida de cada concentrado de mandarina tomando tres alícuotas, y cada una de ellas fue analizada por triplicado a manera de repetición.

ANÁLISIS DE CARBOHIDRATOS.

Para realizar el análisis de carbohidratos se procedió de la misma manera tanto en los concentrados de mandarina como en el jugo de natural de mandarina.

Se tomaron 10ml de jugo de mandarina y se diluyeron con agua al mismo volumen y se centrifugaron a 12,500rpm por 3min en tubos eppendorf. Se filtró el jugo, teniendo cuidado de no resuspender el sobrenadante, a través de una membrana de 0.25 μ haciendo uso de una jeringa. En este momento se procedió a realizar las inyecciones correspondientes en el cromatógrafo de líquidos de alta presión bajo las siguientes condiciones de análisis:

◆ **Cromatógrafo de líquidos de alta presión.**

Beckman. 421A Controler.

Solvent Delivery Module 110B.

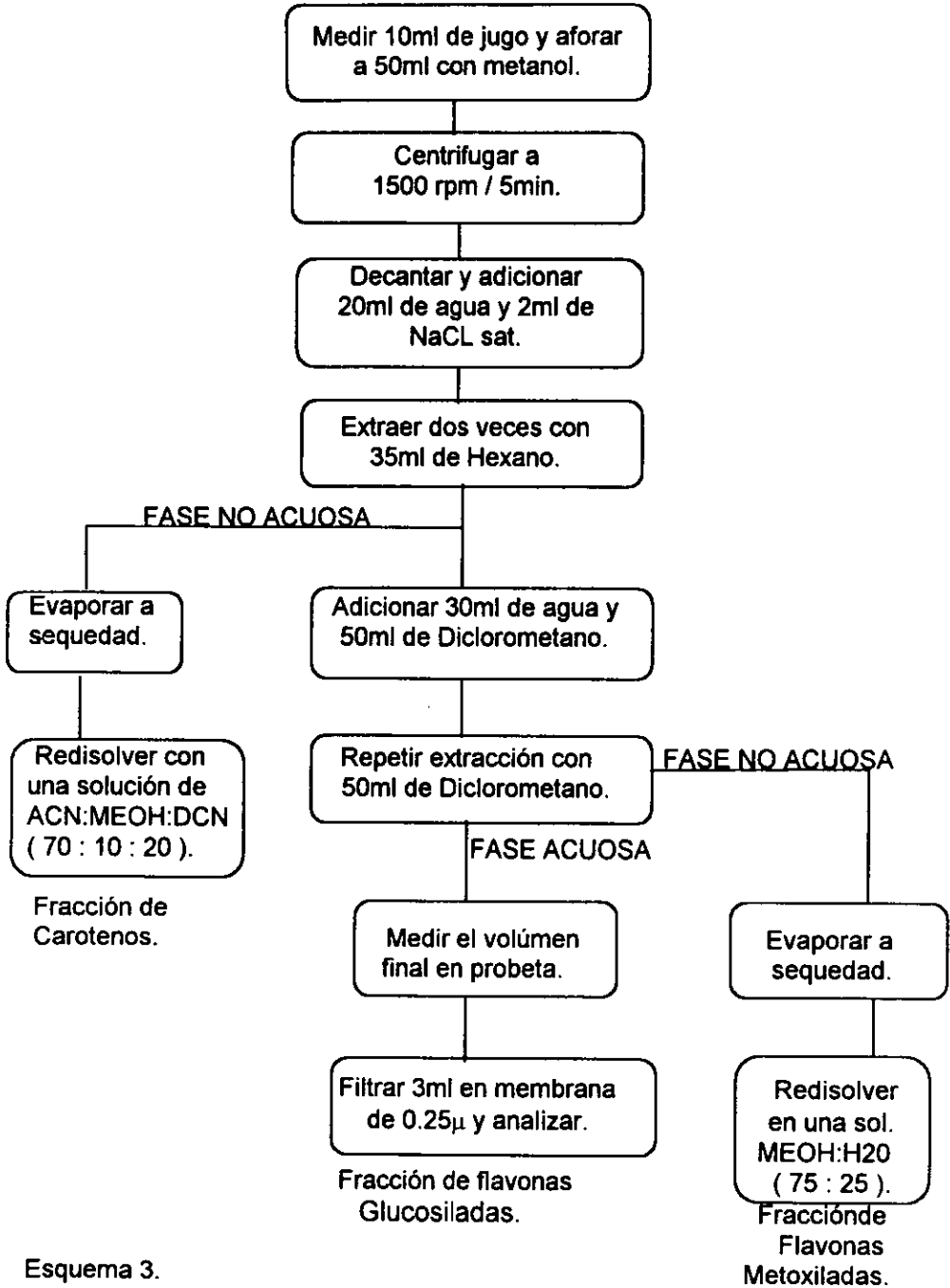
Made in U. S. A.

- ◆ Columna: Waters C18. Carbohydrate.
- ◆ Detector: Índice de Refracción.
Perkin Elmer. LC-30 RI Detector.
Tiempo de respuesta de 2min.
- ◆ Integrador : Varian 4400 Integrator.
Chart Speed 0.25.
Atenuación 64.
- ◆ Condiciones de análisis:
Loop 20 μ l
Fase móvil: ACN :H₂O (87 : 13) isocrática.
Flujo: 1.4 ml / min.
Tiempo de análisis: 18 min.

Para realizar las mediciones y ajustes de los sólidos solubles en los concentrados de mandarina se utilizó un refractómetro de campo. En la parte de extracción de los carbohidratos de cada una de las muestras se empleó una centrifuga Eppendorf.

ANÁLISIS DE FLAVONAS GLUCOSILADAS Y METOXILADAS.

En el esquema 3 se encuentra representada la metodología que se siguió para realizar las extracciones de las fracciones correspondientes a las Flavonas glucosiladas , Flavonas metoxiladas y Carotenos.



Esquema 3.

En este esquema se puede observar que al final de todo el proceso de extracción del jugo de mandarina se obtienen tres fracciones finales las cuales contienen en determinadas concentraciones los compuestos a ser analizados, Flavonas glucosiladas, Flavonas metoxiladas y Carotenos.

La fracción acuosa es la que contiene las Flavonas glucosiladas que fueron analizadas en cromatografía líquida de alta presión bajo las siguientes condiciones:

- Cromatógrafo de líquidos de alta presión.
Beckman. System Gold.
Programable Solvent Module 126.
Programable Detector Module 166. Detector Uv / Vis.
Made in U. S. A.
- ◆ Columna: Beckman C₁₈, 5 μ , 4.6mm x 25 cm , ODS.
- ◆ Condiciones de análisis:
 - Loop 20 μ l.
 - Fase móvil: H₂O:THF (80:20) gradiente en 10 min para llegar a una proporción de H₂O:THF (50:50) y en un minuto regresar a las proporciones iniciales.
 - Flujo: 0.8 ml / min.
 - Detector: UV / Vis a 305nm.
 - Tiempo de análisis: 13min.

En la cuantificación de las flavonas glucosiladas se realizó una curva patrón de Hesperidina, de la cual se cuenta con un estándar. Se prepararon soluciones de concentración conocida de esta flavona y se realizaron las inyecciones correspondientes en el cromatógrafo de líquidos de alta presión de acuerdo a las condiciones ya mencionadas.

En lo que respecta a la fracción del Diclorometano, se encuentran contenidas las Flavonas metoxiladas. Como se muestra en el esquema 3, se realizó una evaporación a sequedad de la fracción del diclorometano para concentrar el extracto y poder ser analizado. Cabe resaltar que la concentración de las mismas se hace con la ayuda de un rotavapor a manera de evaporar el disolvente a sequedad y redissolver en 1ml de una solución de MEOH : H₂O (75 : 25). Las condiciones de análisis de las flavonas metoxiladas son las siguientes:

◆ Cromatógrafo de líquidos de alta presión.

Beckman. System Gold.

Programable Solvent Module 126.

Programable Detector Module 166. Detector Uv / Vis.

Made in U. S. A.

◆ Columna: Nova-Pac C₁₈, 3.9 x 150 mm Column.

◆ Condiciones de análisis:

Loop 5µl.

Fase móvil: ACN : H₂O (35:65) isocrática.

Flujo: 1.0 ml / min.

Detector: Uv / Vis a 353nm.

Tiempo de análisis: 13min.

En lo que respecta a los Carotenos contenidos en la fase del Hexano no fueron analizados en este proyecto, la recuperación solo se realizó para fines de eliminar los compuestos que puedan interferir en el análisis de las flavonas en estudio.

BARRIDOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

Para la realización de los barridos espectrofotométricos se sigue la siguiente metodología:

- Tomar 10ml de jugo de mandarina o reconstituido de mandarina con pipeta graduada.
- Verter el jugo en matraces de 50ml y aforar con ETOH absoluto y dejar reposar toda la noche.
- Filtrar en papel filtro Whatman de filtración media.
- Verter el sobrenadante en celdas espectrofotométricas de cuarzo y realizar los barridos espectrofotométricos de acuerdo a las siguientes condiciones de análisis:
- Espectrofotómetro : UV/Vis Beckman.
DU-65 Spectrophotometer.
- ◆ Celdas de cuarzo.
- Velocidad de barrido: 500nm/ min.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Para analizar los resultados obtenidos en la parte correspondiente al análisis de las flavonas glucosiladas se procedió a conocer la media de los resultados obtenidos de los análisis realizados en el cromatógrafo de líquidos, posteriormente se calculó la desviación estándar y el coeficiente de varianza.

En la parte del análisis de las flavonas metoxiladas se procedió de la misma forma antes descrita sin llegar a la cuantificación de las mismas debido a la falta de un estándar, así mismo se logró establecer el perfil de estas flavonas en cada variedad de mandarina analizada.

