



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**EXTRACCIÓN DE FLAVONOIDES MANGIFERINA, NARINGINA, RUTINA Y
QUERCETINA A PARTIR DE RESIDUOS VEGETALES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

P R E S E N T A:

MARÍA ALEJANDRA GONZÁLEZ INFANTE



Ciudad Universitaria, Cd. Mx, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

PRESIDENTE: Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio.

VOCAL: Q.F.B. Hugo Rubén Carreño Ortiz.

SECRETARIO: Dr. Arturo Navarro Ocaña.

1er SUPLENTE: Q.F.B. Marco Antonio León Félix.

2do SUPLENTE: M en C. Jazmín Pineda Loperena.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Alimentos y Biotecnología Conjunto E, Laboratorio 321

Facultad de Química, U.N.A.M.

Asesor del tema:

Arturo Navarro Ocaña.

Sustentante:

María Alejandra González Infante.

Índice

RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 LOS FRUTOS, BULBOS Y/O FLORESCENCIAS EN LA INVESTIGACIÓN. ..	5
2.1.1 Mango	5
2.1.2 Cebolla	7
2.1.3 Toronja	8
2.1.4 Naranja dulce	9
2.1.5 Limón	11
2.1.6 Té.....	13
2.1.7 Manzana.....	14
2.2 Flavonoides, origen, estructura y clasificación	16
2.2.1 Rutina.....	20
2.2.2 Quercetina.....	21
2.2.3 Naringina.....	23
2.2.4 Mangiferina.....	28
2.3 Los flavonoides y su interés económico.	29
3 Extracción de compuestos polifenólicos	31
3.1 Extracción Asistida por Ultrasonido.....	32

3.2	Extracción acuosa asistida por enzimas.....	34
3.2.1	Enzimas y su aplicación en la industria alimentaria	36
3.3	Subproductos en la industria alimentaria.....	38
4	Métodos cromatográficos, instrumentos de análisis químico cualitativo y cuantitativo en matrices alimentarias.....	40
4.1	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC)	42
4.2	Cromatografía en Capa Fina (CCF)	43
5	Hipótesis	45
6	Objetivos	45
6.1	Objetivo general:.....	45
6.2	Objetivos particulares:.....	45
7	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	46
7.1	Disolventes y reactivos	46
7.2	Muestras a analizar	47
7.3	Equipos y materiales.....	47
7.4	DIAGRAMA EXPERIMENTAL GENERAL.....	49
7.5	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	51
7.5.1	Extracción de mangiferina, naringina, quercetina y rutina, asistida por ultrasonido (EAU) y con uso de solventes y cromatografía en capa fina (CCF).....	51
7.5.2	Extracción asistida por enzimas	56

7.6 Realización de curvas patrón para la cuantificación de mangiferina, quercetina, rutina y naringina por HPLC	58
8 Resultados y discusión	59
8.1 Preparación de la muestra	59
8.2 Selección y preparación de la muestra	60
8.3 Confirmación de la presencia de los flavonoides mangiferina, quercetina, rutina y naringina mediante cromatografía en capa fina (CCF).	61
8.4 Cuantificación de flavonoides y fenoles totales por espectrofotometría UV ...	64
8.4.1 Fenoles totales	64
8.4.2 Flavonoides totales.....	66
8.5 Identificación y cuantificación por cromatografía de alta resolución de mangiferina, rutina, naringina y quercetina en muestras analizadas usando extracción asistida por ultrasonido.	68
8.5.1 Mangiferina.....	70
8.5.2 Naringina	73
8.5.3 Quercetina.....	75
8.5.4 Rutina	76
8.6 Tratamiento asistido por enzimas.....	78
8.6.1 Fenoles totales	80
8.6.2 Flavonoides totales.....	81

8.6.3 Extracción enzimática de mangiferina, naringina, quercetina y rutina en algunos residuos	82
9 Conclusiones	86
10 Perspectivas.....	90
11 BIBLIOGRAFIA	91
12 ANEXO	104
12.1 Curvas de calibración (HPLC).....	104
12.2 Cromatogramas obtenidos por HPLC	106
12.3 Análisis estadístico	110

ABREVIATURAS

AlCl_3 al 10%= Cloruro de Aluminio al 10%

$\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ = solución amortiguadora de ácido acético/acetato de sodio

$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ a 0.1 M= solución de acetato de sodio trihidratado a concentración uno molar.

CLAR= Cromatografía Líquida de Alta Resolución

DPPH= Difenil-Picril-Hirazilo

EAE= Extracción Asistida por Enzima

EAU= Extracción Asistida por Ultrasonido

EFSA= Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EtOH= etanol

eq= equivalente

FAO= Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA= Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de América

FEMA= Asociación de Fabricantes de Sabores y Extractos de los Estados Unidos de América

FIRA= Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura

g= gramo

IOFI= Organización Internacional de la Industria de Sabores

JECFA= Comité Mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud/ de Expertos en Aditivos Alimentarios

kg= kilogramo

kHz= kilohertz

m/v= masa / volumen

m^2 = metro cuadrado

m^3 = metro cúbico

Mang= mangiferina

MetOH= metanol

mg= miligramo

MHz= megahertz

min= minuto

μ L= microlitro

mL= mililitro

Na_2CO_3 al 2%= Carbonato de Sodio al 2%

NaNO_2 al 5%= Nitrato de Sodio al 5%

NaOH 1M.= Hidróxido de Sodio concentración uno molar

nm= nanómetro

Nrg= naringina

Qrc= quercetina

Rf= Factor de retención

rpm= revolución(es) por minuto

Rut= rutina

SSA= Secretaría de Salubridad y Asistencia

UE= Unión Europea

UV/ vis= Ultravioleta/Visible

v/p= volumen / peso

W= watts

RESUMEN

El siguiente trabajo recopila una investigación tanto teórica como práctica de los flavonoides, siendo específicos en cuatro de ellos, rutina, quercetina, naringina y mangiferina; comenzando con la definición de estos compuestos, seguido de una investigación bibliográfica de localización en mayor cantidad de las fuentes vegetales, en este caso, los residuos, continuando con el tipo de extracción por ultrasonido y la identificación de cada uno de ellos. También se estudiará otra extracción: extracción asistida por enzimas, comparando los escritos previamente de extracción mediante el uso de solventes utilizando ultrasonido.

La aplicación de este tipo de compuestos tanto en la industria farmacéutica como alimentaria es de suma importancia y ejemplo de esto son los flavonoides, tales como la naringina obtenida de la toronja y de la naranja agria y la neohesperidina encontrada de la naranja dulce puesto que han adquirido mayor importancia ya que algunos de sus derivados (chalconas y dihidrochalconas) tienen un dulzor de aproximadamente 2000 veces el de la sacarosa (Ochoa y Ayala, 2004). La naringina es un precursor de sabor amargo de la dihidrochalcona que como ya se mencionó posee un alto poder endulzante.

Otros flavonoides que han sido de importancia son la rutina y quercetina, pues se reporta que los extractos son de gran importancia, principalmente porque pueden ser usados como un excelente recurso para productos farmacéuticos (fitoterapia). Esta acción fitoterapéutica es principalmente relacionada con el corazón y riñón (Fujita et

al.,1995); otro de los efectos terapéuticos reportados es como agente antimicrobiano y antihipertensivo (Vetrichelran, 2002).

El flavonoide, mangiferina presente en los mangos, tanto en las hojas, corteza y el fruto, de los cuales se han utilizado, ejemplo algunas comunidades africanas lo utilizan como tratamiento para dolencias de enfermedades crónicas tales como la artritis y diabetes y también como antiinflamatorio y analgésico (Ojewole, 2005).

1 INTRODUCCIÓN.

Los alimentos son el biocombustible del ser humano y parte de su alimentación están contemplados los vegetales, encontrándose en ellos macronutrientes, micronutrientes y otros compuestos de interés y de carácter no nutrimental, éstos últimos, han mostrado un efecto beneficioso en la salud humana llamados compuestos bioactivos, siendo parte de esta definición los flavonoides.

Los flavonoides son compuestos que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, dichos compuestos químicos le confieren desde una coloración al vegetal hasta protección, por mencionar algunos de los roles de los flavonoides en la planta.

Si bien se han encontrado flavonoides presentes en la porción comestible de los vegetales y /o frutos, también se ha encontrado en piel y semillas teniendo como ventaja una mayor concentración. De ahí la importancia de trabajar en los residuos que se generan en la industria alimentaria, ya que se puede aprovechar en su totalidad el vegetal, obteniendo de estos desde jugos que será la parte comestible para el consumidor hasta aditivos los cuales son obtenidos de la parte no comestible del fruto o vegetal en cuestión, el cual tiene funcionalidad tanto en la industria alimentaria como en la farmacéutica y otras industrias. Es importante mencionar que la industria que procesa alimentos es la segunda en producir residuos (Gowe, C., 2015).

Dicho lo anterior, se han llevado a cabo diversos análisis de los compuestos químicos presentes en vegetales comenzando por una investigación bibliográfica, seguida por la

selección y acondicionamiento de muestras, después el uso de técnicas extractivas para determinar uno u otro componente y rastrear cualitativamente el compuesto de interés para terminar con su cuantificación del compuesto de interés mediante técnicas analíticas.

Las técnicas para la extracción de estos compuestos son diversas, para este proyecto solo se mencionará las extracciones de ultrasonido y vía enzimática, pues una de las ventajas de este tipo de extracción es el corto tiempo y son las técnicas que se utilizaron en este proyecto.

La importancia del uso de solvente para la extracción de estos compuestos es de suma importancia pues se requiere conocer la polaridad de molécula-solvente para su adecuada extracción en el caso de la extracción asistida por ultrasonido.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 LOS FRUTOS, BULBOS Y/O FLORESCENCIAS EN LA INVESTIGACIÓN.

2.1.1 Mango



Figura 1. Mango en árbol.

Mangifera indica es un árbol de hoja perenne de larga vida y con una altura que va desde 10-45 metros; de tronco fuerte y copa abundante. De acuerdo con Galán (1998) su clasificación taxonómica actual es: clase: Dicotyledoneae, subclase: Rosidae, orden: Sapindales, familia:

Anacardiaceae, genero: *Mangifera*, especie: *indica* (Shah K A, Patel M B, et al, 2007).

Su punto exacto de origen es desconocido, pero se considera que probablemente es nativo de los bosques montañosos bajos del este de la India, Bangladesh y Myanmar. Llegó a México a finales del siglo XVIII provenientes de Filipinas y de India occidental (Morton, 1987).

México es el quinto productor de este fruto a nivel mundial con 1.8 millones de toneladas en 2016. Siendo Guerrero, Sinaloa, Nayarit, Chiapas, Oaxaca y Michoacán las entidades federativas que producen el 80 % de este fruto (SAGARPA, 2017). En México, la variedad de mayor importancia es Ataulfo y se estima que 1 de cada 20 mangos consumidos mundialmente es proveniente de México.

El mango en el área nutricional son una buena fuente de pectina y almidones como parte de la fibra dietaria soluble obtenida de la pulpa, mientras que la fibra insoluble es la que se puede encontrar en la parte de la cáscara y semilla, tal como la lignina y la hemicelulosa, (Wall-Medrano, et al., 2015).

En el artículo de Masibo, M y He Quian, 2008, hace una recopilación de los polifenoles en mayor cantidad tomando diversas investigaciones que involucra al fruto y los residuos de este, redactando que en la pulpa del fruto se encuentran principalmente mangiferina, ácido gálico, galotaninos, quercetina y sus derivados, entre otros, mientras que para la cáscara de mango, los polifenoles en mayor cantidad son mangiferina y sus derivados, quercetina y derivados, ramnetina y sus derivados, ácido elagico y kampferol. Respecto a las hojas se ha encontrado principalmente mangiferina y sus derivados, quercetina-3-glucosido y kaempferol-3-glucosido. Si bien en la corteza el compuesto principal es mangiferina.

Los principales residuos cuando se procesa el mango son la cáscara y la semilla el cual representa aproximadamente de 35% a 60% del fruto. Siendo una fuente promisoría para la extracción de compuestos fenólicos. Dichos residuos han sido estudiados como una alternativa natural, segura de antioxidantes aplicados en los alimentos procesados tales como galletas, aceites vegetales y papas (Dorta, et al, 2012).

2.1.2 Cebolla



Figura 2. Tipos de cebolla.

El nombre científico de la cebolla es *Allium cepa*, proviene de la familia de las liliáceas.

El origen de esta hortaliza es asiático de la parte occidental siendo esta de las más cultivadas en todo el mundo.

Por otra parte, la producción de cebolla fresca de acuerdo con la FAO en el periodo de 2013-2014, el continente asiático lidera la producción de este bulbo con un 63 % seguido del continente africano con una producción del 16.1%.

Del continente asiático el líder en producción de cebolla por excelencia es China con una producción de 835 895.5 toneladas seguida de Japón con 543 350 toneladas y Corea 446 637.5 toneladas.

En la introducción de la investigación de Benitez. V. et al, 2011 comenta que las cebollas son ricas en varios grupos de compuestos vegetales, como fibra dietética, fructooligosacáridos que son carbohidratos con efecto prebiótico, flavonoides y alca (en) il cisteína sulfóxidos (ACSO), que han percibido beneficios para la salud humana.

Dos subgrupos de flavonoides están presentes en la cebolla; antocianinas, que imparten un color rojo / púrpura a algunas variedades y flavonoles, dichos compuestos mayoritarios siendo la quercetina y sus derivados (quercetina 4'-glucósido y la quercetina 3,4'-diglucósido encontrados en la parte carnosa de la cebolla) mientras que las pieles de

cebolla contienen concentraciones más altas de quercetina aglicón. Estos compuestos pueden desempeñar un papel en la producción de compuestos amarillos y marrones de muchas otras variedades.

Los ACSO son los precursores del aroma y el sabor, que, al ser escindidos por la enzima alinasa, generan el olor y el sabor característicos de la cebolla.

Los principales desechos de cebolla incluyen pieles de cebolla, dos escamas carnosas externas y raíces generadas durante el pelado industrial, y bulbos de tamaño insuficiente, malformados, enfermos o dañados.

2.1.3 Toronja



Figura 3. Toronja.

Conocido por su nombre científico como *Citrus paradisi*, es un árbol frutal de tamaño medio proveniente de la familia de las Rutaceae, colocando a los cítricos en esta familia y siendo la toronja de reciente origen híbrido. Se cree que se originó en el Caribe como un cruce entre la pampelmusa (*C. maxima*) y una naranja dulce (*C. sinensis*).

Datos recientes de la FAO ubican a China en primer lugar con una producción de toronja de 3,702,150 toneladas seguido de E.E. U.U. con una producción de 949,822

toneladas. México es el cuarto lugar de producción de éste cítrico con 424,678 toneladas (FAO, 2014).

Las frutas tienen pieles gruesas, de las cuales de la parte del flavedo se extraen aceites esenciales mientras que de la parte del albedo se extraen pectinas y otros compuestos de gran interés tales como flavonoides, siendo la naringina uno de estos flavonoides presentes en la parte del albedo. Respecto con la parte comestible existen compartimentos o gajos los cuales se disponen de 11 a 14 segmentos y variando de amarillo al naranja al rojo rosado, con pocas a muchas semillas. El gusto se extiende de dulce a amargo.

En el artículo de Li, et al, 2006, como parte de su introducción hace mención que los residuos de los cítricos son usados tradicionalmente en la industria como pienso, producción de pectina y producción de combustible, también hace mención que estos subproductos pueden ser una fuente natural de antioxidantes los cuales son ricos en flavonoides entre otros compuestos.

2.1.4 Naranja dulce



Figura 4. Naranja

Citrus sinensis es el nombre científico de la naranja dulce. Originaria del sureste de China y norte de Birmania y que se extendió a Japón y la India, posteriormente llegando a los árabes que se

encargaron de llevar este fruto a España en el siglo X, para después propagarse por toda Europa y alcanzando un auge en la segunda etapa del siglo XV.

Basándonos en el fruto se puede diferenciar tres partes: el exocarpo, el mesocarpo y el endocarpo. El exocarpo se encuentra en la parte externa del fruto, está formada por una epidermis compuesta de células parenquimáticas que contienen aceites esenciales y cloroplastos, proporcionándole éstos el color verde a los frutos inmaduros.

El mesocarpo, es la capa intermedia de color blanco, en donde se encuentra la pectina, flavanonas como la neohesperidina y naringina entre otros compuestos.

En el endocarpo se encuentra la esencia del fruto ya que en él residen los tricomas, que originan durante el desarrollo del fruto las vesículas de zumo.

Por otro lado, la FAO reportó para el 2014 una producción de alrededor 71,000,000 de toneladas de naranja a nivel mundial, siendo el continente americano el mayor productor con el 44 %.

Los mayores productores de naranja son Brasil con 16,928,457 toneladas, seguido de China con 7,823,550 toneladas y en tercer lugar la India con 6,139,826 toneladas. México se encuentra en 5° lugar con una producción 4 533 428 toneladas, el estado de Veracruz es el principal productor a nivel nacional.

Como parte del genero citrus, sus residuos también son fuente de pectina, principalmente (Li, et al, 2006).

2.1.5 Limón

El fruto que produce la planta del limonero, es el limón, con una longitud de 7-12 cm, de la familia de las Rutáceas, género *Citrus*, especie *limonum*, aunque en México a lo que conocemos como limón se le suele catalogar como lima mexicana ubicándolo en el género de los *citrus* pero de especie *aurantifolia*.



Figura 5. Limón mexicano

La planta del limonero parece ser originario de la zona este de la región del Himalaya en la India y áreas adyacentes.

El limón es uno de los cítricos más producidos a nivel mundial, sólo por detrás de la naranja.

En el limón se puede encontrar hasta un 90% de flavanonas tales como eriocitrin, hesperidina, naringina entre otras. Otros compuestos encontrados son las flavonas tales como diosmina, luteolina, entre otros, al igual que flavonoles, tales como, quercetina, rutina, kaempferol, limocitrin, solo por mencionar algunos (González-Molina, et al. 2009).

El limón se divide en tres zonas, la más externa es el exocarpo o flavedo que está formado por una epidermis y que presenta pequeñas vesículas que contienen aceites esenciales, usados en colonias, aromatizantes, etc. La siguiente capa es el mesocarpo o albedo, de aspecto esponjoso y de color blanco. Por último, se encuentra el endocarpo o pulpa que es donde se encuentran los sacos de zumo y las semillas. Los sacos de zumo o vesículas son estructuras alargadas que nacen en el endocarpo y se alargan hacia el interior del fruto hasta llenarlo por completo. Estas vesículas contienen ácidos orgánicos y azúcares, que junto con agua constituyen el zumo.

En el artículo de González-Molina, et al. 2009, desarrolla un tema del limón y la industria en donde recopila que entre el 50-65% de la cáscara entre otros subproductos del limón son desechados contribuyendo a la contaminación ambiental y que parte de estos subproductos pueden ser utilizados como alimentos funcionales, extrayendo carbohidratos no digestibles, fibra dietética y compuestos bioactivos tales como flavonoides y ácido ascórbico.

Para el 2017, se reportó que México ocupa el 1° lugar en la producción y exportación a nivel mundial de limón y como consumidor se sitúa en 2° lugar, según la FIRA. Para el periodo del 2017-2020, México produjo 2,664,214.75 toneladas según los indicadores que muestra la FAO. Aunado al tema de cítricos, la fuente comercial de pectina se ha extraído principalmente del bagazo de la manzana y de los cítricos, este último con un 20-30 % de peso seco.

2.1.6 Té

El té es una planta perenne conocido con el nombre científico de *Camellia sinensis* proveniente de la familia *Theaceae*.



Figura 6. Planta de *Camellia sinensis*

Los botánicos han identificado tres variedades de té: el de China, Assam y

Camboya, de estas variedades se derivan las más importantes comercialmente las cuales son: *Camellia sinensis*, *Camellia Assamica* y *Camellia Assamica* sp lasiocalyx.

El té es una bebida que es fuente de compuestos bioactivos tales como flavonoides, entre ellos la rutina y la quercetina, ácidos fenólicos como son ácido gálico, clorogénico, caféico, entre otros; y elementos traza que son minerales (Jeszka-Skowron M, 2015).

Hay seis categorías principales de té: tés blancos, verdes, oolong, negros, prensados y aromatizados que difieren en la calidad y cantidad de compuestos responsables de las funciones únicas de aroma, sabor y bioactividad. De estas seis categorías existen variedades y estas a su vez hacen que exista 3,000 té en el mundo debido a los diferentes métodos de elaboración de la planta (Ortiz A, 2007).

Para el 2014 la FAO reporta en la parte de producción de té los países líderes y sólo por mencionar a los tres primeros, China produce 2,095,570 toneladas, seguido de la

India con 1,207,310 toneladas y Kenia con 445,105 toneladas de té. Cabe resaltar que sólo el continente asiático cubre con el 84.8 % de producción de té.

Como parte de la investigación por Cai H, et al., 2018, el procesamiento profundo por las fábricas de té genera una gran cantidad de hojas de té no calificadas, también conocidas como té rechazado, alrededor del 10% del rendimiento; poco más del 90% del té se deja como té residual después de la industria de bebidas de té. La eliminación y la reutilización de residuo de té se han explorado mediante el compostaje, la pirólisis, la preparación de carbono biológico y un adsorbente para eliminar el mercurio.

2.1.7 Manzana

El manzano es una planta caducifolia, siendo un árbol de la familia de las Rosáceas que se cultiva en zonas con inviernos fríos, en la actualidad se han ampliado a áreas de clima templado o tropical.

La manzana es un fruto que tiene su origen en la parte asiática de Europa, desde el Mar Negro, hasta el Cáucaso, se cree la existencia de alrededor de unas 80,000 variedades, se conocen en el mercado apenas 700 de ellas debido a su comercialización, la mayor parte de variedades de este fruto se originaron por el cruce de dos variedades de manzanas distintas, dando como resultado un nuevo fruto con características propias (Ayala N., et al, 2016).

El cultivo del manzano crece espontáneamente en montes de Europa y Asia Central (Janick, 2002). Por su adaptación a un amplio rango de condiciones climáticas, a diversos suelos y sistemas de cultivo, el manzano se cultiva alrededor del mundo.



Figura 7. Manzanas

La manzana, es un fruto carnosos que según su forma puede ser achatada y/o redondeada. Tanto la forma como el color y sabor de los frutos difieren en una amplia gama que depende de la variedad.

La FAO reportó para el 2014 que la producción de manzanas la lideró China con 40,923,200 toneladas, seguido de Estados Unidos con 5,185,078 toneladas y el tercer sitio fue Polonia con 3,195,299 toneladas respectivamente.

El fruto brinda un importante aporte de antioxidantes, como los ácidos fenólicos caféico y clorogénico, procianidinas, catequinas (catequina y epicatequina) y flavonoles derivados de quercetina (Wolfe et al., 2003).

En la elaboración de jugo de manzana se generan grandes cantidades de desechos de cáscara, corazón y semilla ricos en componentes fenólicos bioactivos (Foo y Lu, 1999).

La distribución cualitativa y cuantitativa de los polifenoles de la manzana está más concentrada en la cáscara y ésta varía relativamente poco en función de la variedad (Lata et al., 2009).

2.2 Flavonoides, origen, estructura y clasificación

La palabra flavonoide proviene de latín flavus que significa de color amarillo. Los flavonoides son pigmentos que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas, protegiendo del daño causado por la contaminación ambiental, la radiación UV y que le confieren además un efecto atractor para polinizadores (Ávalos-García y Pérez Urría, 2009).

Hablando en un sentido bioquímicamente estricto, los flavonoides es un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales originándose mediante la ruta biosintética mixta (la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos).

Los flavonoides son parte de un grupo de compuestos fenólicos diaril-propanoicos siendo su estructura del tipo $C_6-C_3-C_6$, con dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos cicladas por un oxígeno y de bajo peso molecular.

Esta clase de compuestos presenta más de 6500 moléculas basadas en el esqueleto de 15 carbonos anteriormente mencionados (Corradini, 2011) (figura 8).

De los tres anillos, el A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos y el B y la unidad C_3 proceden de la ruta del ácido shikímico.

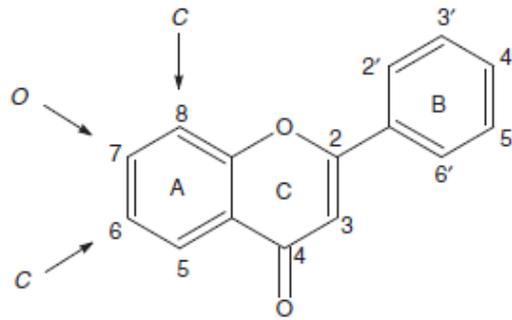


Figura 8. Estructura general de los flavonoides.

Se pueden encontrar como aglicones libres o en forma de C-heterósidos u O-heterósidos unidos generalmente a glucosa u otro mono o disacárido.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo (Martínez A, 2005).

La clasificación de los flavonoides está compuesta por flavonas, isoflavonas, flavanonas, flavonoles, flavanoles, antocianidinas, chalconas y auronas (figura 9), diferenciándose de acuerdo al grado de insaturación y al grado de oxidación del segmento de los tres carbonos.

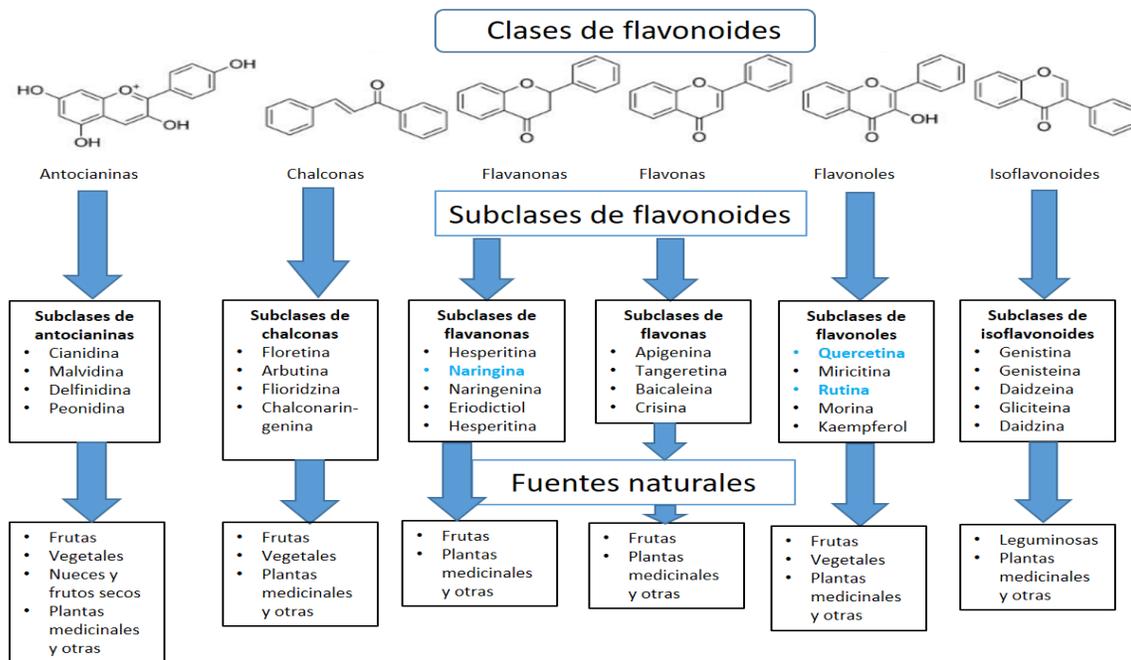


Figura 9. Subclases del grupo flavonoide y fuentes naturales. (Panche, et al, 2016).

Los primeros flavonoides fueron aislados e identificados en 1936 por Albert Szent-Györgyi, bioquímico húngaro, quien ganó el premio Nobel por su descubrimiento de la vitamina C. Szent-Györgyi descubrió que los flavonoides mejoran la función de la vitamina C, aumentando su absorción y protegiéndola de la oxidación. En principio se les asignó el nombre de vitamina P debido a que este grupo de compuestos mejoran la permeabilidad de los capilares un ejemplo de ellos es la rutina.

Las xantonas (figura 10) son metabolitos secundarios que pertenecen a los compuestos polifenólicos, estables al calor, que posee colores amarillos; y que, como anteriormente se mencionó, tienen relación con los flavonoides por su ubicación, debido a que se encuentran comúnmente en algunas familias de plantas superiores, en hongos

y en líquenes, aunque se limita su búsqueda en algunas especies (Vieira y Kijjoa, 2005; Peres et al., 2000). Las estructuras de las xantonas están relacionados a los flavonoides y sus comportamientos cromatográficos son muy similares (Negi J. et al., 2013). El núcleo de las xantonas conocido como 9-xantenona o dibenzo y pirona es simétrico (figura 10) (Vieira y Kijjoa, 2005; Pinto et al., 2005; Souza y Pinto, 2005). Las xantonas se pueden clasificar en 6 grandes grupos:

- | | |
|-------------------------------------|--|
| 1) Xantonas simples oxigenadas. | 4) Xantonolignoides. |
| 2) Glucósidos de xantonas. | 5) Bisxantonas. |
| 3) Xantonas preniladas y derivados. | 6) Xantonas misceláneas (Jiang, et al., 2004). |

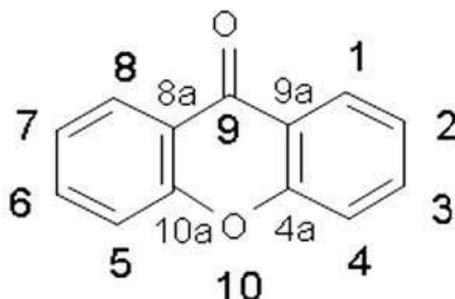


Figura 10. Núcleo de xantona.

Hasta 2005 se reportaron 515 xantonas, se identificaron 278 nuevas xantonas de fuentes naturales de 20 familias de plantas superiores (122 especies en 44 géneros), de 19 especies de hongos y de 3 especies de líquenes (Vieira y Kijjoa, 2005).

En total se han descrito alrededor de 1000 xantonas diferentes (Souza y Pinto, 2005) con sustituyentes en diferentes posiciones lo que da lugar a una gran variedad de actividades farmacológicas y biológicas (Pinto et al., 2005; Jiang et al., 2004).

2.2.1 Rutina.

La rutina químicamente conocida como quercetina-3-O- α -L-ramnosil-(1,6)- β -D-glucósido, es un flavonol derivado de la quercetina (figura 11), con un aspecto sólido opaco color verde y soluble en metanol. Dicho flavonoide se encuentra en el té, perejil, ruda, entre otros.

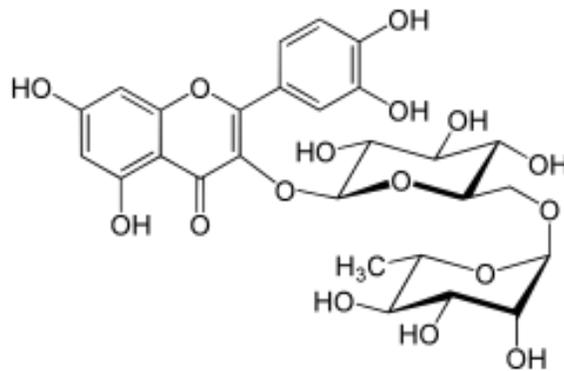


Figura 11. Estructura química de rutina.
CAS: 153-18-4

Si bien el té presenta diversas presentaciones (tanto en sabores como en la forma de realizar su infusión), a continuación, se presentará la tabla comparativa (tabla 1) de la cantidad de rutina presente en ellos:

Tabla 1. Cantidad de rutina en diferentes muestras.