Por último se procederá a analizar los resultados correspondientes a la parte del análisis de carbohidratos, en esta parte se conocerá la media y mediante las interpolaciones correspondientes en la curva patrón se conocerá la proporción y cantidad de cada uno de los azúcares presentes en las muestras para después poder concluir.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la realización de este proyecto se obtuvieron resultados de cuatro diferentes análisis, de acuerdo a esto la presentación de los resultados y la discusión de los mismos se dividirá en las mismas partes y posteriormente concluir.

JUGO DE MANDARINA

3.1 FLAVONAS GLUCOSILADAS.

En lo que corresponde a la parte del análisis de las flavonas glucosiladas en el jugo de mandarina, se encontró que cada una de las muestras presentó tres registros. Los tiempos de retención de estos tres registros en cada una de las muestras fueron constantes en cada una de las variedades de mandarina analizadas, por lo cual se puede decir que el jugo de mandarina solo presentó tres flavonas glucosiladas.

En cada uno de los cromatogramas se observa que aparecen registros desde los primeros 2min hasta los 4.5min, cabe resaltar que estos registros corresponden al volúmen muerto de la columna, esto es, al disolvente en donde se encuentra contenida la muestra. Los registros que corresponden a las flavonas glucosiladas aparecen a partir de los 8.5min hasta los 11.5min.

El primer registro que aparece en los cromatogramas de cada una de las variedades de mandarina corresponde a la flavona glucosilada Hesperidina, para poder conocer esto, a uno de los extractos acuosos de una muestra se le añadió una cantidad conocida de estándar de Hesperidina con una pureza del 88.183% y se observó que la respuesta de este pico se incrementó considerablemente y proporcionalmente a la cantidad de Hesperidina adicionada, de acuerdo a esto se puede decir con certeza que este registro corresponde a la Hesperidina.

Para descartar la posibilidad de que alguna de las flavonas glucosiladas detectadas, en cada una de las variedades de mandarina, correspondiera a la Naringina, se añadió una cantidad conocida de un estándar de esta flavona al extracto acuoso y se observó que el tiempo de retención del estándar de Naringina no correspondía a los obtenidos en la mandarina.

Para poder cuantificar las flavonas glucosiladas presentes en cada una de las variedades de mandarina analizadas, sería necesario conocer la naturaleza de cada uno de los registros obtenidos para preparar curvas patrón de cada flavona y realizar la cuantificación. Debido a que no se contó con esa información se preparó una curva patrón del único estándar de flavona, esto es, Hesperidina tomando en consideración que cada una de las flavonas podría presentar diferente respuesta a la técnica de análisis, por lo tanto las concentraciones de las flavonas estarán dadas como mg de Hesperidina/ ml de jugo.

En la realización de la curva patrón se prepararon tres soluciones de Hesperidina de concentraciones conocidas y fueron analizadas en el cromatógrafo de líquidos de alta presión por triplicado de acuerdo a las condiciones establecidas con anterioridad obteniendo los siguientes resultados:

Datos de la curva patrón de Hesperidina.

Concentración	Area 1	Area 2	Area 3	Tr prom	Area prom
0.01 mg / ml	1.89	1.88	1.88		1.883
	2.07	2.11	2.09	9.033	2.090
	1.95	1.99	1.90		1.946
0.02 mg / ml	3.42	3.35	3.40		3.39
	3.33	3.23	3.28	8.956	3.28
	3.05	3.10	3.08		3.076
0.05 mg / ml	7.65	7.69	7.67		7.67
	8.24	8.33	8.29	8.990	8.28
	7.85	7.84	7.90		7.860
0.08 mg / ml	11.63	11.62	11.62		11.623
	11.97	11.97	11.93	8.953	11.956
	11.75	11.78	11.73		11.750
0.10 mg / ml	14.28	14.32	14.29		14.296
	13.33	16.42	16.35	8.936	16.360
	15.54	15.61	15.49		15.540

La pureza de la Hesperidina es de 88.183% por lo que:

Concentración.	Concentración real.	Area promedio.	Desv Std. Del Area.	% CV.
0.01 mg / ml	0.0088 mg / ml	1.972	0.327	16.61
0.02 mg / ml	0.0176 mg / ml	3.248	0.399	12.28
0.05 mg / ml	0.0440 mg / ml	7.936	0.558	7.04
0.08 mg / ml	0.0705 mg / ml	11.776	0.409	3.487
0.10 mg / ml	0.0881 mg / ml	15.398	1.019	6.620

Datos de la regresión:

A= 0.4104
B= 147.31
r= 0.99885

Nota: Durante la presentación de resultados del análisis de las flavonas se manejará el término de Tr1, Tr2, etc., esto hace relación a los diferentes tiempos de retención en orden creciente en minutos.

Se pudo apreciar en todos los cromatogramas que la separación de las flavonas glucosiladas con esta técnica mostró buena resolución.

MANDARINA MÓNICA.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos del análisis de flavonas glucosiladas de la mandarina Mónica. Se observa que la mandarina Mónica presentó una relación de la hesperidina con respecto a las otras dos flavonas de: Hesperidina : Flavona 2 : Flavona 3 (3:1:1). Cabe señalar que la denominación que se le asignó a cada una de las flavonas está de acuerdo con el orden de aparición en los cromatogramas con respecto al tiempo de retención, ya que no se conoce su estructura química y por tanto su nomenclatura química (cromatograma 1).

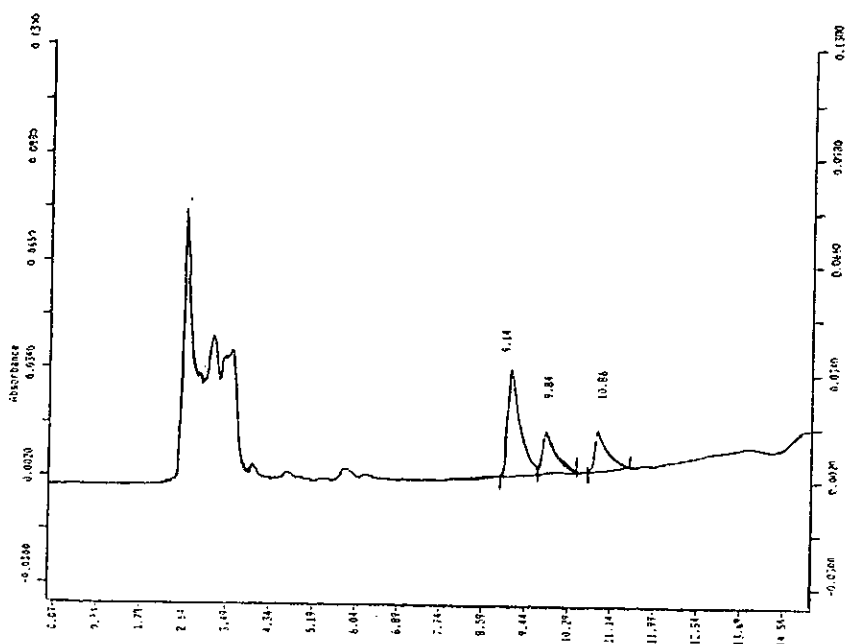
Como se aprecia en la tabla 2 al igual que en el resto de las tablas (3,4) de flavonas glucosiladas de las variedades de mandarinas

analizadas, las desviaciones estándar y los coeficientes de varianza son muy pequeños, lo cuál indica que la respuesta de las flavonas a esta técnica es constante.

No Extracto	Area 1.	Area 2.	Area 3.
1	8.96	3.53	3.49
1	9.12	3.64	2.76
1	9.23	3.67	3.33
2	9.06	3.54	3.4
2	8.90	3.44	3.39
2	8.87	3.49	3.38
3	9.08	3.57	3.47
3	9.13	3.59	3.36
3	9.15	3.47	3.32
Promedio	9.06	3.55	3.32
Tr. Prom (min)	9.13	9.83	10.86
Desviación	0.12115	0.07672	0.21839
% CV	1.33787	2.16183	6.57363
[] mg/ml	0.54	0.19	0.17

Tabla 2 . FLAVONAS GLUCOSILADAS EN MANDARINA MÓNICA.

Sumando las concentraciones promedio finales de las tres flavonas se puede ver que se tiene un total de 0.9 mg / ml \pm 0.01 de jugo de mandarina.



Cromatograma 1.
Perfil de flavonas glucosiladas en mandarina Mónica.

MANDARINA FREMON.

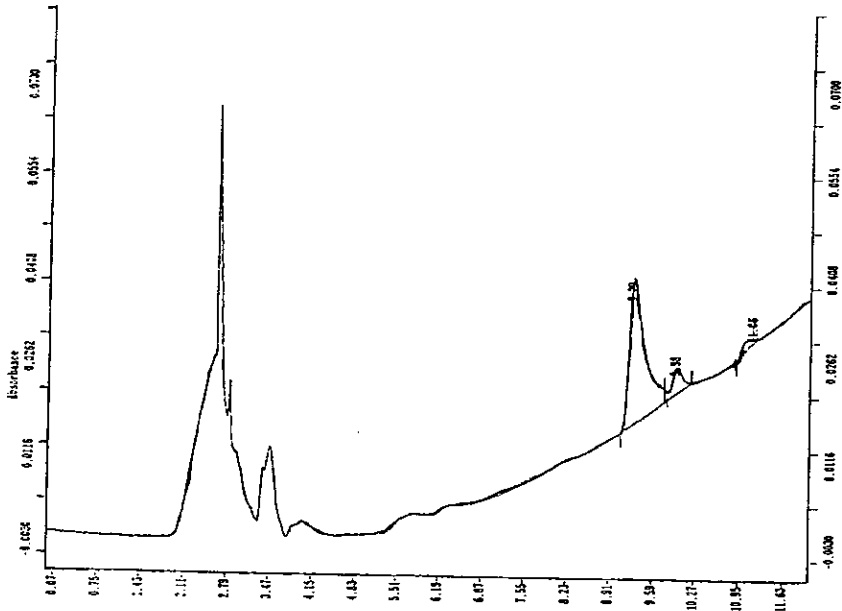
La siguiente variedad de mandarina analizada fue la mandarina Fremon (cromatograma 2), al igual que la variedad Mónica y Común, esta mandarina presentó los mismos tres registros que corresponden a las flavonas antes mencionadas, los datos se presentan en la tabla 3.