Muestra	Cantidad	Referencia
Té verde	4.0368 mg * g ⁻¹	Rodica Nascu-Briciu, et al 2011
Té blanco	3.0555 mg * g ⁻¹	
Té negro	3.3140 mg * g ⁻¹	
Citrus aurantifolia (limón)	25.3-35.1 mg/100 g	Loizzo Monica, et al. 2012)

La rutina posee una amplia acción en los sistemas biológicos, ejemplos de ello son: antimicótico, antioxidante, antihiperlipídico, anti-inflamatorio en artritis, previene la apoplejía, previene de ataques de corazón, se relaciona también con la supresión de la dermatitis atópica y dermatitis alérgica de contacto; posee efectos anticancerígenos, disminuye la permeabilidad y la fragilidad capilar.

2.2.2 Quercetina.

La quercetina (flavonol), químicamente conocido como 3, 3',4', 5, 7 pentahidroxi flavona (figura 12).

En los vegetales, la quercetina se produce principalmente en las hojas y en las partes externas de las plantas como agliconas y glucósidos, en los que uno o más grupos de azúcar están unidos a grupos fenólicos por

enlace glucosídico. La glucosa es el azúcar más común, con galactosa y ramnosa también se encuentra frecuentemente en la composición con flavonoides. En general, los glucósidos de quercetina contienen un grupo de azúcar en la posición 3. Cabe mencionar que existe alrededor de 180 diferentes glucósidos de quercetina (figura 13).

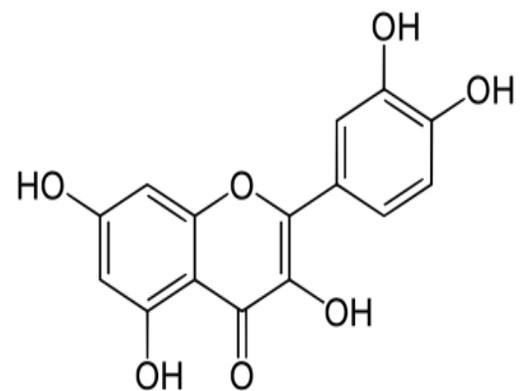


Figura 12. Molécula de quercetina.
CAS: 849061-97-8

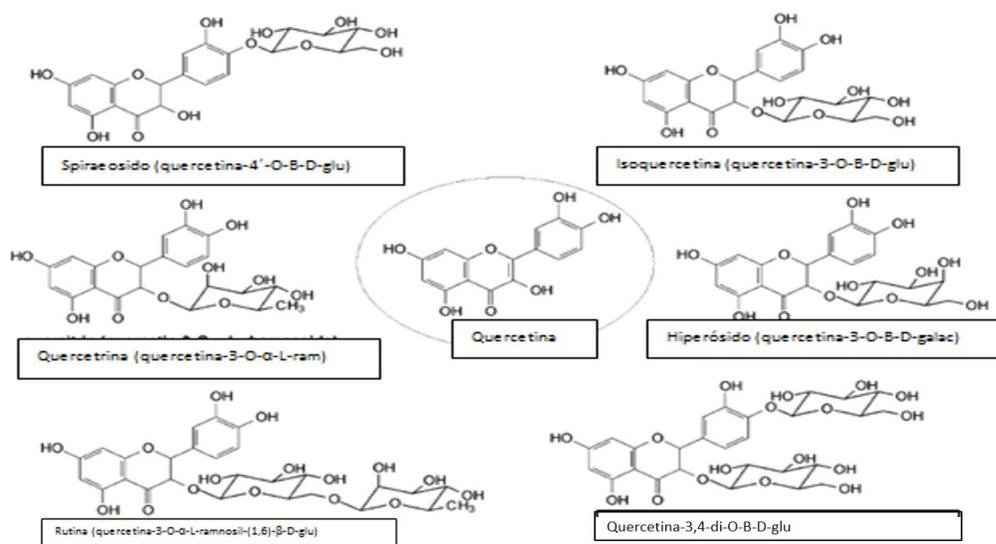


Figura 13. Algunos glucósidos de la quercetina (Rhon, et al, 2007).

Este flavonoide es un sólido opaco de color amarillo y soluble en metanol.

Como se menciona anteriormente, la quercetina es un flavonoide abundante y ampliamente localizado en el reino vegetal, es preciso mencionar algunos frutos y hortalizas que lo contienen mayormente, mostrado en la siguiente tabla.

Tabla 2. Contenido de quercetina en frutas y hortalizas.

Muestra	Cantidad de quercetina (mg/kg p.s.)	Referencia
Cebolla	50-2604*	Wach et al. 2007
Hojas de cebolla (primavera)	450-841*	
Piel externa de cebolla	960-1530*	
Piel de manzana	21-250*	*La cantidad de quercetina varia debido a la existencia de hidrólisis ácida o no para su obtención
Polvo de cocoa	201	
Arándanos	140	
Citrus	0-8.3	
		Kawai S, et al. 1999

La quercetina ofrece una variedad de usos terapéuticos potenciales principalmente en la prevención y el tratamiento de las afecciones tales como alergias, asma, urticaria, artritis, cáncer, enfermedades coronarias del corazón, complicaciones diabéticas, desordenes en la vista, gota, desordenes neurodegenerativos (Alzheimer), osteoporosis, úlcera péptica, prostatitis e infecciones virales (VIH). La quercetina parece funcionar mejor cuando se usa junto con la bromelina, una enzima digestiva que se encuentra en la piña, (Lakhanpal y Kumar, 2007).

2.2.3 Naringina.

La naringina es el glucósido de la naringenina y es conocido como naringenina-7- β -neohesperidósido (4', 5,7-trihidroxiflavanona-7-ramnoglucósido) (figura 14).

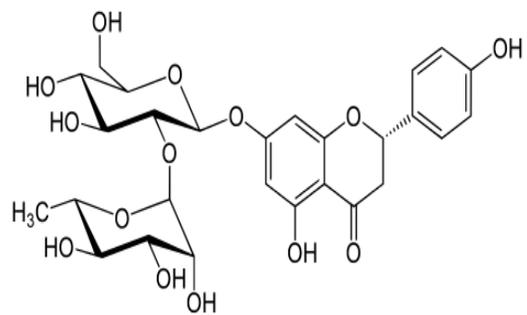


Figura 14. Molécula de la naringina.
CAS: 10236-47-2

Presenta una apariencia como sólido de color amarillo solubles en alcohol (metanol, etanol, n-butanol).

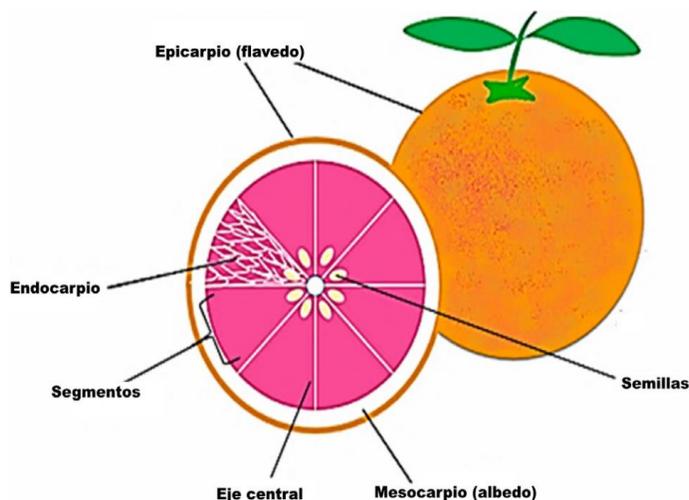


Figura 15. Estructura anatómica general de los cítricos en *Citrus paradisi*, De la Rosa-Hernández, et al. 2016.

Esta flavanona glucosilada está presente en el género *Citrus* y especialmente en ciertos cultivos de los cítricos, siendo la toronja el cítrico por excelencia, en donde se encuentra gran cantidad de la naringina.

De éste fruto, la mayor concentración de naringina se encuentra en el albedo que es la parte del mesocarpio interno de la toronja (figura 15).

Este flavonoide de interés posee un gusto muy amargo.

En la tabla 3, se presenta un listado de algunos cítricos y la concentración presente de naringina según cada caso.

Tabla 3. Contenido de naringina en frutos cítricos.

Muestra	Cantidad naringina	Referencia
Toronja cascara (<i>Citrus paradisi</i>)	3.91 mg/g	Yusof S., et al. 1989
Toronja cascara	2100 mg/100 g	Nogata Y., et al. 2006
Toronja parte flavedo	942 mg/ 100 g	
Toronja parte albedo	2700 mg/ 100 g	
Toronja (albedo y flavedo)	18-22 mg/ g ms, 34 °C y extracción asistida ultrasónica 40 ± 2 kHz, 50 y 100 W	Garcia-Castello E., et al. 2015
Naranja dulce piel (<i>Citrus sinensis</i>)	70.3 mg/ 100 g muestra fresca	Kahn M., et al. 2009
Naranja dulce piel (<i>Citrus sinensis</i>)	0.981 g/ kg (100 W, 30 min, 35 °C, 5 g/50 mL, 80% etanol)	M`hiri, N., et al. 2015
Limón fruto (<i>Citrus aurantium</i>)	<10 mg por 100 mg muestra	Kawaii, et al. 1999.

Las aplicaciones de este flavonoide en la industria farmacéutica son diversos, debido que en los sistemas biológicos se ha observado tener un efecto anti-inflamatorio e hipoglucémico; mientras que la industria cosmética se utiliza como agentes anti-solares bloqueando en la piel, los rayos ultravioleta UV-B (Ochoa y Ayala, 2004).

Si bien, de los 4 flavonoides estudiados en esta tesis, los 4 tienen una aplicación en la industria farmacéutica, aunque el flavonoide que tiene mayor aplicación para la industria de alimentos: la naringina. A continuación, se explicará brevemente acerca de las regulaciones, tanto la internacional como la nacional y su aplicación en la industria de alimentos.

En la revista Guía de la industria Química, edición 2015, en el artículo “Aditivos alimentarios: seguridad e innovación” comenta que, la cantidad de aditivo que se añade al alimento se limitará a la dosis mínima necesaria para obtener el efecto tecnológico deseado, conforme al principio básico de Buenas Prácticas de Fabricación”.

En México, la dependencia encargada de regular los compuestos utilizados como aditivos alimentarios es la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) a través del Subcomité número 10 llamado “Aditivos y Contaminantes de los Alimentos”. Adicionalmente, la COFEPRIS es el organismo encargado de dictaminar evidencia científica para establecer normas en el uso de aditivos alimentarios. Posteriormente, la Secretaría de Salud y Asistencia (SSA) emitió el documento nacional más importante sobre el uso de aditivos alimentarios es el ***Acuerdo por el que se***

determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias; en su versión más reciente de 16 julio de 2012; algunas modificaciones han sido publicadas en la página web de la COFEPRIS, en los años siguientes. Dentro del Acuerdo se indican las definiciones y la clasificación de los aditivos alimentarios, así como una sección donde se enumeran los aditivos con diversas clases funcionales. En esta normativa se encuentra la información pertinente a la Ingesta Diaria Admisible (IDA) establecida en México.

En nuestro país se establece que mientras un aditivo alimentario no sea considerado en alguna de las normas nacionales o la SSA no establezca los límites específicos, los fabricantes de los productos alimenticios podrán utilizar los aditivos tomando como referencia lo establecido en el Codex. En el caso de los saborizantes se pueden utilizar aquellos permitidos por el JECFA, Unión Europea (UE) a través de la IOFI (International Organization of Flavor Industry) o FDA (Food and Drug Administration)-FEMA (Flavor and Extracts Manufacturers Association), siempre y cuando exista previa notificación a la COFEPRIS, también se pueden emplear los que determina la Secretaría de Salud como permitidos. La lista de aditivos creada por la Secretaría de Salud se puede modificar a petición de cualquier interesado cuando se proporcionen a la Secretaría las evaluaciones y aprobaciones del JECFA u otros.

En el portal electrónico de la FEMA existe la evidencia en el compendio III, sustancias GRAS, (2001-3124), siendo la sustancia etiquetada en dicho reporte con el número 2769 y que esta nombrada como “naringen, extract—*Citrus paradisi Macf.*”, dicho extracto es una mezcla de naringina (#CAS:10236-47-2) y un isómero de la naringina llamada

narirutina (#CAS: 14259-46-2), y cita que se ha empleado como saborizante con un promedio de concentración máximo en: bebidas no alcohólicas de 71 ppm, para helados 5.7 ppm y en bebidas alcohólicas 0.2 ppm. También se ha reportado que la naringina por ser amargo es el sustituto perfecto de la quinina en aguas tónicas.

Como se observa en el párrafo anterior, este flavonoide es de interés económico en la industria alimentaria puesto que su aplicabilidad es diversa y que, la ventaja que existe es que se puede obtener de residuos cítricos, como extracto de naringina con un 98% de pureza, el costo por 50 gramos ronda desde los 25-125 dólares dependiendo del lugar de donde se va a importar.

Por tanto, la naringina ya es empleada como materia prima usándose como agente aromatizante-saborizante en diversos países del mundo, y ya ha sido evaluada su inocuidad y aprobada, por la FEMA-FDA y la International Organization of Flavor Industry (IOFI), este último organismo europeo, su número de identificación único de la sustancia (No FL) y nombre en la industria es el 16 058 y para el Consejo de Europa el número dado a la naringina es 10 286, avalados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

Siguiendo en la regulación norteamericana, la naringina está incluida en la lista de sustancias generalmente reconocidas como seguras, en el código de regulaciones federales de los Estados Unidos Americanos, título 21, capítulo I, subcapítulo B, parte 182, subparte A 182.20 ***“Aceites esenciales, oleorresinas (sin solventes) y extractos naturales (incluidos los destilados)”***.

2.2.4 Mangiferina.

La mangiferina, (2, C-β-D glucopiranosil-1, 3, 6, 7-tetrahidroxi-xantona), fue la primer xantona glucosilada en ser investigada para observar su actividad farmacológica debido a que su enlace C-glucósido y los grupos hidroxilo en la estructura de ésta xantona contribuyen a su actividad frente a los radicales libres (figura 16).

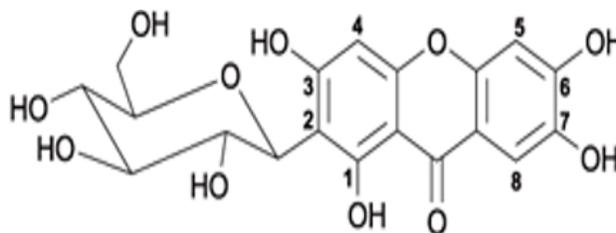


Figura 16. Estructura química de la mangiferina.
CAS: 4773-96-0

La mangiferina es una xantona C-glucosilada de color amarillo, estable al calor y presenta una hidrosolubilidad (Saha, et al., 2016).

Los C-glucósidos son raros, reportándose no más de 17 C-glucósidos de xantona. La mangiferina y la isomangiferina son los C-glucósidos más comunes. La mangiferina generalmente se encuentra en angiospermas y helechos, aislándose primero de *Mangifera indica* (Negi, et al., 2013).

Tabla 4. Contenido de mangiferina en cáscara, hojas y corteza de diversas variedades de *mangifera indica*.

Muestra	Cantidad mangiferina	Referencia
Cáscara de <i>Mangifera indica</i> L cv. Ataulfo	0.526 g de extracto/ 10 g ms, 0.25 g mang/g extracto 12 mg/ g muestra	Ruiz-Montanez G., et al, 2014
Hojas de <i>Mangifera indica</i> L. cv. Tainung	32.82mg/g	Tang-Bin Z., et al., 2014
Hojas de <i>Mangifera indica</i> L. (14 variedades)	11.2-1297.1 mg/kg m	Berardini, et al., 2005 ^a

Corteza de <i>Mangifera indica</i> L (21 variedades de centro y sudamerica)	698.9-4906 mg/ 100g ms	Forero F., et al., 2016
--	------------------------	-------------------------

La mangiferina siendo una molécula versátil en cuanto a su acción en sistemas biológicos, actúa como: antioxidante, antiinflamatorio, antidiabético, antigenotóxico, antihiperlipídico, antiaterógeno, inmunomodulador, neuroprotector, citoprotector y analgésico (Saha S et al., 2016).

2.3 Los flavonoides y su interés económico.

En párrafos anteriores, se citó los efectos benéficos de dichos flavonoides y la importancia que ellos implican en la industria, es relevante hacer mención que, derivado de los desechos se pueden obtener analitos con alto valor agregado. La industria química, es una de las industrias que ya comercializa con estos flavonoides como estándares para fines de investigación y el precio de los compuestos polifenólicos en este trabajo (mangiferina, rutina, quercetina y naringina) se muestran a continuación:

- Naringina 95 % pureza, 25 g en \$1,470 M.N. / 70.08 USD
- Rutina 94 % pureza, 50 g en \$5,001 M.N. / 238.42 USD
- Quercetina 95% pureza, 10 g en \$1,189 M.N. / 56.68 USD
- Mangiferina 95% pureza, 10 mg en \$3,043 M.N. / 145.07 USD

Debido al interés de los diversos flavonoides, estos compuestos naturales se han modificado selectivamente y son objetivos prometedores para fines industriales debido a las propiedades fisicoquímicas y biológicas mejoradas en diferentes campos. En el artículo de Viskupicova, et al 2009, recopila información diversa de los beneficios de los flavonoides selectivamente modificados y los beneficios industriales que conlleva, tanto que en la industria de alimentos se han obtenido una mejora en la estabilidad y solubilidad de los flavonoides iniciales, ejemplo de ello está en la reducción de la oxidación de los aceites en alimentos con alto contenido en estos y la acilación de antocianinas como colorantes.

Otro beneficio es la estabilización del pigmento por medio de la acilación de flavonoides. Además, los flavonoides acilados selectivamente pueden causar cambios significativos en su biodisponibilidad y bioactividad y, por lo tanto, pueden desempeñar un papel en la prevención de enfermedades cuando se consumen. La acilación al flavonoide es una herramienta útil para modificar las propiedades sensoriales de los alimentos y farmacéuticos (pasta de dientes y enjuague bucal).

Si bien los flavonoides brindan una variedad de beneficios para la salud, los alimentos que contienen flavonoides a menudo tienen un gusto amargo y sensación astringente.

3 Extracción de compuestos polifenólicos

La extracción es el paso indispensable para el aislamiento de diferentes tipos de compuestos en la matriz vegetal, tomando en cuenta como base la constitución de los componentes de interés para posteriormente utilizar los métodos fisicoquímicos que ayudaran a la obtención de dichos compuestos, en donde se elegirá el método físico que idealmente ayude a una extracción y se recupere la mayor cantidad del o de los compuestos en cuestión y en la parte química la selección de los solventes que ayudarán que la solubilidad sea ideal para dicho fin. Es importante mencionar que, la solubilidad también se ve beneficiada por otros factores físicos, tales como: la temperatura y la agitación durante el proceso de extracción.

Retomando la solubilidad y haciendo hincapié en la afinidad de soluto-solvente, los compuestos lipófilos se extraen a menudo con disolventes orgánicos no polares tales como hexano o diclorometano. Los componentes hidrófilos se extraen con disolventes polares tales como acetona, metanol o etanol. En algunos casos, la adición de disolventes polares tales como agua a la muestra puede aumentar la recuperación de compuestos más polares (Puri, et al. 2012).

La extracción de flavonoides del material vegetal generalmente se realiza con diferentes mezclas hidroalcohólicas y, a veces, dependiendo de los compuestos objetivo, la extracción se puede realizar con un alcohol seleccionado, es decir, metanol o etanol. (Nascu-Briciu R. et al.2011).

3.1 Extracción Asistida por Ultrasonido.

El ultrasonido es una herramienta eficaz para aplicaciones comerciales a gran escala tales como la emulsificación, homogeneización, extracción, cristalización, deshidratación, pasteurización a baja temperatura, desgasificación, desespumación, activación e inactivación de enzimas, reducción del tamaño de partícula y cambio de viscosidad (Picó Y, 2013).

Esta técnica requiere un medio líquido, un generador de energía y un transductor, que transforma la energía eléctrica, magnética o cinética en energía acústica.

El ultrasonido comprende ondas mecánicas que necesitan un medio elástico para propagarse. El ultrasonido tiene frecuencias por encima de la audición humana, pero por debajo de las frecuencias de microondas (de 20 kHz a 10 MHz). Para la clasificación de aplicaciones de ultrasonido, el criterio clave es la cantidad de energía generada, caracterizada por la potencia acústica (W), la intensidad del sonido (W / m^2) o la densidad de energía sonora (W / m^3).

Durante el proceso de sonicación y como anteriormente se mencionó, se crean ondas longitudinales en el cual una onda sónica se encuentra con un medio líquido, creando así regiones de compresión alternante y ondas de rarefacción inducidas sobre las moléculas del medio.

En estas regiones de presión cambiante, se produce cavitación y se forman burbujas de gas, estas últimas tienen un área superficial más grande durante el ciclo de rarefacción (expansión), lo que aumenta la difusión de gas, haciendo que la burbuja se expanda. Esta

expansión provocada por las ondas hace que haya una presión en el medio, logrando así, la difusión de los analitos embebidos en la matriz

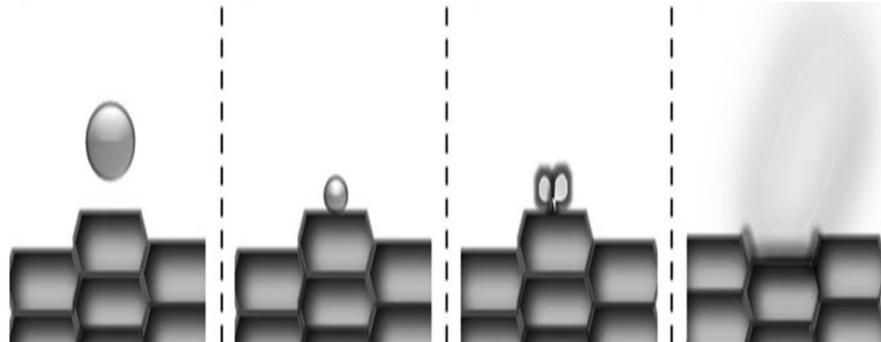


Figura 17. Mecanismo de transformación del material ante la extracción asistida por ultrasonidos (Escaplez, et al, 2011)

vegetal como se observa en la figura 17.

La capacidad del ultrasonido para causar cavitación depende de las características del ultrasonido (por ejemplo, frecuencia e intensidad), propiedades de la matriz a analizar (por ejemplo, viscosidad y tensión superficial) y condiciones tales como, temperatura y presión (Picó, 2013).

Como se mencionó anteriormente, otra aplicación de ultrasonidos se encuentra en la extracción de productos naturales que normalmente se necesitan horas o días si se contempla llevar mediante métodos convencionales, tales como Soxhlet o maceración solo por ejemplificar.

En la industria alimentaria, las técnicas clásicas utilizadas para la extracción de compuestos bioactivos con disolventes, se basan en la elección correcta de disolvente acoplada con el uso de calor y / o agitación.

La extracción con disolventes de compuestos orgánicos contenidos en plantas y semillas se mejora significativamente mediante el uso de la potencia del ultrasonido. Los efectos mecánicos del ultrasonido proporcionan una mayor penetración del disolvente en los materiales celulares y mejoran la transferencia de masa debido a los efectos del microflujo, aunado a la ruptura de las paredes celulares biológicas para liberar el contenido de la célula. En general, la extracción asistida por ultrasonido (EAU) se reconoce como una técnica de extracción eficiente que reduce drásticamente los tiempos de trabajo, aumentando los rendimientos y, a menudo, la calidad del extracto.

3.2 Extracción acuosa asistida por enzimas

La extracción asistida por enzimas (EAE) o también conocida como extracción enzimática acuosa, se emplea para el fraccionamiento de materia prima vegetal y para la extracción de moléculas de interés de una manera segura. Durante muchos años, la mejora de las enzimas industriales conduce a nuevas potencialidades y nuevos productos e implica hoy un completo replanteamiento de la extracción verde y sus perspectivas económicas (Muniglia L, et al, 2014).

La parte comestible y los residuos de estas materias primas han sido estudiados para extraer compuestos solubles en agua con actividad antioxidante (Conde et al, 2010) y las enzimas pueden degradar la pared celular dejando libres a los compuestos de interés (polisacáridos, polifenoles, entre otros).

Los compuestos fenólicos son los componentes antioxidantes en frutas y vegetales.

Los fenoles pueden ser encontrados en las paredes celulares, unidos a polisacáridos mediante interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno ligada a la matriz proteica de inclusiones vacuolares, confinadas dentro de las vacuolas celulares y cerca o asociado con el núcleo celular (Pinelo, et al., 2006).

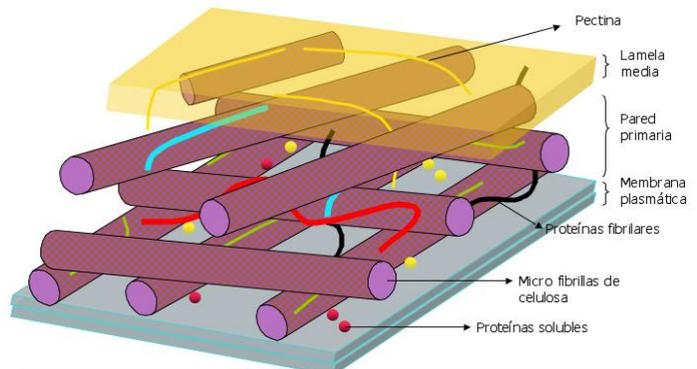
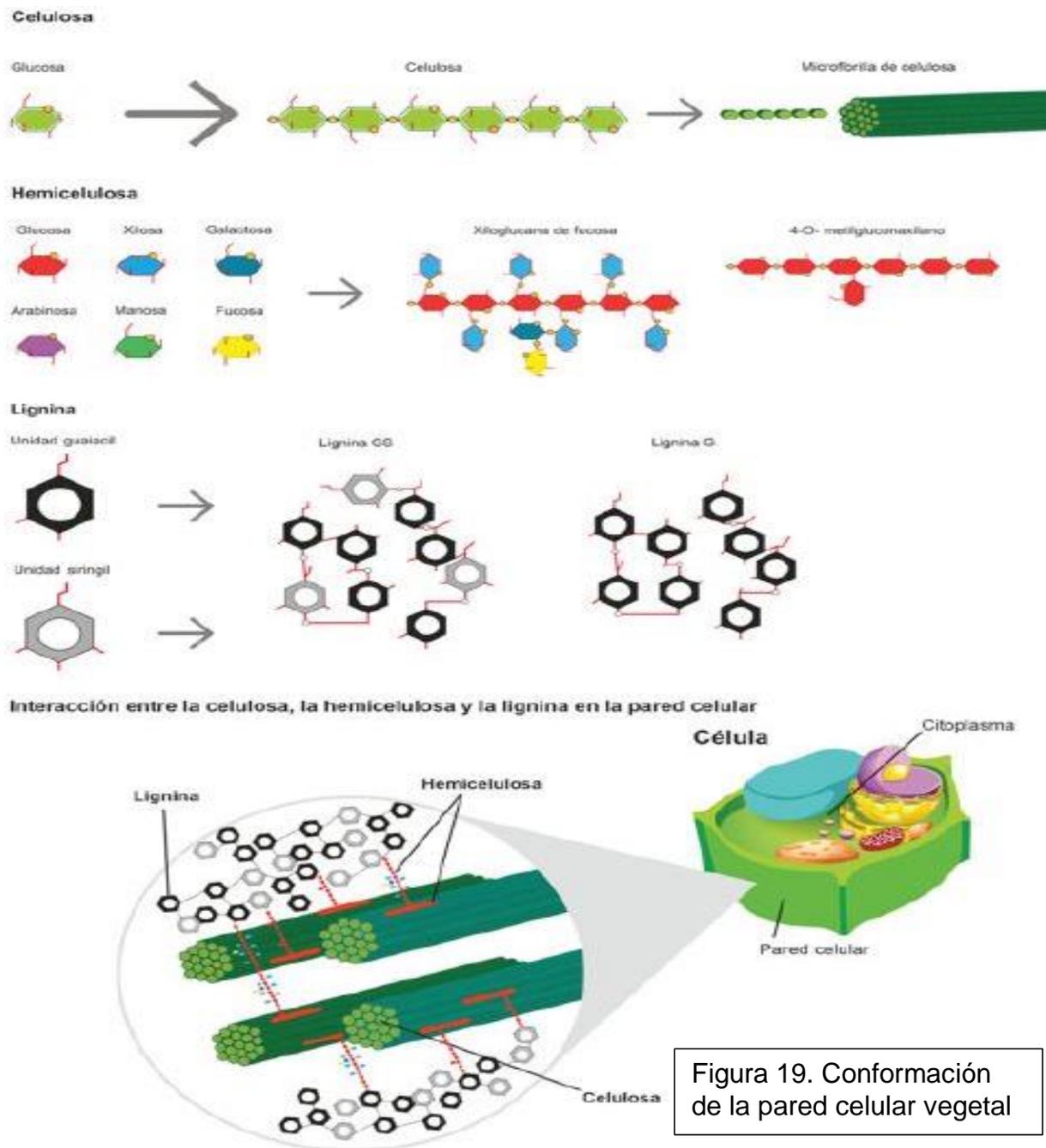


Figura 18. Pared celular primaria de los vegetales

La pared celular de las plantas son una red compleja de celulosa, hemicelulosas (principalmente xiloglicanos, mananos, xilanos y arabinogalactanos), pectinas y ligninas (figura 18 y 19). Siendo la degradación de la estructura polisacárida de la célula un paso fundamental en la relación de los fenoles unidos a la pared celular o asociado con las vacuolas celulares (Meyer et al., 1998).



3.2.1 Enzimas y su aplicación en la industria alimentaria

La utilización de las enzimas en la industria alimentaria se dio antes de que se acordara la forma de reconocer a las enzimas. Es preciso destacar que la industria alimentaria no

es la única en usar dichos catalizadores biológicos, se ha observado su uso en la industria cosmética, farmacéutica, textil, agropecuaria, papelera, entre otras.

El uso de las enzimas aporta mejora en el producto final, y un ejemplo de ello, es la pectin esterasa que ayuda en el proceso de producción de jugo en la parte de la clarificación (Aehle, 2004).

A continuación, se presenta un listado (tabla 5) de enzimas utilizadas en las industrias anteriormente mencionadas (Aehle, 2004).

Tabla 5. Aplicación de las enzimas en diferentes industrias (Aehle, 2004).

Nombre	Área de aplicación	Función
glucosa oxidasa	Panadería	incrementa la fuerza del gluten
	Cervecería	mejorar vida de anaquel
	Lácteos	preservación de leche
	Textil	Blanqueamiento
	cuidado/cosmética	pasta de dientes
hexosa oxidasa	Panadería	incrementa la fuerza del gluten
Lacasa	Papelera	blanqueamiento de pulpa
Catalasa	Cervecería	mejorar vida de anaquel
	Lácteos	preservación de leche
	Textil	eliminar H ₂ O ₂
Peroxidasa	Panadería	mejora en la masa
Lactoperoxidasa		
Tranglutaminasa	Lácteos	mejora la textura en yogurt, crema batida

dextranosucrasa	Cervecería	producción del isomalto-oligosacárido en cerveza
triacilglicerol lipasa	Limpieza	eliminar manchas de grasa
pectin metil esterasa	jugos de fruta	clarificación de jugo de manzana y cáscara de cítricos
α-amilasa	jugos de fruta	producción de jugo de manzana

	Cervecería	maceración y fermentación en cerveza
	molienda de grano	hidrólisis de almidón
	alimentación animal	mejora la digestibilidad del almidón proveniente del maíz
β-amilasa	Cervecería	Maceración
	jugos de fruta	producción de jugo de manzana
Amiloglucosidasa	Cervecería	Maceración
	molienda de grano	hidrólisis de oligosacáridos
	Cervecería	Fermentación
endo-1,4 (3)-β-glucanasa	alimentación animal	mejora el aumento de peso en cerdos y aves de corral
Quimosina	lácteos	coagulación en quesos
Endotiapsina		
Mucopersina		

α-acetolactato	Cervecería	eliminar el diacetil
pectato liasa	Textil	lavado de algodón
pectin liasa	jugos de frutas	producción de jugo de manzana
xilosa isomerasa	molienda de grano	producción de fructosa

Si bien, la tabla que anteriormente se muestra, menciona algunas enzimas y la función que ejercen sobre distintos campos, estos catalizadores biológicos también pueden utilizarse en el pretratamiento de residuos, la extracción de compuestos, modificación y síntesis de compuestos bioactivos (Puri *et al.*, 2012).