Las relaciones que se presentan entre cada una de las flavonas analizadas en esta variedad de mandarina son las siguientes: Hesperidina : Flavona 2 : Flavona 3 (27 : 1.5 : 1). Como se aprecia la relación que mantienen cada una de las flavonas en esta muestra es completamente diferente a la variedad anteriormente mencionada.

No Extracto	Area 1.	Area 2.	Area 3.
1	5.35	0.75	0.25
1	5.25	0.64	0.2
1	4.8	0.61	0.27
2	4.99	0.77	0.2
2	4.91	0.67	0.18
2	5.04	0.61	0.29
3	5.53	0.67	0.26
3	5.32	0.63	0.18
3	4.87	0.5	0.16
Promedio	5.12	0.65	0.22
Tr. Prom (min)	9.23	9.76	10.9
Desviación.	0.25253	0.08016	0.04676
% CV	4.93429	12.33171	21.14587
[] mg/ml	0.302	0.017	0.011

Tabla 3. FLAVONAS GLUCOSILADAS EN MANDARINA FREMON.

Esta variedad de mandarina tiene una cantidad total de flavonas glucosiladas presentes en el jugo de 0.33 mg / ml \pm 0.005 de jugo natural. Como se observa se tiene una tercera parte de lo que hay en la mandarina Mónica.



Cromatograma 2.

Perfil de flavonas glucosiladas en mandarina Fremon.

MANDARINA COMÚN.

La última variedad de mandarina natural analizada fue la que corresponde a la mandarina Común, los datos del análisis de flavonas glucosiladas se presentan en la tabla 4. Al igual que las variedades presentadas con anterioridad se observa que la respuesta de cada una de las flavonas registradas es constante.

No Extracto	Area 1.	Area 2.	Area 3.
1	3.03	0.27	0.16
1	3.05	0.26	0.17
1	3.08	0.27	0.15
2	3.02	0.28	0.14
2	3.03	0.28	0.17
2	3.09	0.26	0.15
3	3.07	0.26	0.16
3	3.04	0.22	0.1
3	3.01	0.2	0.18
Promedio	3.04	0.26	0.15
Tr. Prom (min)	9.23	9.90	11.02
Desviación	0.0283	0.0274	0.0235
% C.V	0.9282	10.7361	15.2948
µg/ml	0.161	0.010	0.016

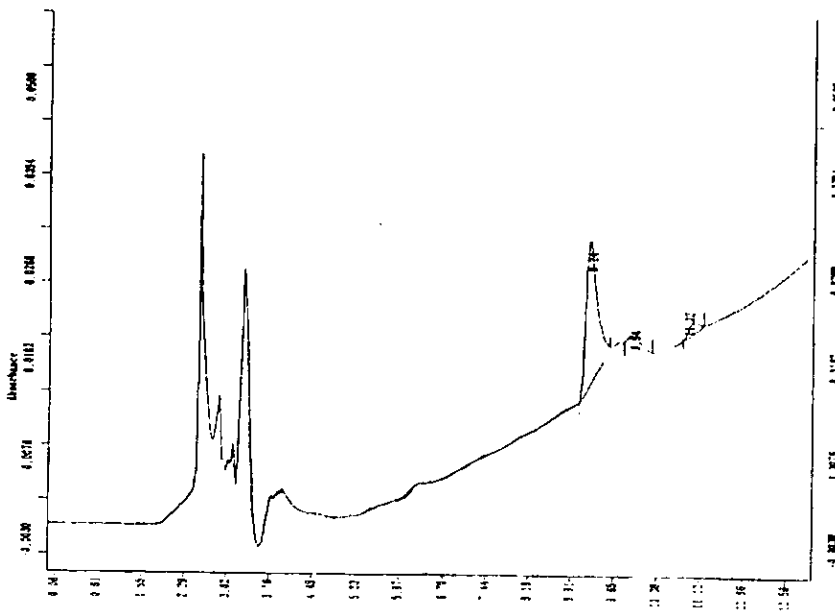
Tabla 4. FLAVONAS GLUCOSILADAS EN MANDARINA COMÚN.

La relación que presentan estas flavonas entre si es la siguiente: Hesperidina : Flavona 2 : Flavona 3 (17 : 1 : 1.6), esta relación es diferente a las otras dos variedades ya presentadas, así mismo la cantidad total de estas flavonas es de: 0.186 mg / ml \pm 0.003 de jugo natural.

Como se pudo observar cada una de las variedades de mandarinas analizadas presentó una relación diferente entre las tres flavonas glucosiladas detectadas, así mismo la concentración final de estas en el jugo de cada variedad fue diferente como se puede observar en el siguiente cuadro:

VARIEDAD	RELACIONES	CONC. total mg/ml
MÓNICA	3 : 1 : 1	0.90 ± 0.01
FREMÓN	27 : 1.5 : 1	0.33 ± 0.005
COMÚN	17 : 1 : 1.6	0.186 ± 0.003

Nota: Las relaciones están referidas a Hesperidina : Flavona 2 : Flavona 3.



Cromatograma 3.
Perfil de flavonas glucosiladas en mandarina Común.

CONCENTRADOS DE MANDARINA

CONCENTRADO 1.

La última parte del análisis de flavonas glucosiladas corresponde a los concentrados de mandarina analizados. Primeramente se analizó el concentrado 1 de mandarina, como se aprecia en el cromatograma 4 y en la tabla 5, esta muestra no presentó la flavona tres que corresponde al tiempo de retención promedio de 11min, sin embargo las otras dos flavonas (Hesperidina y Flavona 2) si se encuentran presentes.

En este caso la relación que mantienen las flavonas detectadas es la siguiente: Hesperidina : Flavona 2 : Flavona 3 (8 : 1 : 0). Esta respuesta sugiere una baja proporción de jugo, debido a la ausencia de esta última flavona, sin embargo con respecto a la cantidad total de estas flavonas en el reconstituido es muy similar a la que presenta la variedad Fremon. En este caso se puede decir que al ser un concentrado de marca libre en su elaboración se pudo haber realizado el lavado de pulpa y por ende aumentar la cantidad total de flavonas.

En este concentrado de mandarina se tuvo una concentración total de flavonas glucosiladas de: 0.179 mg / ml \pm 0.007 de jugo reconstituido. Cabe resaltar que se descarta la posibilidad de que esta respuesta se deba a una baja adición del concentrado para formar el reconstituido, debido a que se siguieron las indicaciones del proveedor

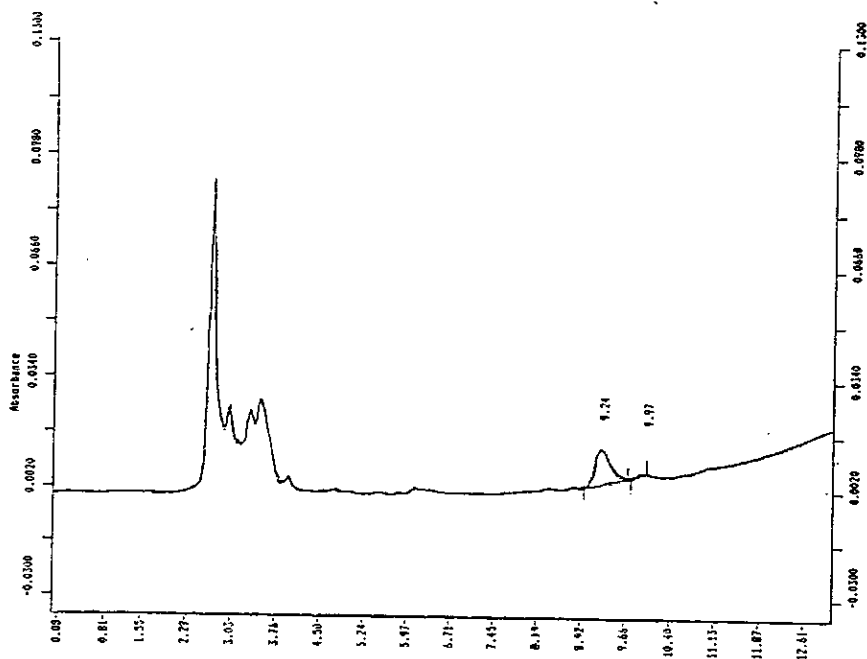
a manera de obtener un equivalente a un jugo de mandarina natural.

No. Extracto	Area 1	Area 2
1	2.96	0.07
1	3.07	0.11
1	3.17	0.1
2	3.1	0.13
2	3.09	0.08
2	3.06	0.09
3	3.12	0.08
3	3.05	0.12
3	3.15	0.1
Promedio	3.09	0.10
Tr. Prom. (min)	9.19	9.90
Desviación.	0.062	0.020
% CV	2.005118	20.312
[mg/ml	0.16	0.0193

Tabla 5. FLAVONAS GLUCOSILADAS EN CONCENTRADO 1.

CONCENTRADO 2.

La última muestra que se analizó fue el concentrado 2 de mandarina, los datos se presentan en la tabla 6. En el análisis de esta muestra se detectó la presencia de las tres flavonas anteriormente registradas en los jugos de mandarina naturales, incluso las cantidades de estas son superiores a las variedades de mandarinas Fremon y Común. En este caso las relaciones que guardan las flavonas analizadas son las siguientes: Hesperidina : Flavona 2 : Flavona 3 (32 : 2.5 : 1).



Cromatograma 4.

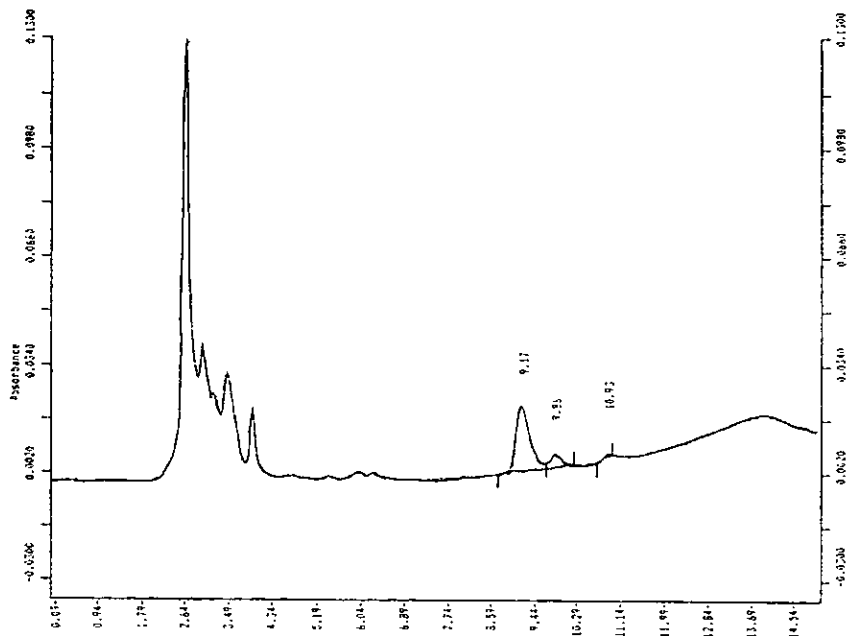
Perfil de flavonas glucosiladas en concentrado 1.

Este concentrado de mandarina presenta como concentración total de flavonas glucosiladas: 0.395 mg / ml de reconstituido, como se observa esta cantidad de flavonas es considerable la cual sugiere dos cosas, primeramente que el concentrado es de buena calidad y tiene gran proporción de jugo de mandarina o que en el proceso de extracción del jugo se logró arrastrar gran cantidad de flavonas glucosiladas. Con ayuda de los siguientes resultados se podrá concluir sobre este punto de manera más segura basados en datos experimentales representativos.

No. Extracto	Area 1	Area 2	Area 3
1	6.21	1.07	0.11
1	6.01	0.94	0.34
1	5.93	0.98	0.23
2	6.63	0.89	0.2
2	6.7	0.85	0.2
2	6.7	0.82	0.2
3	6.4	0.8	0.23
3	6.3	0.8	0.2
3	6.28	0.82	0.25
Promedio	6.35	0.89	0.22
Tr. Prom (min)	9.11	9.80	10.80
Desviación	0.2839	0.0938	0.0604
% CV	4.4704	10.5948	27.7206
[] mg/ml	0.3560	0.0280	0.0110

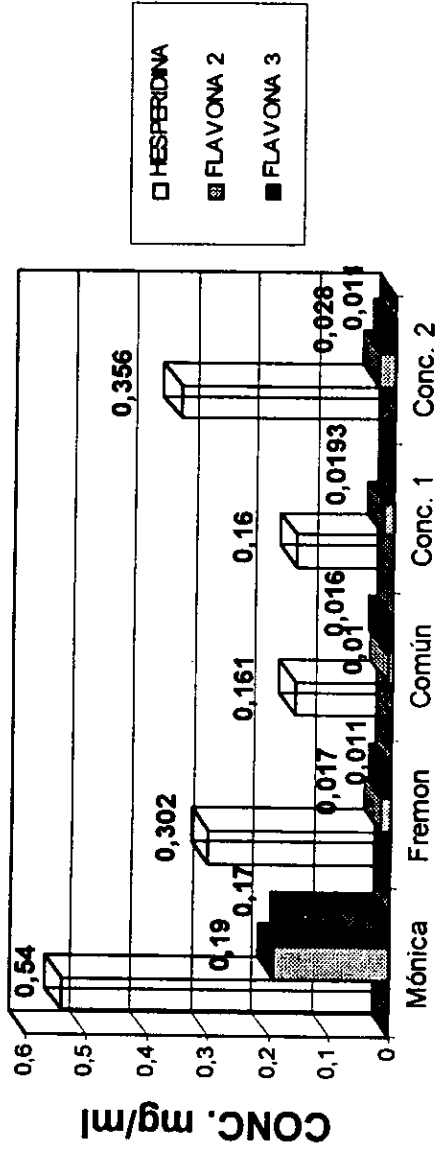
Tabla 6. FLAVONAS GLUCOSILADAS EN CONCENTRADO 2.

En la gráfica 1 se presenta el análisis de flavonas glucosiladas de las distintas variedades de mandarinas analizadas junto con los análisis de los concentrados de mandarina. En esta gráfica se puede observar que el concentrado 1 se encuentra hecho de la mandarina Común y el concentrado 2 de la mandarina Fremon, en cuanto a flavonas glucosiladas se refiere, debido a que las relaciones que presentan son similares.



Cromatograma 5.
Perfil de flavonas glucosiladas en concentrado 2.

FLAVONAS GLUCOSILADAS



MUESTRAS

GRÁFICO 1

JUGO DE MANDARINA

3.2 FLAVONAS METOXILADAS.

En la parte del análisis de flavonas metoxiladas se encontró que cada una de las muestras presentó un perfil diferente característico de cada variedad. Cada variedad de mandarina presentó un registro máximo de absorbancia el cual sirve como un punto importante en la identificación del jugo de cada una de ellas.

Al igual que en la parte de las flavonas glucosiladas serán analizadas las variedades en el mismo orden.

MANDARINA MÓNICA.

En el análisis de flavonas metoxiladas de la mandarina Mónica se observan nueve registros (cromatograma 6), en donde el octavo de estos se presenta en concentraciones considerablemente mayores al resto de las flavonas.

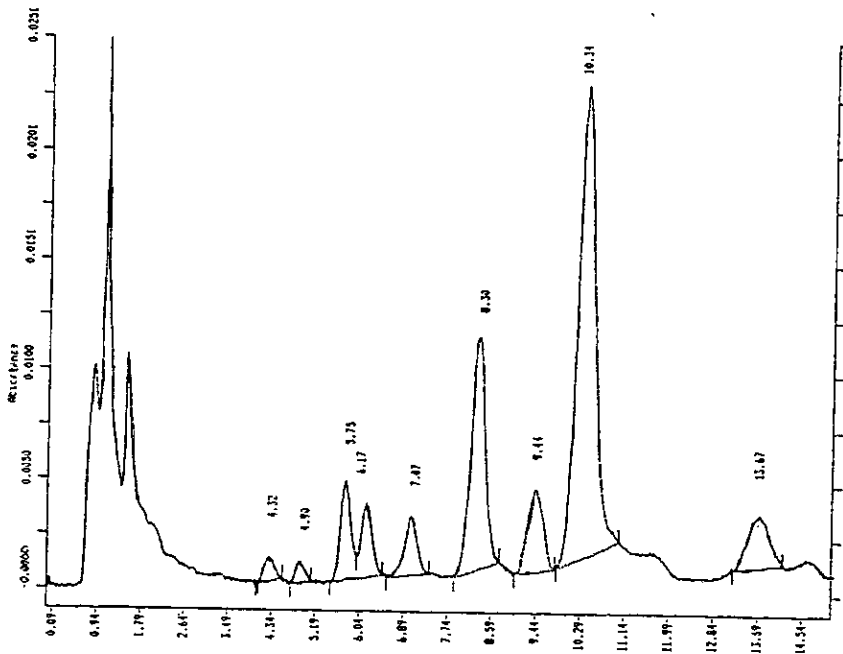
En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos de este análisis. En el caso de las flavonas metoxiladas se observan, al igual que en las flavonas glucosiladas, valores muy pequeños de las desviaciones estándar y de los coeficientes de varianza (1-13%), en todas las variedades de mandarina analizadas. Esta respuesta nos

indica que las flavonas metoxiladas se presentaron en forma constante. Este es un punto importante debido a que nos puede servir como un punto importante para poder identificar la variedad de mandarina analizada si se desea concluir acerca de un jugo de mandarina problema.

No. Extracto	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7	Area 8	Area 9
1	0.28	0.21	1.11	0.83	0.79	3.64	1.39	12.8	1.99
1	0.26	0.18	1.09	0.85	0.76	3.53	1.32	12.7	1.9
1	0.26	0.21	1.1	0.86	0.77	3.6	1.43	12.8	1.97
2	0.3	0.2	1.12	0.92	0.77	3.54	1.42	12.8	1.9
2	0.3	0.23	1.08	0.93	0.75	3.5	1.45	13.1	1.93
2	0.32	0.2	1.09	0.86	0.8	3.65	1.39	12.9	1.92
3	0.27	0.17	1.18	0.84	0.89	3.7	1.4	12.8	2.02
3	0.28	0.15	1.13	0.83	0.75	3.56	1.3	12.9	1.96
3	0.3	0.17	1.18	0.88	0.78	3.69	1.35	13	1.9
Promedio	0.286	0.19	1.12	0.867	0.784	3.601	1.38	12.9	1.943
Tr. prom (min)	4.27	4.89	5.75	6.16	7.04	8.28	9.41	10.3	13.65
Desviacion	0.021	0.03	0.037	0.037	0.043	0.073	0.05	0.13	0.044
% CV.	7.243	13.2	3.341	4.24	5.487	2.019	3.65	1.03	2.258

Tabla 7. FLAVONAS METOXILADAS EN MANDARINA MÓNICA.

Esta variedad de mandarina presentó el registro máximo en los 10.30min promedio, con un área promedio de 12.9 unidades.