3.3 Subproductos en la industria alimentaria

Retomando un campo del uso de las enzimas, los desechos alimentarios se consideran actualmente como una fuente barata de componentes valiosos ya que las tecnologías existentes permiten la recuperación de compuestos objetivo y su reciclaje dentro de la cadena alimentaria como aditivos funcionales en diferentes productos (Galankis, 2012).

La industria de procesamiento de alimentos, incluyendo el procesamiento de frutas y hortalizas, es el segundo mayor generador de desechos en el medio ambiente sólo después de las aguas residuales domésticas. Una gran cantidad de residuos en forma líquida y sólida se produce en las industrias de procesamiento de frutas y hortalizas, que contiene muchas sustancias reutilizables de alto valor con gran potencial económico.

En la tabla 6 se muestran datos de los residuos de algunas frutas y hortalizas.

Tabla 6. Residuos de frutos y hortalizas y sus cantidades de la India (Gupta y Joshi, 2000).

Frutas y hortalizas	Naturaleza de los residuos	Producción (toneladas)	Desecho aproximado %	Cantidad de desperdicio (toneladas)
Mango	Cáscara, semilla	6987.7	45	3,144.4
Plátano	Cáscara	2378.0	35	832.3
Cítricos	Cáscara, semilla	1211.9	50	606.0
Piña	Corteza y centro	75.7	33	24.7
Uva	Tallo, piel y semilla	565	20	-
Guayabas	Piel, centro y semillas	565	10	-
Chícharos	Cáscara	107.7	40	68.3
Tomate	Piel, núcleo y semillas	464.5	20	90.3
Papa	Piel	2769.0	15	415.3
Cebolla	Hojas externas	1102.0	-	-
Manzana	Piel, orujo y semillas	1376.0	-	412.0

El procesamiento de frutas y verduras da lugar a cantidades elevadas de materiales de desecho tales como cáscaras, semillas y carne no utilizada generada en las diferentes etapas de las cadenas de procesamiento, generando problemas de contaminación si no se utiliza o se desecha adecuadamente. Sin embargo, estos residuos, que se arrojan al medio ambiente, provee una cantidad considerable en compuestos valiosos.

Son generadores novedosos, naturales y económicos de saborizantes, colorantes, proteínas, fibra dietética, antimicrobianos y antioxidantes, que pueden utilizarse en la industria alimentaria como anteriormente se mencionó, siendo una fuente de aditivos alimentarios naturales (Gowe C, 2015).

4 Métodos cromatográficos, instrumentos de análisis químico cualitativo y cuantitativo en matrices alimentarias.

La cromatografía se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases inmiscibles: una fase móvil, llamada también activa, que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra, denominada fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido.

Todas las técnicas cromatográficas dependen de la distribución de los componentes de la mezcla entre esas dos fases. Según lo anterior, son posibles varios tipos de cromatografía, dependiendo de la naturaleza de las dos fases involucradas: pueden ser sólido-líquido (capa fina, papel o columna), o bien líquido-líquido o gases-líquido (fase vapor). Todos los sólidos finamente pulverizados tienen el poder de adsorber en mayor o menor grado otras sustancias sobre su superficie; y, similarmente, todas las sustancias pueden ser adsorbidas, unas con más facilidad que otras. Este fenómeno de adsorción selectiva es el principio fundamental de la cromatografía.

Un paso muy importante en el análisis de plantas u otras matrices a analizar es la evaluación del extracto, conocida como huella digital. Esta metodología enfatiza y caracteriza integralmente las muestras. Los métodos más utilizados son los cromatográficos, pero la espectroscopia también puede conducir a resultados interesantes. Los métodos cromatográficos aceptados de huella digital son la cromatografía en capa fina (CCF o TLC, este último por sus siglas en inglés), la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC, este último por sus siglas en inglés), la cromatografía de gases (CG), la cromatografía de alta velocidad a contracorriente, entre otras.

En esta tesis, se mencionará la Cromatografía Líquida de Alta Resolución y la cromatografía en capa fina.

Los métodos espectrofotométricos, especialmente los métodos colorimétricos, se usan actualmente de manera intensiva para la cuantificación de diferentes clases de polifenoles (contenido fenólico total, contenido de taninos, flavonoides y contenido de antocianinas). Si bien estos métodos son rápidos y simples, carecen de la especificidad para compuestos individuales.

Aunque los polifenoles comparten la característica fenólica común, debido a la diversidad estructural, estos fitoquímicos varían significativamente en sus propiedades fisicoquímicas. Debido a la complejidad química de los polifenoles, la separación y cuantificación de estos compuestos sigue siendo tan difícil como siempre, a pesar de los recientes avances en la nueva instrumentación. Si bien, es casi imposible desarrollar un

protocolo para todos los polifenoles, existen algunas técnicas analíticas avanzadas con gran aplicabilidad en el análisis de compuestos fenólicos (Ignat, et. al, 2013).

4.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o HPLC)

Esta es una técnica de separación y cuantificación de analitos que parte de una muestra líquida, donde la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija.

Dicho lo anterior, la separación cromatográfica CLAR es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra en ambas fases, móvil y estacionaria.

La cromatografía líquida de alta resolución es un instrumento versátil y adaptable con varias ventajas, como alta selectividad, sensibilidad, resolución, precisión y conservación de muestras, asimismo, está diseñada para separar compuestos de mezclas complejas en función de las propiedades de polaridad, solubilidad y tamaño de cada compuesto. Esta técnica es la más utilizada para la separación y caracterización de polifenoles.

Para obtener la identidad de un polifenol, el método más común es comparar el tiempo de retención de un compuesto particular con el estándar. El detector de matriz de fotodiodos puede recopilar datos espectrales UV / visibles a medida que los compuestos

se separan; por lo tanto, cuando un pico coincide con el tiempo de retención y el espectro UV / Vis de un estándar, se puede identificar provisionalmente.

La determinación cuantitativa implica analizar una serie de estándares que cubren el rango de concentración de interés, y los analitos de muestra se cuantifican con base en las curvas de calibración para cada estándar.

Para la separación de diferentes polifenoles, las condiciones cromatográficas implican casi exclusivamente el uso de una columna RP C18 y un sistema de solvente binario que contiene agua acidificada usando ácido acético, ácido fosfórico o ácido sulfúrico y un solvente menos polar como metanol o acetonitrilo (Ignat, et. al, 2013)

4.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Es una lámina de vidrio, metal o plástico recubierta con una capa delgada de un sólido adsorbente (gel de sílice o alúmina). Posteriormente se aplica una pequeña cantidad de la muestra problema en disolución en un punto en la parte inferior de la placa. Entonces la placa se introduce en una cubeta cromatográfica, de forma que sólo la parte inferior de la placa queda sumergida en el líquido. Este líquido o eluyente es la fase móvil y asciende por la placa de CCF por capilaridad.

A medida que el eluyente pasa por el lugar donde está la mancha de la mezcla problema, se establece un equilibrio entre las moléculas de cada uno de los componentes en la mezcla que son adsorbidas y las que se encuentran en disolución.

En principio, los componentes se diferenciarán en solubilidad y en la fuerza de su adsorción, de forma que unos componentes se desplazarán más que otros. Cuando el eluyente llega a la parte superior de la placa, esta se saca de la cubeta, se seca, y los componentes separados de la mezcla se visualizan.

Si los compuestos son coloreados se pueden observar las manchas a simple vista. Si no es así, hay varios métodos para visualizar las manchas correspondientes a cada componente de la mezcla, tales como luz UV y otros reveladores y/o reactivos.

5 Hipótesis

Dado que los flavonoides son compuestos localizados en las células vegetales, entonces si se utilizan sistemas de extracción que sensibilicen la pared celular vegetal, se podrá obtener una mayor cantidad de estos (mangiferina, rutina, quercetina y naringina).

6 Objetivos

6.1 Objetivo general:

Obtener extractos enriquecidos de los flavonoides: mangiferina, rutina, quercetina y naringina, mediante las fuentes vegetales, haciendo uso de la extracción asistida por ultrasonido (EAU) con par de disolventes etanol: agua y metanol: agua (80:20) y, los extractos enriquecidos con mayor concentración de los flavonoides con EAU, realizar la extracción asistida por enzimas (EAE) de esas muestras para cada flavonoide.

6.2 Objetivos particulares:

- Observar la presencia de los flavonoides mangiferina, rutina, quercetina y naringina mediante análisis cualitativo por cromatografía en capa fina por EAU.

- Determinar cuantitativamente fenoles totales y flavonoides totales en las muestras por par de disolventes y enzimático.
- Determinar la cantidad a través de CLAR para cada flavonoide a partir del par de disolventes con mejor extracción mediante el uso de enzimas.
- Determinar la cantidad de cada flavonoide a través de CLAR para la extracción asistida por ultrasonido de acuerdo a la parte del vegetal a utilizar.
- Comparar el método de extracción más eficiente para cada flavonoide.

7 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.1 Disolventes y reactivos

- Disolventes: Acetato de etilo, acetonitrilo grado CLAR, diclorometano, hexano, metanol, metanol grado HPLC, agua destilada, agua desionizada, ácido acético, ácido fosfórico.
- Reactivo: Fenol Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 al 2%; Flavonoides: NaNO_2 al 5%, AlCl_3 al 10% en etanol, solución NaOH 1M.
- Reveladores para CCF: Cloruro férrico al 1% y DPPH.
- Estándares: mangiferina (Sigma), quercetina (Sigma $\geq 95\%$), naringina (Sigma $\geq 95\%$) y rutina (Sigma $\geq 94\%$).

- Acetato de sodio.
- Enzimas:
macerox con pH 4.5-5 y T(°C) ≈35 y novozym 33095 pH 4.5-5 y T(°C) ≈ 35.
- Adsorbentes
 - Amberlita XAD-7HP (Sigma-Aldrich).
 - Gel de sílice 60 GF 254 para CCF.

7.2 Muestras a analizar

- Cáscaras de mango Ataulfo.
- Hojas de mango Ataulfo.
- Corteza de árbol de mango Ataulfo.
- Cáscara de toronja.
- Cáscara de naranja.
- Cáscara de limón.
- Té negro.
- Piel de cebolla morada.
- Cáscara de manzana.

7.3 Equipos y materiales

- Agitador orbital Thermo Scientific Max Q-4000.
- Balanza analítica Ohaus Analytical Plus con precisión de 0.0001 mg.
- Balanza Swiss Made ES 2255m-DR.
- Molino Krups GL4100.

- Sonicator Cole-Parmer 8892 (100 watts y 42 kHz).
- Centrifuga 5810-R.
- Rotavapor Buchi R-215, Baño Buchi R-491.
- Espectrofotómetro GBC-Cintral, software cintral.
- Lámpara UV como cámara reveladora para placas de CCF.
- Sistema HPLC Waters equipado:
 - Desgasificador en línea.
 - Bomba binaria Waters 1525.
 - Automuestreador Waters 2707.
 - Detector UV de doble longitud de onda Waters modelo 2478.
 - Columna analítica ODS Hypersil (250x4.6 mm; 5 μ m).
 - Software Empower.
 - Filtros preparativos Millipore.
 - Viales de 2 mL con tapa de plástico de inyección directa.
- Matraz Erlenmeyer 25-250 mL.
- Embudo Buchner con papel filtro Whatman #4.
- Matraz kitasato de 25-250 mL.
- Manguera para matraz kitasato.
- Espátula.
- Matraz bola de 50-250 mL.
- Micropipeta semiautomática con rango de operación 100 μ L- 1000 μ L.
- Puntas para micropipeta con rango de operación de 100 μ L- 1000 μ L.
- Tamiz de malla No 60.

7.4 DIAGRAMA EXPERIMENTAL GENERAL

Extracción asistida por ultrasonido

1. Acondicionamiento de muestra	<ul style="list-style-type: none">• Secar en estufa (70°C, 24 h)• Pulverizar y tamizar (malla #60)
2. Pesar muestra	<ul style="list-style-type: none">• 0.5 g y 1 g por triplicado
3. Adicionar solución hidroalcohólica	<ul style="list-style-type: none">• Metanol:agua (80:20)• Etanol:agua (80:20)
4. Sonicar	<ul style="list-style-type: none">• 30 minutos, 30 a 35°C)
5. Filtrar	<ul style="list-style-type: none">• Análisis cualitativo de mangiferina, naringina, quercetina y rutina a través de Cromatografía en Capa Fina (CCF).• Análisis cuantitativo (fenoles y flavonoides totales).
6. Concentrar	
7. Lavados	<ul style="list-style-type: none">• Acetato de etilo. hexano y/o diclorometano segun el flavonoide
8. Cuantificación e identificación mediante HPLC	<ul style="list-style-type: none">• Cuantificación e identificación mediante HPLC

Extracción asistida por enzimas

En esta extracción solo se utilizan las muestras que arrojaron mayor cantidad de los flavonoides de interés (mangiferina, naringina, quercetina y rutina) que se obtuvieron previamente en la extracción asistida por ultrasonido.

Acondicionamiento de muestra	<ul style="list-style-type: none">• Secar en estufa (70°C, 24 h)• Pulverizar y tamizar (malla #60)
Pesar muestra	<ul style="list-style-type: none">• 0.5 g por triplicado
Adición	<ul style="list-style-type: none">• Para los tratamientos enzimáticos: 15 mL solución buffer de CH₃COOH/CH₃COONa con un pH= 4.5-5, enzima en concentración 5% m/v, Además se realiza un control.
Agitar	<ul style="list-style-type: none">• agitación 200 rpm, 6 h T=35 °C. posteriormente se inactiva enzima.
Filtrar	<ul style="list-style-type: none">• Análisis cuantitativo (fenoles y flavonoides totales).
Lavados	<ul style="list-style-type: none">• Acetato de etilo, hexano y/o diclorometano según el flavonoide
Cuantificación e identificación mediante HPLC	<ul style="list-style-type: none">• Cuantificación mediante HPLC

7.5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

7.5.1 Extracción de mangiferina, naringina, quercetina y rutina, asistida por ultrasonido (EAU) y con uso de solventes y cromatografía en capa fina (CCF).

Se parte de la muestra a analizar que por referencia bibliográfica se obtiene mayor cantidad de los flavonoides de interés, ya sea mangiferina, quercetina, rutina o naringina.

En el caso de la mangiferina se analizó la cáscara de mango, la corteza del árbol de mango y sus hojas (Ruíz-Montañez et al, 2014). Para el caso de la naranja y toronja se tomó la cáscara de estos frutos y se tomó sólo el albedo para analizar la naringina, siguiendo la metodología de (M'hiri et. al., 2015). Mientras que, para rutina, la cáscara de limón y el té fueron muestras seleccionadas.

Y para quercetina se tomó como análisis la cebolla morada y manzana Golden delicious. Cabe mencionar que todas las muestras previamente se secaron, posteriormente fueron pulverizadas y pasaron por tamiz malla No 60.