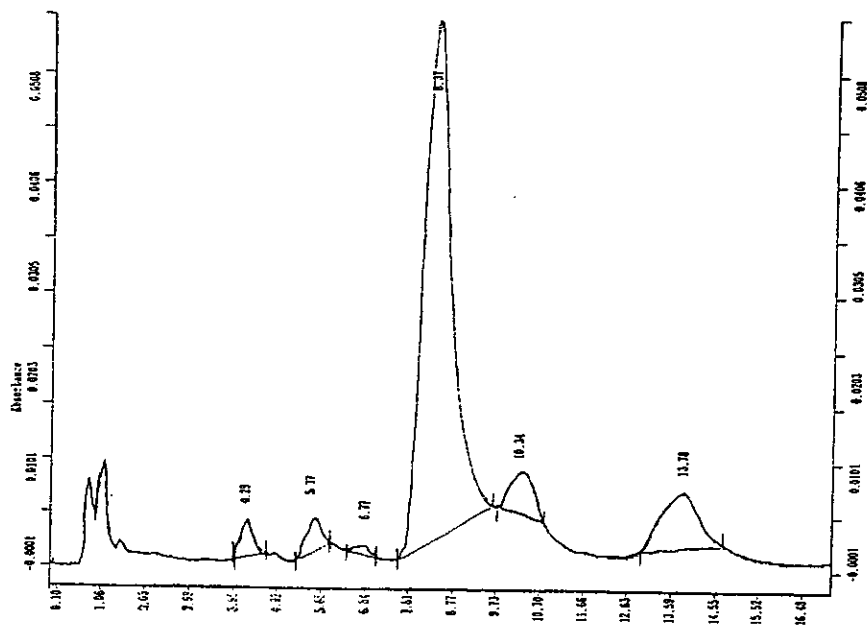


Cromatograma 6.

Perfil de flavonas metoxiladas en mandarina Mónica.

MANDARINA FREMON.

La siguiente variedad de mandarina analizada fue la variedad Fremon, en este caso se puede observar en el cromatograma 7 que se obtuvieron 7 registros de flavonas. Se observa que el perfil de esta variedad de mandarina es completamente diferente a la variedad anteriormente presentada.



Cromatograma 7

Perfil de flavonas metoxiladas en mandarina Fremon.

En esta variedad de mandarina se observa un registro máximo de flavonas con tiempo de retención promedio de 8.39min y un área promedio de 27.49 unidades.

En el cromatograma correspondiente a esta variedad se observa que la resolución de las flavonas analizadas es adecuada.

No. Extracto	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7
1	1.68	1.8	0.2	11.42	29.6	1.66	6.58
1	1.44	1.6	0.14	9.13	26.54	1.6	4.77
1	1.42	1.64	0.1	9.04	26.32	1.63	4.84
2	1.42	1.66	0.12	9.98	27.26	1.62	6.14
2	1.59	1.76	0.15	9.87	28.23	1.66	6.68
2	1.22	1.68	0.14	9.42	27.59	1.61	6.56
3	1.16	1.49	0.16	9.93	25.21	1.56	6.31
3	1.03	1.44	0.15	9.39	28.92	1.62	5.88
3	1.2	1.48	0.15	9.56	27.81	1.6	5.95
Promedio.	1.351	1.617	0.146	9.749	27.498	1.618	5.968
Tr. prom. (min)	4.28	5.82	6.81	8.12	8.39	10.39	13.73
Desviación.	0.213	0.126	0.027	0.712	1.355	0.031	0.715
% CV.	15.750	7.787	18.850	7.300	4.926	1.925	11.987

Tabla 8. FLAVONAS METOXILADAS EN MANDARINA FREMON.

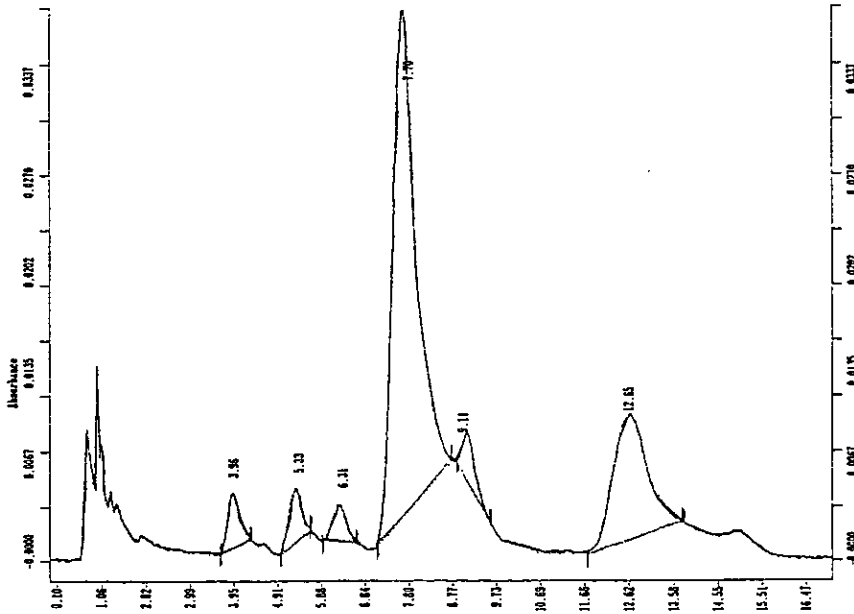
MANDARINA COMÚN.

La última variedad de mandarina natural analizada fue la mandarina Común (cromatograma 8). Como se observa en la tabla 9 esta variedad de mandarina presentó 6 registros de flavonas metoxiladas, al igual que en las variedades anteriores las desviaciones estándar y el coeficiente de varianza son muy pequeños.

Esta variedad de mandarina presentó el registro máximo de flavonas metoxiladas en el tiempo promedio de retención de 7.69min con un área promedio de 17.47 unidades.

No. extrcto	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6
1	0.98	1.01	0.775	17.27	0.911	5.56
1	0.983	1	0.779	17.46	0.921	5.21
1	0.954	1.02	0.776	17.4	0.82	5.47
2	0.981	0.998	0.797	17.52	0.871	5.45
2	0.977	1.035	0.756	17.49	0.91	5.66
2	0.98	1.02	0.772	17.46	0.892	5.59
3	0.956	1.051	0.781	17.5	0.897	5.47
3	0.935	0.942	0.773	17.48	0.854	5.52
3	0.999	0.94	0.77	17.72	0.895	5.49
Promedio.	0.972	1.002	0.775	17.478	0.886	5.491
Tr. prom (min)	3.92	5.31	6.25	7.69	9.09	12.76
Desviación.	0.019	0.038	0.011	0.118	0.883	5.483
% CV.	2.004	3.812	1.394	0.674	0.879	5.514

Tabla 9. FLAVONAS METOXILADAS EN MANDARINA COMÚN



Cromatograma 8.

Perfil de flavonas metoxiladas en mandarina Común.

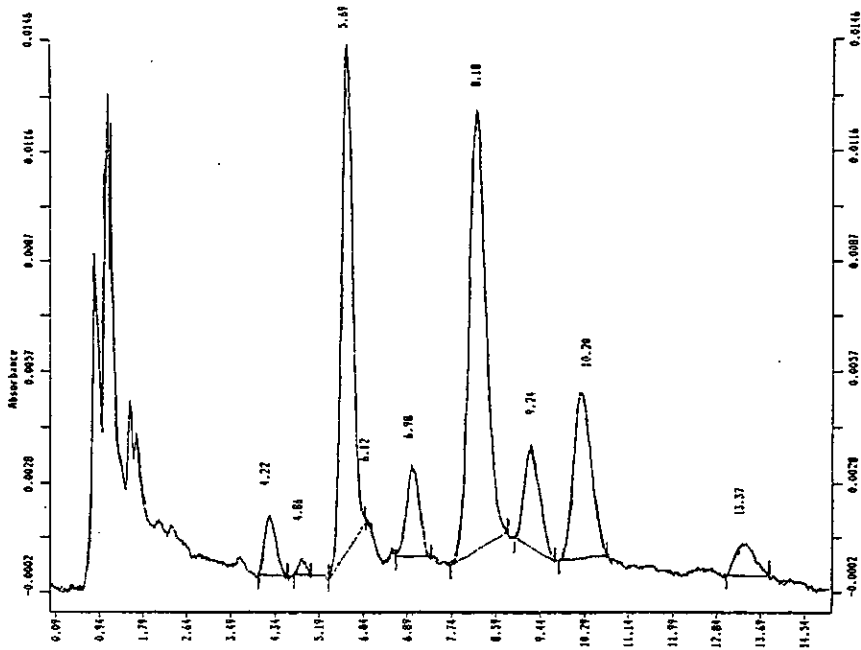
CONCENTRADOS DE MANDARINA.**CONCENTRADO 1.**

En la última parte del análisis de flavonas metoxiladas se trabajó con los concentrados de mandarina 1 y 2.

En la tabla 10 se presentan los resultados correspondientes al análisis de flavonas metoxiladas del concentrado 1. En esta muestra se obtuvieron 9 registros, los cuales muestran el perfil de estas flavonas en este concentrado (cromatograma 9).

No. Extracto	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7	Area 8	Area 9
1	0.27	0.09	2.13	0.56	0.02	3.17	0.8	3.4	0.33
1	0.34	0.1	2.77	0.63	0.006	3.8	1.06	2.86	0.61
1	0.35	0.1	2.98	0.53	0.01	3.57	0.95	1.82	0.38
2	0.43	0.1	3.52	0.68	0.013	4.68	1.13	2.27	0.43
2	0.39	0.07	3.37	0.68	0.006	4.45	0.94	1.79	0.37
2	0.35	0.1	3.17	0.68	0.007	4.45	1.07	1.77	0.56
3	0.35	0.12	2.62	0.51	0.01	3.9	1.05	1.83	0.32
3	0.43	0.11	2.53	0.71	0.013	3.8	1.06	2.17	0.46
3	0.45	0.09	2.55	0.61	0.014	3.36	1.04	2.13	0.35
Promedio	0.37	0.098	2.849	0.621	0.011	3.909	1.011	2.227	0.423
Tr. prom (min)	4.21	4.38	5.66	6.20	7.03	8.17	9.24	10.19	13.35
Desviación	0.057	0.014	0.448	0.073	0.005	0.52	0.099	0.561	0.103
% CV.	15.3	14.26	15.74	11.79	41.41	13.31	9.771	25.18	24.26

Tabla 10. FLAVONAS METOXILADAS EN CONCENTRADO 1.