7.5.1.1 *Mangiferina*

Con ligeras modificaciones, se pesaron 1 g muestra pulverizada y secas, por triplicado, cáscara del mango Ataulfo, corteza del árbol Ataulfo y hojas de la misma variedad. Se colocó 10 mL para una solución por par de disolventes de etanol: agua (80:20) y otra de

metanol: agua (80:20) pues son solventes utilizados para la extracción de esta xantona y que lo reportan Ruiz Montañez, et al, 2014; Shinde S. y Chavan A, 2014. Se sonicó durante 30 min (sonicador Cole-Parmer 8892) a temperatura de 25 °C, se filtró las muestras con la ayuda de un embudo Buchner, papel filtro Whatman #4 y matraz Kitazato y se realizó una prueba cualitativa para observar la presencia de los flavonoides, utilizando la técnica de cromatografía en capa fina, en el cual se utilizaron cromatoplaque de sílice y con el sistema de elución de acetato de etilo: metanol :agua (10:1.5:1).

Se trasvasó cada extracto obtenido por cada par de disolventes a un matraz bola, para su posterior concentración en un rotavapor con su respectivo baño. El extracto acuoso se colocó en un matraz Erlenmeyer previamente se le había colocado amberlita XAD-7HP para su adsorción y se coloca en un orbital a una velocidad de 125 rpm por 60 min.

Para su desorción de la resina se realizaron los lavados con acetato de etilo, las porciones son de 20 mL y para el primer lavado se usa a temperatura ambiente y para el segundo lavado a 45 °C. Se almacena para su posterior cuantificación en HPLC.

7.5.1.2 Naringina

Se pesó 1g de pulverizado seco de cáscaras de cítricos usados (limón, naranja y albedo de toronja). Se colocó 50 mL para una solución por par de disolventes de etanol: agua (80:20) y otra de metanol: agua (80:20) pues son solventes utilizados para la extracción de naringina como lo reporta M'hiri N, et al (2015) y Khan M, et al (2010). Se

sónico durante 30 min a una temperatura de 35 °C, se filtró y se realizó una cromatografía en capa fina con el sistema de elución de acetato de etilo: metanol :agua (10:1.5:1).

Posteriormente, se concentro a 50 rpm a una temperatura de 35 °C, se siguió la metodología de Sudto et al, 2009 con algunas modificaciones en la cantidad de solventes utilizados. Del extracto acuoso se adicionó 40 mL de agua y se puso a calentar en una parrilla con agitación a 70° C y una velocidad de 100 rpm. Posteriormente se adicionó 60 mL de diclorometano y se agitó; se separó la fase acuosa y se dejó reposar 4 días.

Se adecúa para cuantificación en HPLC.

7.5.1.3 Quercetina

Se pesó 1 g de piel de cebolla y 1 g de cascara de manzana Golden delicious. Se siguió la relación (1:10) m/v para cada uno de las muestras, utilizando dos pares de disolvente para tratarlo mediante extracción asistida por ultrasonido, una solución por par de disolventes de etanol: agua (80:20) y otra de metanol: agua (80:20). Se filtró para después realizar una cromatografía en capa fina la cual se eluyó con la fase móvil cloroformo: acetato de etilo: ácido formico (7:3:0.1), Posteriormente se concentro a 30 °C a una velocidad de 50 rpm. Se realizó un lavado con una fracción de 30 mL de acetato de etilo, un lavado de diclorometano con 30 mL y otra de hexano con el mismo volumen que las otras dos. Se almacena el extracto de acetato de etilo como lo indica Abdel-Gawad et al 2014. Se adecúa para análisis de HPLC.

7.5.1.4 Rutina

Se pesó 1 g de cáscara de limón y 1 g de té negro. Se siguió la relación (1:10) m/v para cada uno de las muestras, utilizando dos pares de disolventes para sonicar, uno de etanol: agua (80:20) y otro de metanol: agua (80:20). Se filtró para después realizar una cromatografía en capa fina la cual se eluyó con la fase móvil acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico:agua (10:1.1:1.1:2.7). Se concentró a 30 °C a una velocidad de 50 rpm. Se realizó un lavado con 30 mL de hexano y se descarta. Posteriormente se hace otro lavado con cloroformo 20 mL y se descarta como lo menciona Shukla P, et al. 2012.

Se almacena para posterior cuantificación en HPLC.

7.5.1.5 Fenoles totales

Para realizar la cuantificación de estos compuestos bioactivos se sigue la metodología por Folin-Ciocalteu. Donde en primera estancia, se pesan 0.5 g de muestra por triplicado y se adiciona 10 mL, ya sea etanol-agua o metanol-agua (80:20), se hace uso de la extracción asistida por ultrasonido durante 30 min, seguido se filtra y este extracto es el que se cuantifica fenoles totales. La cuantificación se realiza tomando una alícuota de 100 µL del extracto resultante y se colocó en un tubo de ensayo, posteriormente se adiciona 2 mL de Na₂CO₃ al 2%, después de 2 minutos se agrega 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu diluido con agua 1:1, se deja reposar por 30 minutos y se mide la señal de fluorescencia de la muestra a una longitud de onda de 750 nm en el espectrofotómetro.

Cabe mencionar que, para medir los fenoles totales, el reactivo de Folin-Ciocalteu es el que realiza una reacción óxido-reducción en conjunto de los compuestos bioactivos, ya que dicho reactivo es una mezcla de óxido de tungsteno y molibdeno una vez en contacto con el extracto oxida a los fenoles.

La concentración de fenoles totales en la muestra se cuantificó mediante una curva patrón de ácido tánico (figura 20).

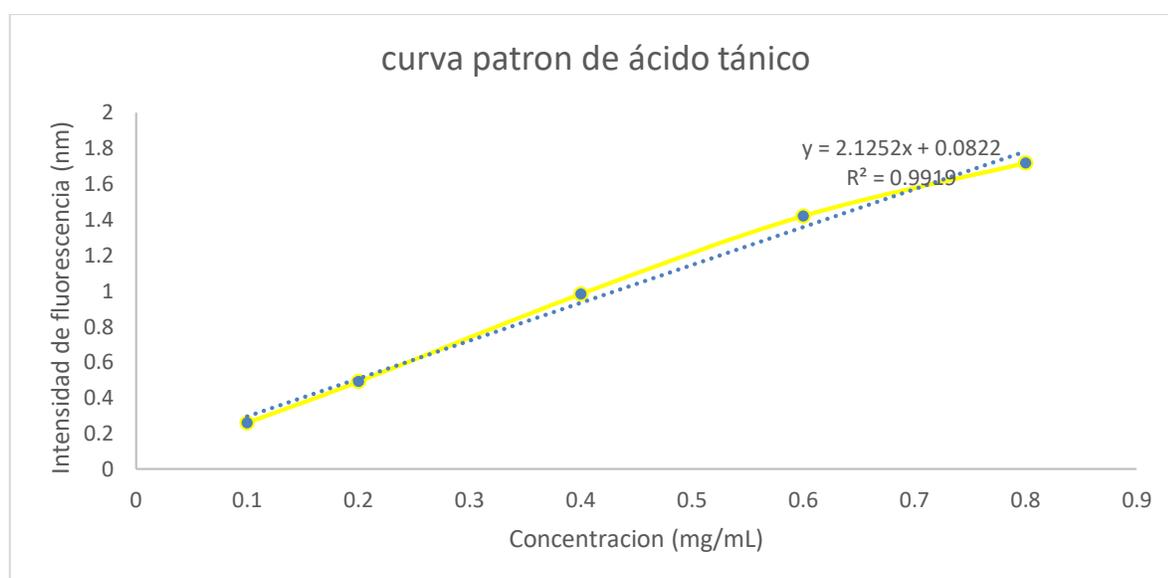


Figura 20. Curva patrón para cuantificación de fenoles totales.

7.5.1.6 Flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides se realizó la metodología reportada en (Morales y Navarro, 2016) con ligeras modificaciones. Se pesan 0.5 g de muestra por triplicado y se adiciona 10 mL de solución por par de disolventes ya sea etanol-agua o metanol-agua (80:20), se hace uso de la extracción asistida por ultrasonido durante 30 min, seguido se filtra y este extracto es el que se cuantifica. Del extracto hidroalcohólico obtenido, se tomó

en 100 μL y se colocó en el tubo de ensayo, seguido se adicionó 2300 μL agua destilada y 300 μL de NaNO_2 al 5%, se dejó reaccionar durante 5 minutos y se añade 300 μL de AlCl_3 al 10 % en etanol, se añade 2 mL NaOH 1M y 5 mL de agua destilada.

Se mide la señal de la intensidad de fluorescencia de la muestra a analizar a una longitud de onda de 415 nm.

La concentración de flavonoides totales en la muestra se cuantificó mediante una curva patrón de catequina (figura 21).

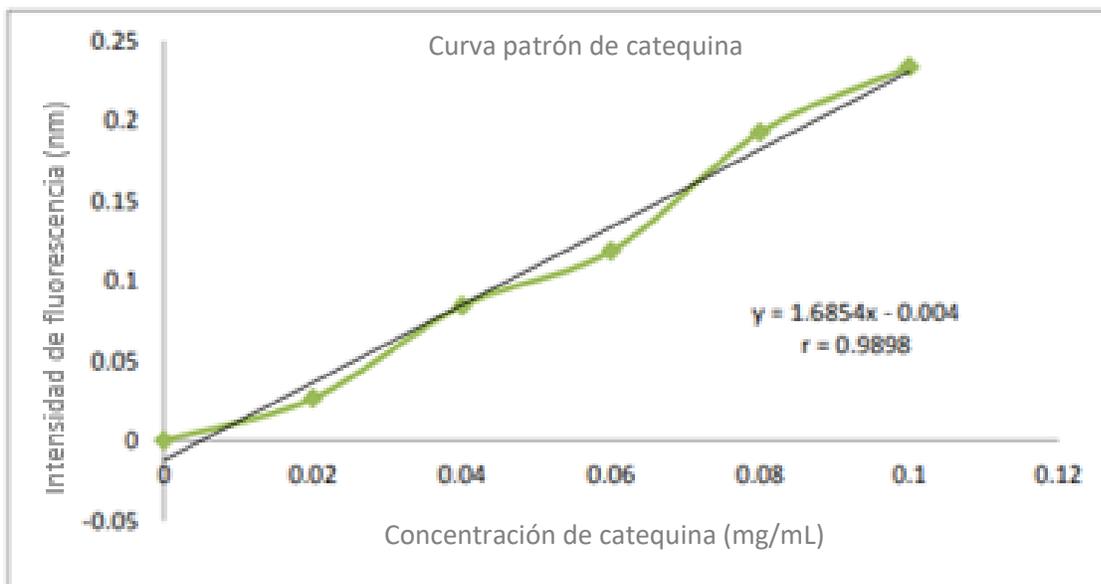


Figura 21. Curva patrón para la cuantificación de flavonoides totales.

7.5.2 Extracción asistida por enzimas

Entre los métodos modernos para la extracción de compuestos bioactivos se encuentra la extracción asistida por enzimas en el cual ha sido usado también como un tipo de pretratamiento cuando se considera la extracción mediante solventes. El valor agregado a este tipo de método extractivo es que es amigable con el medio ambiente,

además de obtener mejores rendimientos comparados con métodos tanto convencionales como no convencionales (Conde E., et al, 2010).

Se trabajó con las muestras que obtuvieron mayor cantidad de rutina, quercetina, mangiferina y naringina tratándolas con 2 enzimas diferentes al 5% v/p y su respectivo control y volumen de solución acuosa que a continuación se describe.

1. En un matraz Erlenmeyer de 50 mL pesar 0.5 ± 0.01 g de muestra pulverizada y adicionar 15 mL de una solución amortiguadora de $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ con un $\text{pH} = 4.5-5$. Se preparó la solución a partir del $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ a 0.1 M.
2. Se adiciona el porcentaje de la enzima a utilizar.
3. Paralelamente se prepara el control, el cual consta de agregar la misma cantidad de muestra y solución amortiguadora del paso 1 excluyendo la enzima y el volumen que se agrega de enzima, ese volumen será agregado de solución amortiguadora al control.
4. Poner en agitación mediante un agitador de orbital (Thermo Scientific Max Q 4000) a una temperatura de 35°C en agitación a 200 rpm durante 6 horas.
5. Seguido se realiza una inactivación del sistema enzimático a una temperatura de 82°C .

6. Se filtra y se almacena para su posterior cuantificación mediante HPLC.

7.6 Realización de curvas patrón para la cuantificación de mangiferina, quercetina, rutina y naringina por HPLC

La cuantificación de los flavonoides se obtuvo a partir de una curva patrón (anexo), para cada flavonoide a usar (mangiferina, quercetina, rutina y naringina) realizados a partir de los estándares comerciales, con un método de elución por gradiente que se presenta en las tablas 7 y 8.

Tabla 7. Sistema de HPLC para flavonoides.

Sistema	Condiciones
Columna	ODS Hypersil (250x4.6mm; 5µm)
Fase móvil	A: Ácido fosfórico al 1% B: Acetonitrilo
Flujo (mL/min)	1.0
Inyección (µL)	20.0
Longitud de onda (nm)	254 y 280
Tiempo de corrida (min)	30

Tabla 8. Gradiente de elución de los flavonoides

Tiempo (min)	Proporción A (%)	Proporción B (%)
0	95	5
2	85	15
5	80	20
9	80	20
11	80	20
14	75	25
17	70	30
20	70	30
22	50	50
24	50	50
26	95	5
30	95	5

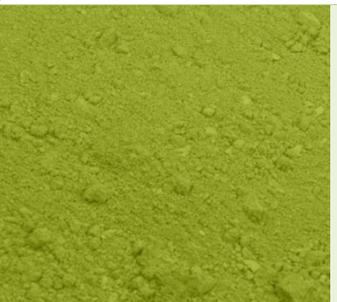
8 Resultados y discusión

8.1 Preparación de la muestra

Básicamente en ésta etapa del trabajo se enfocó a seleccionar y/o precisar, para posteriormente acondicionar las muestras a analizar que consistió en secar por estufa a 70 °C, pulverizar y tamizar.

Figura 22. Muestras pulverizadas para el análisis de los flavonoides de interés.

Fotografía de la muestra	Nombre de la muestra	Procedencia de la muestra
 a)	Cáscara de mango Aaulfo	Ecatepec, Estado de México
 b)	Corteza del árbol de mango Aaulfo	Proporcionadas del laboratorio 321, Conjunto E, Universidad Nacional Autónoma de México. Provenientes de Nayarit.
 c)	Hojas del árbol de mango Aaulfo	Proporcionadas del laboratorio 321, Conjunto E, Universidad Nacional Autónoma de México. Provenientes de Nayarit.
 d)	Albedo de la cáscara de toronja	Ecatepec, Estado de México

e)		Albedo de cáscara de naranja	Ecatepec, Estado de México
f)		Té negro	Wal-Mart, Universidad, Coyoacan.
g)		Piel de cebolla	Ecatepec, Estado de México
h)		Piel de manzana Golden delicious	Wal-Mart, Universidad, Coyoacan
i)		Cáscara de limón mexicano seco y pulverizado	Ecatepec, Estado de México

8.2 Selección y preparación de la muestra

La selección de las muestras se realizó dependiendo del flavonoide a localizar.

Para mangiferina se seleccionó la cáscara del mango variedad Ataulfo, la corteza del árbol de ésta variedad y sus hojas.

Para naringina se seleccionó la naranja, limón y toronja tomándose la cáscara de estos frutos y aislando el albedo, excepto para limón.

Mientras para rutina, la cáscara de limón, cáscara de naranja y el té fueron muestras seleccionadas.

Y por último quercetina, tomándose para su análisis la cáscara de naranja, cebolla morada y manzana.

Todas estas muestras se secaron, pulverizaron y fueron tamizadas mediante una malla de #60.