Cromatograma 9.

Perfil de flavonas metoxiladas en concentrado 1.

Al igual que en el resto de las muestras, el concentrado 1 presentó una flavona en proporciones considerables con respecto al resto. Esta flavona tiene como tiempo de retención promedio de 8.17min y un área promedio de 3.90 unidades, sin embargo también presentó otra flavona en cantidades considerables la cual tiene como tiempo de retención promedio de 5.66min, con un área promedio de 2.84 unidades.

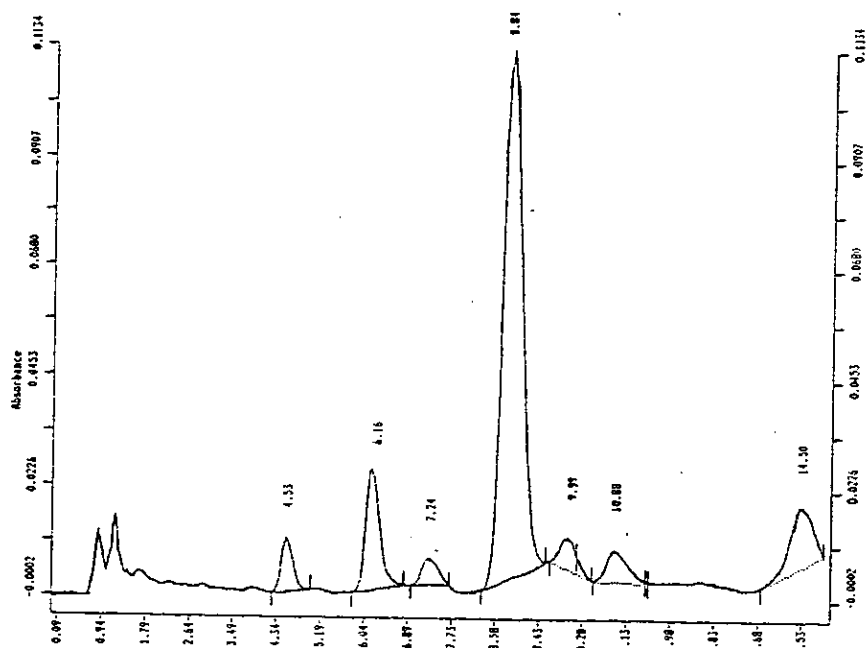
CONCENTRADO 2.

La última muestra analizada corresponde al concentrado 2 (cromatograma 10). En esta muestra se encontraron 7 registros, los resultados del análisis de esta muestra se presentan en la tabla 11. La flavona que se presentó en mayores proporciones fue la que presentó el tiempo de retención promedio de 8.66min con un área promedio de 45.92 unidades, este resultado es considerablemente mayor al obtenido en el concentrado 1.

No. extracto	Area 1	Area 2	Area 3	Area 4	Area 5	Area 6	Area 7
1	2.89	7.88	2.1	46.78	2.2	3.12	8.94
1	2.95	8.05	2.2	48.7	2.23	3.25	8.88
1	3	8.1	2.3	49.6	2.22	3.29	8.9
2	2.18	6.58	2.1	40.19	2.52	2.54	9.87
2	2.17	6.59	2.15	39.46	2.66	1.91	9.75
2	2.35	7.06	2.32	44.11	2.28	2.35	10.62
3	2.74	6.96	2.31	49.44	2.25	2.37	9.79
3	2.83	6.81	2.38	50.24	2.11	2.31	10.08
3	2.56	7.03	2.25	44.77	2.37	2.38	10.59
Promedio	2.630	7.229	2.234	45.921	2.316	2.613	9.713
Tr. prom. (min)	4.40	5.97	7.04	8.66	9.75	10.72	14.22
Desviacion	0.327	0.613	0.102	4.065	0.174	0.487	0.681
% CV.	12.440	8.474	4.565	8.853	7.496	18.624	7.012

Tabla 11. FLAVONAS METOXILADAS EN CONCENTRADO 2.

Cabe resaltar que el concentrado 2 es la muestra que presenta las absorbancias mayores en el análisis de flavonas metoxiladas, lo cual indica que la concentración de las mismas en la muestra es considerablemente elevada comparada con el resto de las muestras.



Cromatograma 10.
Perfil de flavonas metoxiladas en concentrado 2.

Cada una de las muestras presentaron diferentes perfiles de flavonas metoxiladas, en la siguiente tabla se presentan los registros más máximos representativos de cada una de las variedades de mandarina analizadas y de cada concentrado de mandarina.

MUESTRA	Registro máximo (min)	Áreas
Mandarina Mónica	10.30	12.90
Mandarina Fremon	8.39	27.49
Mandarina Común	7.69	17.49
Concentrado 1	8.17	3.90
Concentrado 2	8.66	45.92

Como se observa cada muestra analizada presenta un registro máximo diferente. En cuanto a las flavonas metoxiladas resulta difícil poder suponer el tipo de variedad de mandarina con la cual fueron hechos cada uno de los concentrados de mandarina, lo que si es importante resaltar es que resulta útil el análisis de flavonas metoxiladas debido a que aporta información importante en la identificación de los jugos de mandarina, así como de concentrados del mismo cítrico.

3.3 CARBOHIDRATOS.

En la parte de la cuantificación de los carbohidratos se realizó una curva patrón para poder interpolar los datos obtenidos del análisis de cada una de las muestras y obtener el valor correspondiente a cada azúcar, cabe resaltar que los tres azúcares presentaron la misma respuesta, dado a que las pendientes de las regresiones lineales son muy similares. Las regresiones lineales para cada azúcar son las siguientes:

Sacarosa.

$$A= 66975.6262$$

$$B= 75414.7317$$

$$R= 0.9939$$

Glucosa.

$$A= 62261.49$$

$$B= 75842.6251$$

$$R= 0.9954$$

Fructosa.

$$A= 65496.2526$$

$$B= 74555.3204$$

$$R= 0.9949$$

En el análisis de carbohidratos se puede ver que las cinco muestras analizadas presentaron tres azúcares simples: glucosa, fructosa y sacarosa (gráfico 2). En las tres variedades de mandarinas naturales se ve que la sacarosa se encuentra en concentraciones superiores con respecto a la glucosa y fructosa, sin embargo se puede ver que estos dos últimos azúcares se presentan casi en las mismas proporciones. Las variedades de mandarina Mónica (11.3°Brix) y Fremon (11.5°Brix) presentaron casi la misma cantidad de carbohidratos totales, la variedad Mónica presentó 61.39 mg/ml y la variedad Fremon 63.39mg/ml. La mandarina Común (12°Brix) presentó una proporción mucho más elevada de carbohidratos totales con 83.04 mg/ml, debido a que tenía gran cantidad de glucosa y fructosa comparada con las dos variedades de mandarinas anteriormente citadas.

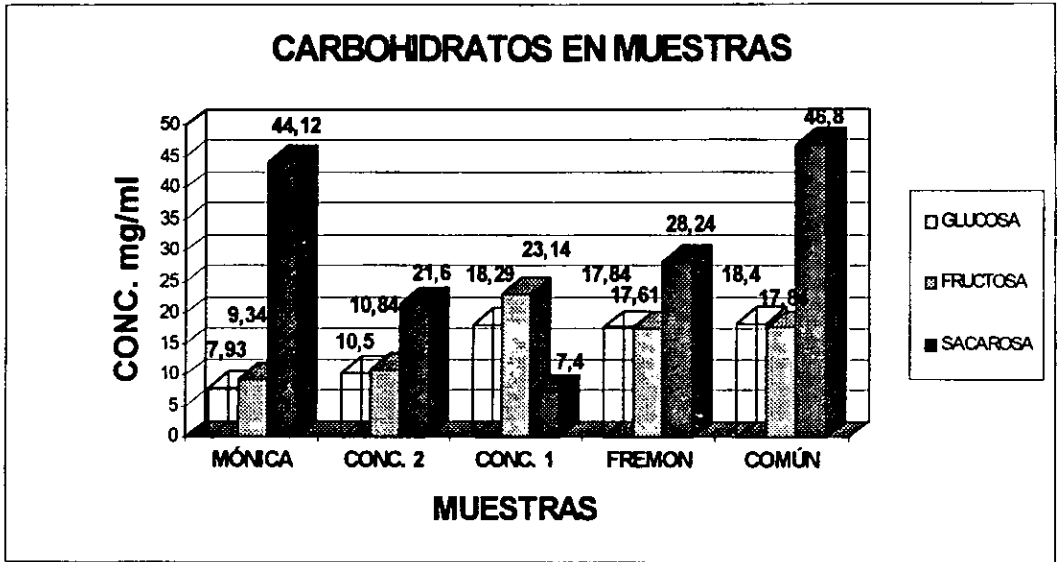
Cada una de las variedades de mandarinas analizadas presentaron proporciones diferentes de los azúcares: glucosa, fructosa y sacarosa. La variedad Mónica presentó una relación de Fructosa:Glucosa:Sacarosa de: (1 : 1 : 5), la variedad Fremon de (1 : 1 : 1.5), y la mandarina común de (1 : 1 : 2.5).

Al observar la concentración de los carbohidratos del concentrado¹ se puede ver, en contraste al resto de las muestras, que la cantidad de glucosa y fructosa son mucho mayores que en las otras muestras y es la que presenta menor proporción la sacarosa. Estas proporciones de carbohidratos, sugiere que el concentrado fue ajustado

en los sólidos solubles con la adición de azúcar invertido a manera de evitar la cristalización de la sacarosa y lograr el dulzor deseado, así mismo con la baja cantidad de sacarosa se podría decir que contiene una baja cantidad de mandarina natural en cuanto a carbohidratos se refiere.