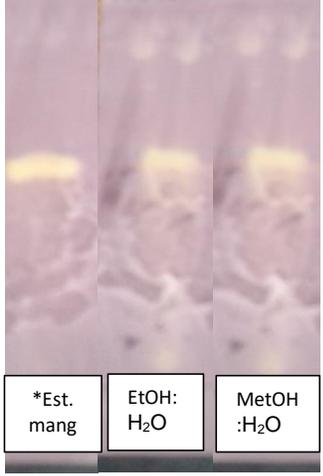
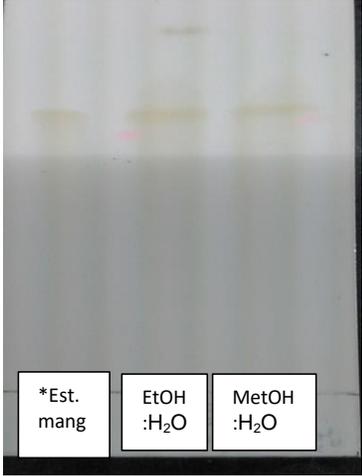
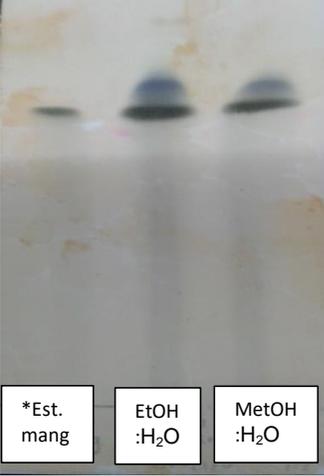
8.3 Confirmación de la presencia de los flavonoides mangiferina, quercetina, rutina y naringina mediante cromatografía en capa fina (CCF).

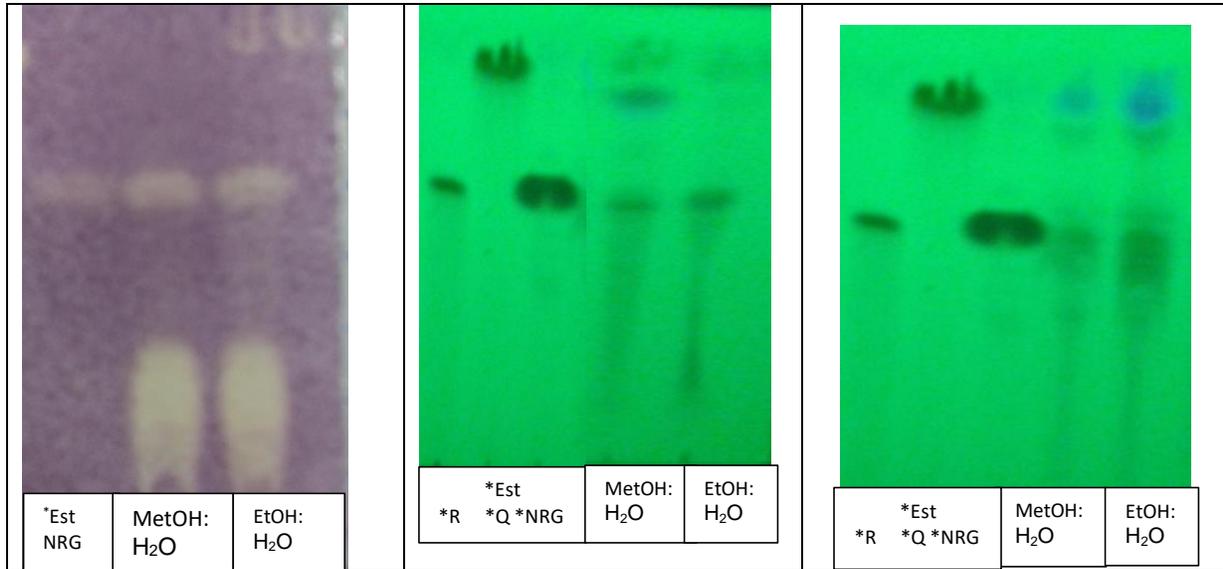
En la figura 23, se muestra las placas de sílica gel para cada muestra analizada para extracción asistida por ultrasonido por par de disolventes EtOH:H₂O y MetOH:H₂O (80:20).

Las placas correspondientes de la figura con el inciso a), b) y c), son de las muestras provenientes de cáscara, hoja y corteza del árbol de mango Ataulfo respectivamente y evidencia la presencia del flavonoide mangiferina referido por Ruiz-Montañez.

Siguiendo con las muestras analizadas, las figuras d), e) y f) son de los residuos de cáscara de cítricos. Para la figura d) es la cromatoplaca correspondiente a las extracciones por par de disolventes EtOH: H₂O y MetOH: H₂O (80:20) para el albedo de toronja, mientras que la figura e) corresponde a la muestra de naranja dulce.

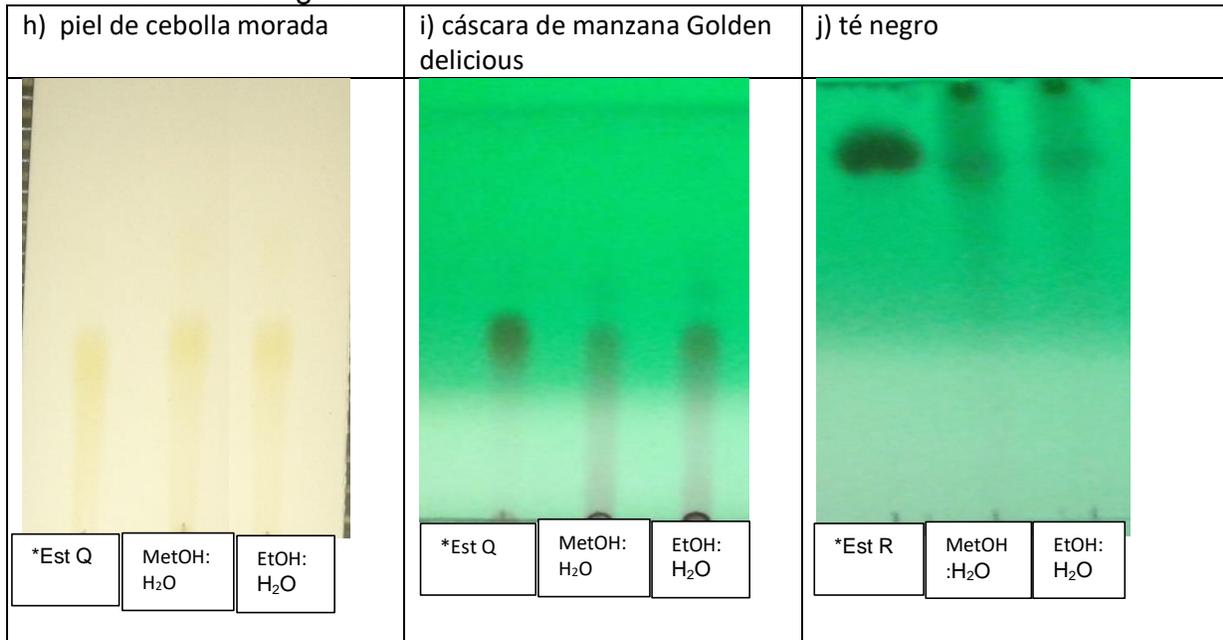
Figura 23. Cromatografías de los extractos de muestras analizadas mediante EAU, con par de disolventes EtOH:H₂O y MetOH:H₂O (80:20).

a) CCF de cáscara de mango Ataulfo por par de disolventes	b) Hoja de mango Ataulfo	c) Corteza de mango Ataulfo
		
d) Albedo de toronja	e) Albedo de naranja dulce.	f) Cáscara de limón



*est mang= estándar mangiferina, est Q= estándar quercetina, std R= estándar rutina y est NRG= estándar naringina.

Continuacion de la figura 23



*est Q= estándar quercetina, std R= estándar rutina

Quando se realizó la prueba cualitativa de cromatografía por capa fina, se observó la presencia de rutina y quercetina en cítricos, es por eso que se decidió cuantificar rutina en la muestra de cáscara de limón por que a parte de que se confirmó mediante

cromatografía en capa fina la existencia de rutina, en el artículo de Rosa et al, 2012 hacen notar la cuantificación de este flavonoide.

Se puede corroborar que, la cromatografía en capa fina es una técnica útil que nos permite observar la presencia de compuestos de interés en los extractos vegetales y que, sirve antes de realizar un análisis detallado mediante otras técnicas instrumentales sofisticadas (Stalikas C, 2010).

La fase móvil usada para mangiferina y naringina fue acetato de etilo: metanol :agua (10:1.5:1) con un Rf de 0.68 y 0.78 respectivamente, la fase móvil para rutina fue acetato de etilo: ácido acético: ácido fórmico:agua (10:1.1:1.1:2.7) obteniendo un Rf 0.74 y la fase móvil para quercetina cloroformo: acetato de etilo: ácido fórmico (7:3:0.1) con un Rf de 0.47. Se trabajó al principio y de manera general con la fase móvil usada para mangiferina y naringina pero se observa en la figura del inciso j que la quercetina era la última en eluir y que se traslapaba con otros compuestos, es por esto que se decidió realizar un sistema de elución para quercetina y que anteriormente se mencionó. Los reveladores usados fue DPPH y cloruro férrico al 5%.

8.4 Cuantificación de flavonoides y fenoles totales por espectrofotometría UV

8.4.1 Fenoles totales

Retomando la parte experimental se partió de una curva patrón de ácido tánico (figura 20) para la cuantificación de fenoles totales, expresando lo obtenido en mg equivalentes de ácido tánico por gramo de muestra.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24, resultando que las hojas de mango variedad Ataulfo es el que tiene un mayor valor (84.63 ± 2.77 mg/ g muestra) siendo el mejor extracto por par de disolventes en etanol:agua 80:20, seguido del albedo de cáscaras de *Citrus paradisi*, también conocida como toronja con par de disolventes el etanol:agua 80:20, dando una concentración de 77.38 ± 2.37 mg/g muestra; como tercer lugar queda la corteza del árbol de mango Ataulfo consiguiendo el mismo efecto positivo en cuanto a extracción con par de disolventes etanol:agua 80:20 con 73.65 ± 3.96 mg/ g muestra; empero, las 3 muestras que obtuvieron un menor valor con el mismo par de disolvente y orden que va de creciente a decreciente son las siguientes: piel de cebolla morada 29.79 ± 2.59 mg/g muestra, seguida de *camellia sinensis* 21.56 ± 1.71 mg/ g muestra y por último la piel de la manzana con 12.91 ± 2.88 mg/ g muestra.

Cabe mencionar que, las muestras que no presentaron diferencias significativas son entre las cáscaras de limón, naranja y mango. Como menciona Gowe, 2015 los residuos que se obtienen del procesamiento de frutas y verduras proveen una cantidad considerable de compuestos valiosos estando entre ellos los antioxidantes; también Khitma, et al, 2018 pone en evidencia que los residuos de los cítricos tienen gran cantidad de compuestos fenólicos, en especial para fenoles totales encontrado mayor contenido en la cáscara de toronja 77.3 mg/ g muestra, seguido de la cáscara de limón con 49.8 mg/ g muestra y cáscara de naranja con 35.6 mg/ g muestra siendo expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra en dicho estudio.

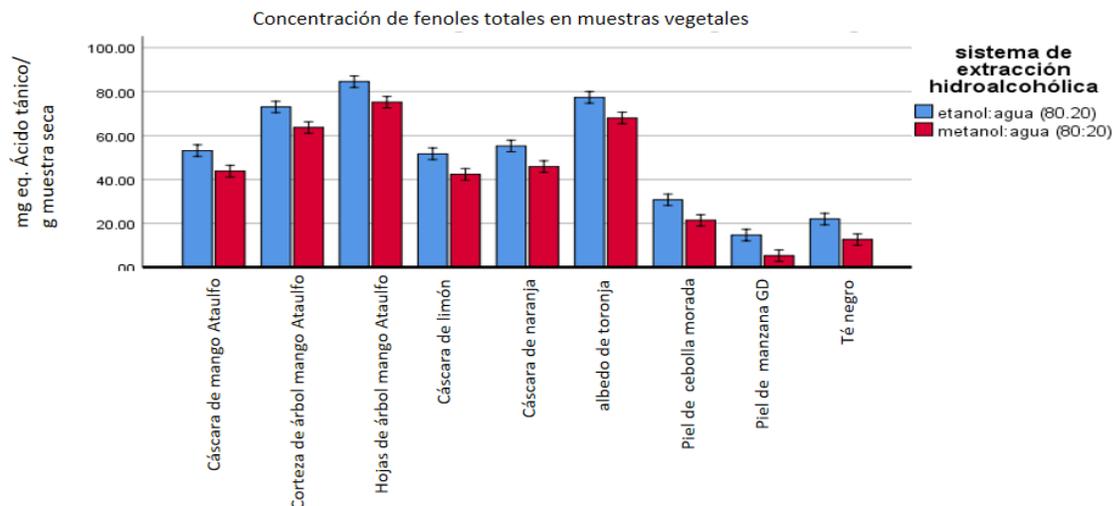


Figura 24. Concentración de fenoles totales expresado en ácido tánico por gramos de muestra seca, por par de disolventes metanol:agua y etanol:agua relación (80:20) mediante EAU.

8.4.2 Flavonoides totales

De la misma manera y como se trabajó con fenoles totales, para el caso de cuantificación de flavonoides totales se realizó una curva patrón donde en esta ocasión se utilizó la catequina para representar a este conjunto de compuestos bioactivos y lo obtenido se expresó en mg equivalentes de catequina (mg EC) por gramo de muestra.

En el gráfico 25 se observa que, la muestra con mayor contenido de flavonoides totales se encuentra en la cáscara de naranja y nuevamente con el sistema extractivo etanol:agua 80:20 con 41.25 ± 0.66 mg EC/ g muestra comparando con metanol:agua para la misma muestra 80:20 con 35.27 ± 2.38 mg EC/ g muestra; seguido de la cáscara de toronja manteniendo el par de solventes etanol:agua como el mejor sistema extractivo 31.87 ± 2.12 mg EC/ g muestra y como tercer mejor extracción se dio en las hojas de

mango Ataulfo con 36.69 ± 2.17 mg EC/ g muestra siendo un 43.35% de los flavonoides obtenidos por este método espectrofotométrico de los flavonoides totales.

Las muestras con menor cantidad de flavonoides totales de mayor a menor fueron la cáscara de mango Ataulfo con el sistema extractivo metanol:agua 80:20 obteniendo 17.01 ± 1.80 mg EC/g muestra, el té negro con el mismo par de disolventes metanol: agua con 8.34 ± 0.59 mg EC/g muestra y la piel de manzana con 5.99 ± 0.94 mg EC/g muestra para la extracción llevada a cabo por ultrasonido.

Según Atalay, et al, 2017 dependiendo del tipo de té podemos encontrar una cantidad de flavonoides (mg EC/g muestra) de 8.6-20.56 mg EC/g muestra, correspondiendo la cantidad más baja a el té negro y la muestra con mayor concentración de flavonoides totales es el té verde.

Si bien, no se observó diferencias significativas entre la piel de manzana y el té negro, y entre la cáscara de limón y la corteza de árbol de mango Ataulfo, para las demás muestras si hay diferencias significativas (véase anexo).

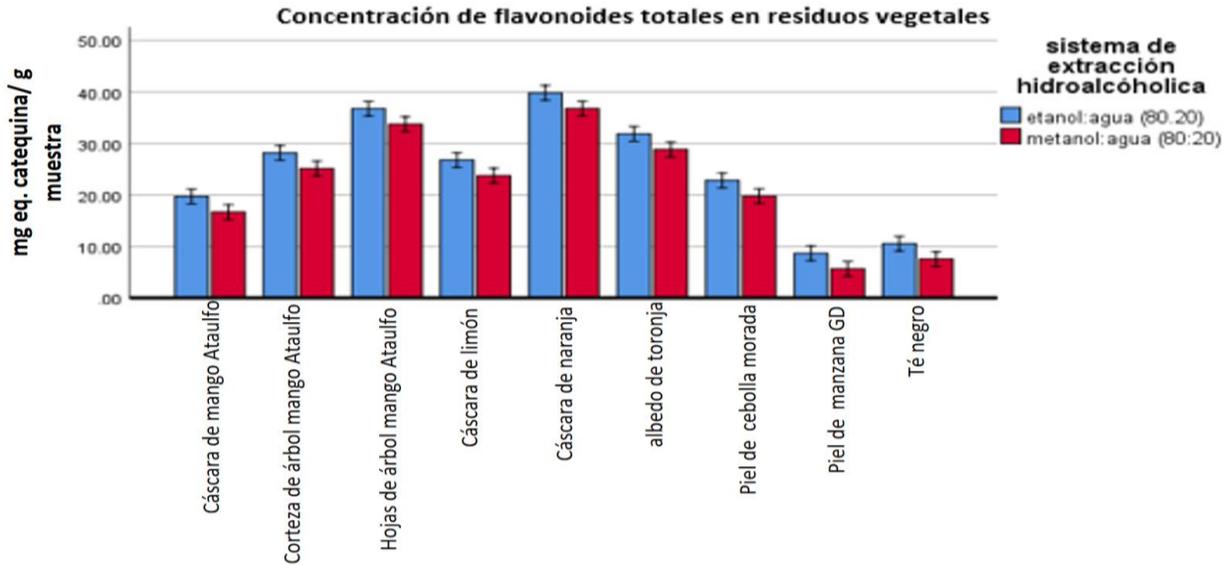


Figura 25. Concentración de flavonoides totales expresado en mg catequina por gramos de muestra seca, por par de disolventes metanol:agua y etanol:agua relación (80:20) mediante EAU.