En lo que respecta al concentrado 2 la tendencia de la glucosa y fructosa es la misma que en las variedades naturales de mandarinas, incluso se puede decir que este concentrado, en lo que respecta a carbohidratos, esta hecho de mandarina Fremon debido a que presenta las mismas proporciones de azúcares.

En este caso los concentrados de mandarina presentaron las relaciones de carbohidratos de Fructosa:Glucosa:Sacarosa, el concentrado 1 presentó una relación de (3 : 2.5 : 1) y el concentrado 2 una relación de (1 : 1 : 2).



Gráfica 2.
Carbohidratos en muestras.

3.4 BARRIDOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.

En los barridos espectrofotométricos de cada una de las muestras, se permite obtener una huella digital de cada una de las variedades y concentrados de mandarina.

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

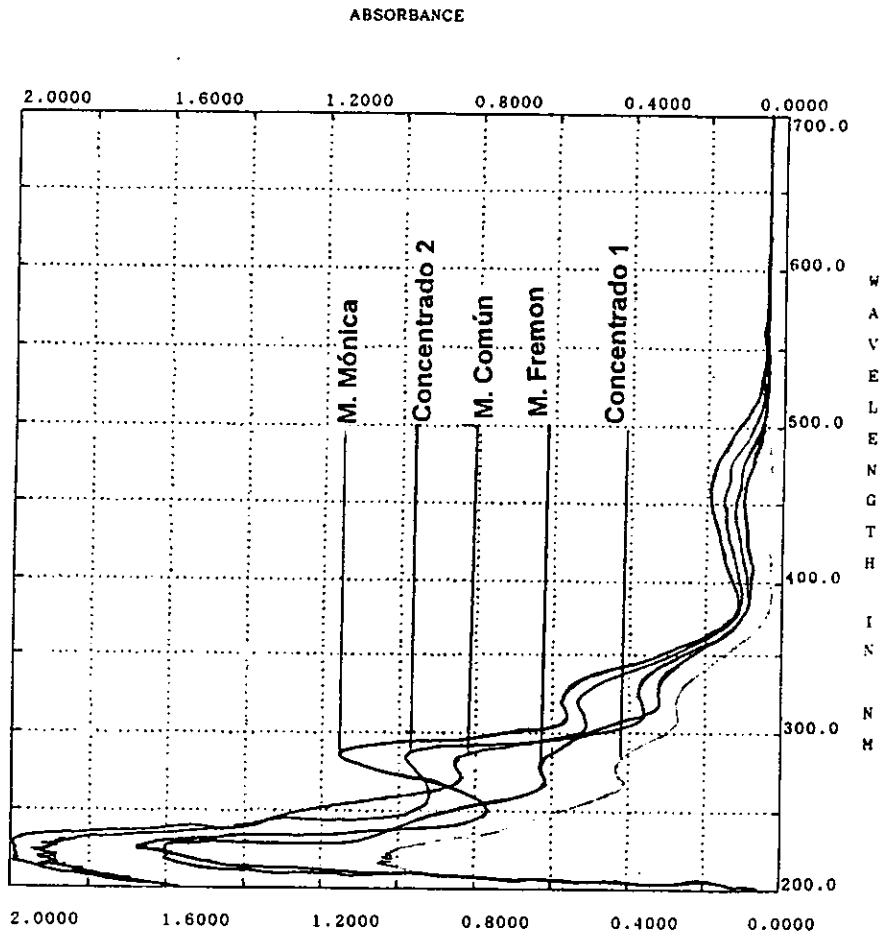
En la gráfica 3 se presenta a manera de resumen los cinco barridos que corresponden a cada una de las muestras.

El primer máximo de absorbancia a los 245nm corresponde a la Vitamina C (ácido ascórbico). Como se sabe la cantidad de este ácido disminuye con la maduración del fruto, así mismo los concentrados y todo tipo de jugo comercial se fortifica con esta vitamina, debido a que se pierden cantidades considerables de la misma en el proceso de extracción y de pasteurización del jugo, así también para acentuar el sabor ácido característico de los jugos naturales de frutas cítricas.

Al analizar el barrido espectrofotométrico (gráfica 3) se ve que el Concentrado 2 de mandarina es el que presenta una mayor cantidad de Vitamina C, el siguiente pico corresponde a la variedad de mandarina Común, le sigue la variedad Mónica, mandarina Fremon y en último lugar se encuentra el concentrado 1 de mandarina. Las absorbancias en las que se encuentran los jugos naturales de mandarina en cuanto a Vitamina C corresponde están entre 1.50 y 1.90 unidades.

El siguiente máximo de absorbancia corresponde a los 280nm en donde absorbe la mayor cantidad de flavonas. Este tipo de compuestos aumentan conforme el fruto madura, aún no se conoce la razón de esta respuesta, así mismo la proporción de los flavonoides en el jugo aumenta con la presión de extracción del mismo debido a que se incorpora cierta cantidad del albedo del fruto al jugo, el cual contiene gran cantidad de estas flavonas.

Se observa en el barrido espectrofotométrico que la variedad Mónica presentó una mayor cantidad de estas flavonas con respecto al resto de las muestras, de alguna forma esta respuesta se justifica con la gran proporción de flavonas metoxiladas que contiene en el jugo, así mismo se presenta la misma respuesta en lo que respecta a las flavonas glucosiladas, conteniendo la mayor cantidad de estas (0.9mg/ml) en comparación con el resto de las muestras.



Grafica 3.
Barridos Espectrofotométricos.

El siguiente máximo de absorbancia corresponde al concentrado 2, si se observan los cromatogramas de flavonas correspondientes a esta muestra se justifica la respuesta obtenida en el barrido espectrofotométrico. Este concentrado presenta la mayor proporción de flavonas metoxiladas debido a que la escala de absorbancia del cromatograma es la mayor comparada con el resto de las muestras. En lo que respecta a las flavonas glucosiladas se observa que tiene gran proporción de estas, debido a que presenta 0.395mg de flavonas glucosiladas / ml de jugo.

El siguiente máximo de absorbancia a los 280nm corresponde a la variedad de mandarina Común, si se hace el mismo análisis empleado en las muestras anteriores se observa que esta respuesta no es la esperada debido a que la mandarina Fremon presenta una mayor cantidad de flavonas glucosiladas totales (0.33mg / ml) y una absorbancia máxima mayor en el cromatograma de las flavonas metoxiladas (0.06 unidades), comparada con la mandarina Común que tiene como flavonas glucosiladas totales 0.186 mg /ml y una absorbancia máxima del cromatograma de flavonas metoxiladas menor (0.04 unidades). Esta respuesta se debe a que, el medio de análisis en donde se realizaron los barridos espectrofotométricos (solución alcohólica) fue muy diferente al de las flavonas metoxiladas (fase orgánica) y flavonas metoxiladas (fase acuosa). Así mismo al adicionar alcohol, en la preparación de las muestras para barridos espectrofotométricos, se precipita la pectina presente en el jugo de

mandarina arrastrando gran cantidad de flavonoides modificando sus proporciones en el extracto final.

El ultimo máximo de absorbancia corresponde al concentrado 1, si se observan los cromatogramas de las flavonas correspondientes a esta muestra se ve que presenta la menor cantidad de estas (flavonas glucosiladas y metoxiladas), por lo tanto la respuesta de esta técnica se ve justificada.

El siguiente máximo de absorbancia que se presenta en el barrido espectrofotométrico es el que corresponde a los polifenoles (325nm). Se sabe que la proporción de este tipo de compuestos aumenta con la maduración del fruto, así mismo con la presión de extracción del jugo en el momento de ser procesado.

Como se observa, el concentrado 2 de mandarina es el que presenta la mayor cantidad de polifenoles en el jugo, la proporción de estos compuestos en el jugo se puede deber a que durante el proceso de extracción del mismo se aplicó una fuerza de extracción elevada.

El siguiente máximo de absorbancia corresponde a la mandarina Mónica, como se observa el valor de absorbancia que presenta es cercano al del concentrado 2. En este caso las presiones de extracción del jugo fueron las mismas para todas las variedades de mandarina, por lo tanto se descarta la posibilidad de la presencia de estos compuestos por una presión excesiva. La respuesta obtenida en

este caso es característica del jugo de esta variedad en particular.

El tercer máximo de absorbancia corresponde al concentrado 1, en este caso la proporción de los polifenoles presentes en el jugo del concentrado es menor que el obtenido en el concentrado de Florida 7. Esto puede indicar que las presiones de extracción del jugo de mandarina que compone este jugo fueron menores o en su defecto al tener una cantidad menor de jugo de mandarina la cantidad de estos compuestos se ve disminuida.

Los últimos dos máximos de absorbancias corresponden a las variedades de mandarinas Común y Fremon respectivamente. Las respuestas obtenidas en estas dos variedades de mandarinas son características de cada variedad.

El último registro obtenida en el barrido espectrofotométrico corresponde a los carotenos que están presentes en el jugo.

El pico que tiene el máximo de absorbancia corresponde a la variedad Mónica. La cantidad de los carotenos aumenta conforme aumenta la maduración del fruto, en este caso la cantidad de carotenos presentes en el jugo de esta variedad es característica de la misma, incluso al depender del estado de madurez, la respuesta se pudo haber debido a una madurez adecuada.

El siguiente máximo de absorbancia pertenece al concentrado 2. Esta respuesta que arroja el concentrado nos indica que presenta una cantidad de jugo de mandarina considerable, debido a que en general el color de concentrados y néctares de cualquier cítrico se ajusta con la adición de colorantes artificiales, los cuales resultan más económicos y estables a condiciones extremas de proceso, por lo tanto se puede suponer que estos provienen en gran medida del propio jugo de mandarina del cual fue elaborado. En contraste, el concentrado 1 de mandarina no presentó carotenos, debido a que no se registro absorbancia alguna en este intervalo de longitud de onda (425- 465nm).

El color del concentrado 1 debió haber sido ajustado con algún colorante artificial el cual no fue registrado en los barridos espectrofotométricos, esto sugiere a que es un colorante que no es soluble en soluciones alcohólicas.

Las respuestas obtenidas por parte de las restantes variedades de mandarinas analizadas son características de cada una de ellas. La que presentó una absorbancia mayor fue la variedad Común y después la mandarina Fremon.

CONCLUSIONES.

En el análisis de Flavonas glucosiladas se observó que las tres variedades de mandarinas analizadas presentaron los mismos registros, lo cual nos puede ayudar a identificar la presencia de este cítrico en un concentrado de mandarina.

La Hesperidina se encontró en proporciones mayores con respecto a las otras dos flavonas glucosiladas. En la variedad Mónica la relación de: Hesperidina : Flavona 2 : Flavona 3 fue de 3 : 1 : 1 , en la variedad Fremon de 27 : 1.5 : 1 y en la mandarina Común de 17 : 1 : 1.6.

En los concentrados de mandarina las relaciones de las flavonas glucosiladas: Hesperidina:Flavona2:Flavona 3 fueron, para el concentrado 1 de 8 : 1 : 0 y en el concentrado 2 de 32 : 2.5 : 1

Se logró obtener el perfil característico de flavonas metoxiladas de cada una de las variedades analizadas (Mónica, Fremon y Común), en donde se puede ver que cada variedad de mandarina presentó un registro en proporciones elevadas, los tiempos de retención de este registro en cada una de las variedades de mandarina son:

Variedad Mónica: 10.3min

Variedad Fremon: 8.39min.

Variedad Común: 7.69min.

El conocimiento de este tiempo de retención de las flavonas metoxiladas en cada una de las variedades es de importancia debido a que permite identificar a cada una de las diferentes variedades de mandarina.

Se observó que todas las muestras presentaron las mismas longitudes de onda (λ 's) máximas en los espectros, lo cual indica que la respuesta del jugo de mandarina a esta técnica es constante. Dado esto, la realización de los barridos espectrofotométricos al jugo de cada una de las variedades de mandarinas analizadas nos proporcionó un perfil característico de cada una de ellas, el cual nos sirve para poder detectar la presencia o ausencia del jugo de mandarina en un concentrado. Con estos perfiles espectrales de cada una de las variedades de mandarinas analizadas se obtuvo una huella digital del cítrico en donde se observaron diversos máximos de absorbancias. Estos máximos de absorbancias son los siguientes: 425-465nm corresponde a los carotenos, 325nm a los polifenoles, 280nm pertenece a las flavonas totales y a los 245nm se detecta la presencia del ácido ascórbico.

En el análisis de carbohidratos se encontró que todas las muestras presentan como azúcares a la glucosa, fructosa y sacarosa en diferentes proporciones las cuales son: M. Mónica Fruc:Gluc:Sac (1:1:5), M. Fremon (1:1:1.5), M. Normal (1:1:2.5).

En los concentrados de mandarina las proporciones de carbohidratos (Fruc:Gluc:Sac) fueron de: concentrado 1 (3:2.5:1) y en el concentrado 2 (1:1:2).

La realización de los cuatro análisis en conjunto (flavonas glucosiladas, flavonas metoxiladas, azúcares solubles y perfiles espectrales) aportan datos importantes en la identificación y caracterización del jugo de mandarina. Así mismo permiten poder identificar en un concentrado de mandarina la variedad del cítrico con la que fue elaborado.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1).- Badui, S.
" Química de los Alimentos ".
Longman de México Editores. 3ª Reimpresión.
México. 1996.
- 2).- Bills, D. and Mussiman, C.
" Characterization and Measurement of Flavour Compounds ".
American Chemical Society.
Washington, D. C. 1985.
- 3).- Braddock, R.
" By-Products of Citrus Fruit ".
Food Technology. Sep. 1995. pp. 74-77.
- 4).- Braverman, J. B.
" Introducción a la Bioquímica de los Alimentos ".
Editorial El Manual Moderno.
México. 1980.
- 5).- Charalambous, G.
" Instrumental Analysis of Foods ".
Recent Progress.
Vol. 2. Academic Press, Inc. pp. 149-163. U. S. A. 1983.
- 6).- Fellers, P. J.
A review of limonin in grapefruit (Citrus paradisi) juice, its
relationship to flavour, and efforts to reduce it.
J. Sci. Food Agriculture. 1989. 49: 389-404.

- 7).- González, S.
" El cultivo de los agrios ".
Editorial Bello.
1978. Valencia España.
- 8).- Gray, G. M. And Olson.
" Hydrolysis of high levels of naringin in grapefruit juice using a hollow fiber reactor ".
Journal of Agric. Food Chemical. 1981. 29: 1296-1301.
- 9).- Harold, M y Esquivel, B.
" Cromatografía Líquida de Alta Presión ".
Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos.
Washington, D. C. 1980
- 10).- Hirano, S.
" Relations of fruit size of satsuma mandarin to the sugar and acid contents ".
Journal of the Japanese Soc. for Hort Science .
48 (2), 162-168. (1970).
- 11).- Horowitz, R. M., and Gentili, km .
" Citrus Science and Technology ".
Vol 1. pp. 397.
Avi. Publishing Co. Westport, CT. 1977.
- 12).- Johnson, R. L. and Chandler, B. V.
" Adsorptive removal of bitter principles and titratable acid from citrus juices ".
Food Technology. May 1988. pp. 130-137.

-
- 13).- Johnson, R. L. and Chandler, B. V.
"Reduction of bitterness and acidity in grapefruit juice by adsorptive processes".
J. Sci. Food Agriculture. 1982. 33: 287-293.
- 14).- Kefford, J.F.
"The Chemical Constituents of Citrus Fruits". "Advances in Food Research". Supplement 2.
Ed. Academic Press. New York. 1970.
- 15).- Kimball, D.,
"Citrus Processing". "Quality Control and Technology".
Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
New York. 1991.
- 16).- Leo, M., and Nollet L.
"Food Analysis by HPLC".
Marcel Dekker, Inc. pp. 259-266.
U. S.A. 1992.
- 17).- Lloyd, A.
"Handling Transportation and Storage of Fruits and Vegetables".
Vol. 2 Avi Publishing Co. 1974.
- 18).- Macrae, R.
"HPLC IN Food Analysis".
Academic Press. 2nd. Edition.
U. S. A. 1988.

- 19).- Palacios, J.
" Citricultura Moderna ".
Editorial Hemisferio Sur. 1978. Buenos Aires Argentina.
- 20).- Perfetti, G. and Frank, L.
" Liquid Chromatography Methodology for the Characterization of Orange Juice ".
J. Assoc of Anal. Chem. Vol. 71. Oct. 1987. pp. 469-473.
- 21).- Petrus, D. R. and Attaway, J. A..
"Spectral characteristics of grapefruit juice".
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63:1317 (1980).
- 22).- Petrus, D. R. and Attaway, J. A.
" Visible and Ultraviolet absorption and Fluorescence excitation and emission characteristics of Florida orange juice and orange pulpwash ".
J. Assoc. Oficial Anal. Chem., 63: 1317-1331.
- 23).- Petrus, D. R., and Dougherty, M. H.
" Visible and ultraviolet analysis of orange juice".
Journal of Food Science .
38:659. (1973).
- 24).- Petrus, D. R., and Dougherty, M. H.
" Spectral analysis of citrus products"
Journal of Food Science.
38:913. (1973).
- 25).- Petrus, D. R., and Dunham, N. A.
" Citrus Nutrition and Quality ".
American Society . pp. 423.
Washington, D. C., 1980.

- 26).- Petrus, D. R., Huggart, R. L.
" Spectral analysis of Valencia orange"
Journal of Food Science.
40:922. (1975).
- 27).- Praloran, J. C.
" Los Agrios ".
Editorial Blume. Colección: Agricultura Tropical.
1977. Barcelona España.
- 28).- Primo, Y.
" Química Agrícola III ". " Alimentos "
Editorial Alhambra . Impreso en España. 1982.
- 29).- Rouseff, R. L.
" Bitterness in Food and Beverages ".
Elsevier Science Publishers.
Nether Lands. 1990.
- 30).- S. A. R. H.
" Documentos Técnicos para el Desarrollo Agroindustrial y los
Sistemas Alimenticios Básicos ". " Frutas ".
Nº. 6 . S. A. R. H. En Marzo de 1982.
- 31).- Sendra, J., Navarro, J., and Izquierdo, L.
" C₁₈ Solid-Phase Insolation and High-Performance Liquid
Chromatography/Ultraviolet Diode Array Determination of Fully
Methoxylated Flavones in Citrus Juices ".
Journal of Cromatography Science.
Vol. 26., Sep. 1988. pp. 443-448.

- 32).- Steven, N. and Attaway, J.
" Citrus Nutritio and Quality ".
American Chemical Society.
Washinton, D. C. 1980.
- 33).- Steward, I.
" Citrus Nutrition and Quality "
pp. 129. American Chemical Society .
Washington, D. C. 1980.
- 34).- Ting, S. V. and Russell, L..
" Citrus fruits and their products ". " Analysis. Technology ".
Marcel Dekker, Inc.
Neww York. 1986.
- 35).- Villard, H.
" Métodos Instrumentales de Análisis ".
Gpo. Editorial Iberoamericana.
pp. 569-596, 616-618.
México, 1991.
- 36).- Wilfried, C. and Sigrid, I.
" Characterizacion of Orange Juice (Citrus sinensis) by
Flavanone Glycosides ".
J. Agric. Food Chemical. Sep. 1994, 42, 2183-2190.
- 37).- Wilfried, C. and Sigrid, I.
" Characterizacion of Orange Juice (Citrus sinensis) by
Polymethoxylated Flavanes ".
J. Agric. Food Chemical. Sep. 1994, 42, 2191-2195.