8.5 Identificación y cuantificación por cromatografía de alta resolución de mangiferina, rutina, naringina y quercetina en muestras analizadas usando extracción asistida por ultrasonido.

A continuación se presentan los resultados del análisis mediante HPLC de los flavonoides (mangiferina, naringina, quercetina y rutina) en las muestras analizadas.

- Flavonoides

Tabla 9. Tiempo de retención de los flavonoides

Estándar	tiempo de retención (min)
Mangiferina	9.30±0.07
Naringina	18.26±0.17
Quercetina	25.39±0.36
Rutina	15.69±0.50

En la tabla 9, se muestra que los flavonoides mangiferina y rutina fueron los primeros en eluir con tiempos de retención de 9.30 ± 0.07 minutos y 15.69 ± 0.40 minutos respectivamente, después eluyó la naringina 18.26 ± 0.17 y por último la quercetina 25.39 ± 0.36 .

Las extracciones se realizaron por triplicado para cada una de las muestras seleccionadas y mencionadas anteriormente, utilizando como solventes dos mezclas hidroalcohólicas una es etanol : agua (80:20) y la otra es metanol : agua (80:20) siguiendo la metodología para cada flavonoide.

Posteriormente para la identificación y cuantificación de los flavonoides mangiferina, rutina, quercetina y naringina, se adecuaron las condiciones del HPLC usando metodología de Morales Toledo, 2016.

Para obtener los miligramos del compuesto de interés por mililitro de solvente, las áreas obtenidas mediante HPLC de las muestras se usaron en la ecuación de las curvas de calibración (área Vs mg de compuesto/mL de solvente). Con la concentración de la muestra medida (extracto/solvente) se obtuvieron los miligramos del flavonoide por miligramos del extracto. Finalmente, con los valores del extracto que se obtuvieron de cada muestra analizada, se calculó los miligramos de compuesto por gramo de muestra y éstas son la unidades usadas.

8.5.1 Mangiferina

Tabla 10. Contenido de mangiferina en cada muestra (mg mangiferina/g muestra).

Cáscara de mango		Corteza de mango		Hoja de mango	
*E:A (8:2)	**M:A (8:2)	*E:A (8:2)	**M:A (8:2)	*E:A (8:2)	**M:A (8:2)
11.13	12.01	29.05	34.47	8.26	17.29
11.02	11.98	27.90	33.28	9.66	26.94
11.11	12.27	29.49	33.84	8.62	25.95
Prom=11.09	12.09	28.81	33.86	8.85	23.39
D. S= 0.05	0.15	0.82	0.59	0.72	5.30
11.09±0.05	12.09±0.15	28.81±0.82	33.86±0.59	8.85±0.72	23.39±5.30

*mezcla hidroalcohólica etanol:agua 8:2

**mezcla hidroalcohólica metanol:agua 8:2

Promedio de contenido de la extracción de las muestras de hoja, corteza y cáscara

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 10, posteriormente se realizó un ANOVA para cada flavonoide de dos factores con una modalidad univariante en el software estadístico IBM SPSS utilizando como factores nominales (tipo de muestra y sistema de extracción) muestran una relación con la cantidad escalar de analito a cuantificar. Si el nivel de significancia (α o p) $p < 0.05$, el método de Duncan se usará para observar cuáles son las medias con diferencias significativas en dichas muestras (véase en Anexo).

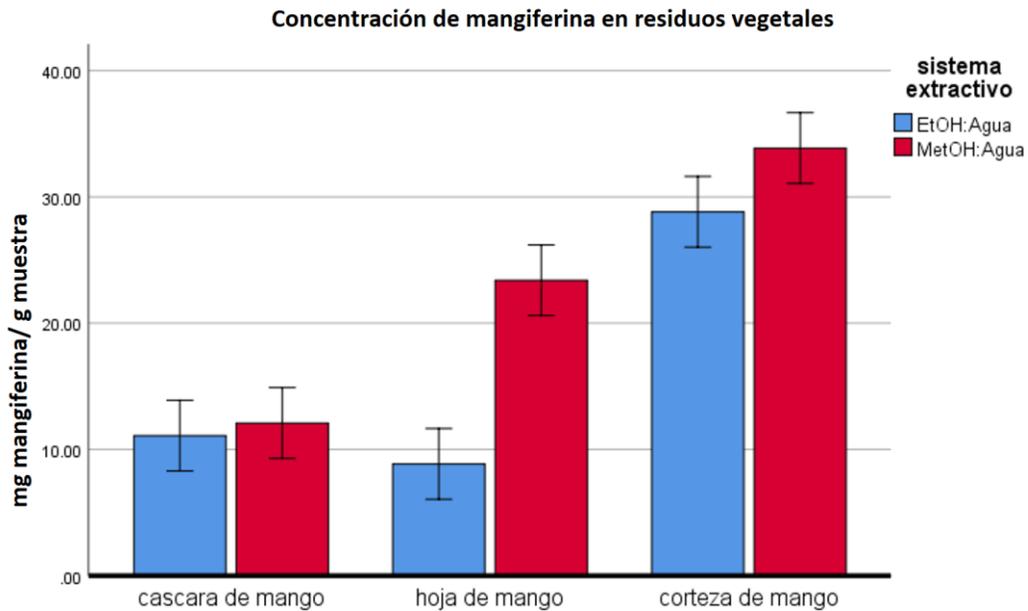


Figura 26. Concentración de mangiferina por gramo de muestra seca, por par de disolventes metanol:agua y etanol:agua relación (80:20) mediante EAU.

Como se puede observar y partiendo de la comparación de cada muestra en cada extracción por par de disolventes, en la figura 26 se analiza que, para cáscara de mango se tiene una mayor concentración para el sistema de metanol:agua (M:A) a proporción de (80:20) de 12.09 ± 0.15 mg de mangiferina por gramo de muestra, si bien se observa que en la extracción de mangiferina para el par de disolventes etanol:agua a proporción de (80:20) es de 91.72% y si bien (Ruíz-Montanez G., et al, 2014) reporta las cantidades de mangiferina en la cáscara de *Mangifera indica* variedad Ataulfo en 10 g y 100 g de cáscara de esta variedad también tienen indicado mediante un gráfico que por cada gramo de muestra se obtiene aproximadamente 12 mg de mangiferina.

También se observa que la hoja de *Mangifera indica* variedad Ataulfo dió resultados positivos con el par de disolventes metanol:agua (80:20) ya que se obtuvo una concentración de 23.39 ± 5.3 mg de mangiferina por gramo de muestra y en relación con dicha cantidad obtenida en el estudio de Jutiviboonsuk, et al 2010 se cuantificó una mayor concentración de mangiferina en donde se usa el solvente metanol, obteniendo 2.8 veces mas en comparación con una extracción llevada a cabo con etanol, en nuestro estudio y con nuestro par de disolventes metanol:agua con una proporción de (80:20) versus etanol:agua (80:20), se obtuvo 2.6 veces mas, observando una aproximación con respecto lo expresado por Jutiviboonsuk, et al 2010.

También Bernardini, et al 2005 a, hace un estudio de diversas variedades de hojas de *mangifera indica* y muestra la influencia del factor variedad, puesto que las cantidades de mangiferina oscilan de 11.2-1297.1 mg de mangiferina por kg de muestra en dicho estudio.

En la corteza de *mangifera indica* variedad Ataulfo, se muestra una mayor cantidad de mangiferina obtenida en comparación con las muestras hoja y cáscara de la misma variedad. Siendo puntuales, en los pares de disolventes, se observa que la extracción llevada a cabo con metanol:agua con proporción de (80:20) dió una concentración de 33.86 ± 0.59 mg mangiferina por gramo de muestra comparando con el sistema etanol:agua (80:20) con un concentración de 28.81 ± 0.82 mg mangiferina por gramo de muestra, teniendo esta última un rendimiento de 85.06% respecto con el de mayor rendimiento.

En un estudio de Forero, et al, 2016, también muestran la variación de mangiferina debido a las variedades de cortezas a analizar y el lugar de procedencia, tomando solo las variedades que se encuentran en centro y Sudamérica, donde la concentración de mangiferina que reportan, varía de los 698.9-4906 mg mangiferina por 100 g muestra (véase en tabla 4).

8.5.2 Naringina

Tabla 11. Contenido de naringina en cáscaras de cítricos (mg naringina/g muestra).

Albedo toronja		Cáscara naranja		Cáscara limón	
E:A (8:2)	M:A (8:2)	E:A (8:2)	M:A (8:2)	E:A (8:2)	M:A (8:2)
16.99	14.77	0.58	0.43	0.026	0.032
17.55	13.91	0.61	0.53	0.023	0.03
17.06	14.12	0.68	0.48	0.024	0.029
Prom= 17.20	14.27	0.62	0.48	0.0243	0.0303
D.S. =0.31	0.45	0.05	0.05	0.001	0.002
17.20±0.31	14.27±0.45	0.62±0.05	0.48±0.05	0.0243±0.001	0.0303±0.003

De la tabla 11, se obtiene que de los residuos de los 3 cítricos que se analizaron *Citrus paradisi* mejor conocida como toronja tiene los mayores contenidos de naringina en cualquiera de sus dos pares de disolventes usados en la extracción asistida por ultrasonido, pero el que obtiene una mayor extracción de naringina es la mezcla etanol:agua (80:20) con 17.20±0.31 mg de naringina por gramo de muestra, y que el otro sistema obtiene un 82.96 %, es decir, 14.27±0.45 mg de naringina por gramo de muestra, Yusof, et al, 1989 obtiene 3.91 mg en un gramo de muestra proveniente de cáscara utilizando como método una maceración.

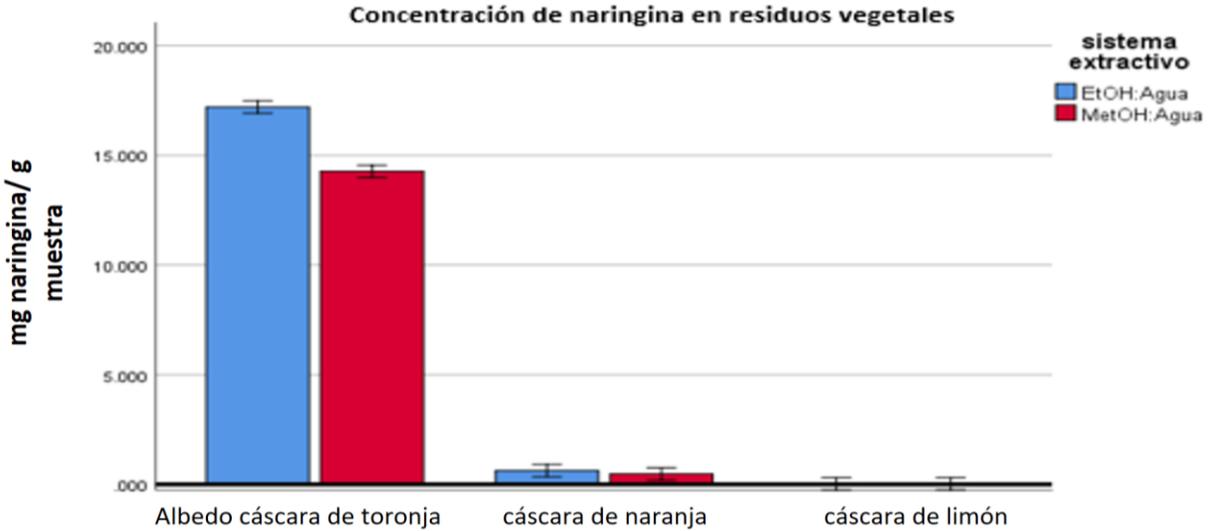


Figura 27. Concentración de naringina por gramo de muestra seca, por par de disolventes metanol:agua y etanol:agua relación (80:20) mediante EAU.

Por otro lado, Garcia-Castello et al, 2015, de diferentes proporciones de la cáscara tales como albedo, flavedo y pulpa obtiene 18 mg y 22 mg por cada 1 g de muestra seca usando la extracción asistida por ultrasonido a 34 °C y 42 kHz con etanol:agua (80:20), observando similitud en la cantidad extraída con este sistema.

Siguiendo con las cáscaras de *citrus sinensis* o mejor conocida como naranja dulce, el par de disolventes que obtuvo mayor cantidad de naringina fue para etanol:agua (80:20) con 0.62 ± 0.05 mg por gramo de muestra seca y que partiendo de este sistema observamos que para la mezcla metanólica se obtuvo un 77.42% de naringina, véase figura 27. Cabe mencionar que, M'hiri, et al, 2015 obtiene con las mismas condiciones trabajadas en este proyecto 0.981 g de naringina por kg de muestra y que Kahn, et al, 2009 obtiene 70.3 mg por 100g de muestra extraída, es decir, de 0.981 mg por gramo y 0.73 mg por gramo de muestra analizada respectivamente, estando ligeramente debajo

de lo que Khan, et al, 2009 con un 84.93% extraído a partir de la muestra analizada con el par de disolventes etanol:agua (80:20), debido a que las variedades de sólidos usadas en este escrito son uno de los factores de correlación.

8.5.3 Quercetina

Tabla 12. Contenido de quercetina en muestras (mg quercetina/g muestra).

Piel de manzana		Piel de cebolla morada		Cáscara de naranja	
E:A (8:2)	M:A (8:2)	E:A (8:2)	M:A (8:2)	E:A (8:2)	M:A (8:2)
Prom= 0.23	0.19	1.41	1.51	0.16	0.19
D.S. = 0.002	0.03	0.03	0.04	0.05	0.06
0.23±0.002	0.19±0.03	1.41±0.03	1.51±0.04	0.16±0.05	0.19±0.06

Se ha reportado que las cebollas coloridas, es decir, las cebollas rojas, amarillas y moradas son un recurso generoso de quercetina y sus derivados, y dependiendo del sitio del bulbo es la cantidad de quercetina a extraer, Wach et al, 2007 reportó que para la piel de cebolla de 960-1530 mg de quercetina por kg de muestra seca y esta variación en la cantidad de quercetina se daba a modificaciones en el medio extractivo el cual era acidificado con HCl 1.1 M, por otro lado mostraba el mismo efecto con la piel de manzana puesto que iba de 21 mg de quercetina cuando el medio no estaba acidificado mientras que cuando lo estaba se lograba hasta 250 mg de quercetina por kg de muestra seca; respecto con este proyecto observamos que la muestra de Allium cepa o mejor conocida como cebolla en este caso morada obtuvo el mejor rendimiento de extracción obtenidas por este caso con el sistema de metanol:agua (80:20) consiguiendo 1.51±0.04 mg de quercetina por gramo de muestra analizada encontrando lo obtenido en el rango que, Wach et al, 2007 con un 0.960 a 1.53 mg de quercetina por gramo de muestra seca. Si

bien la manzana variedad Golden delicious y la cáscara de naranja no muestra una diferencia significativa.

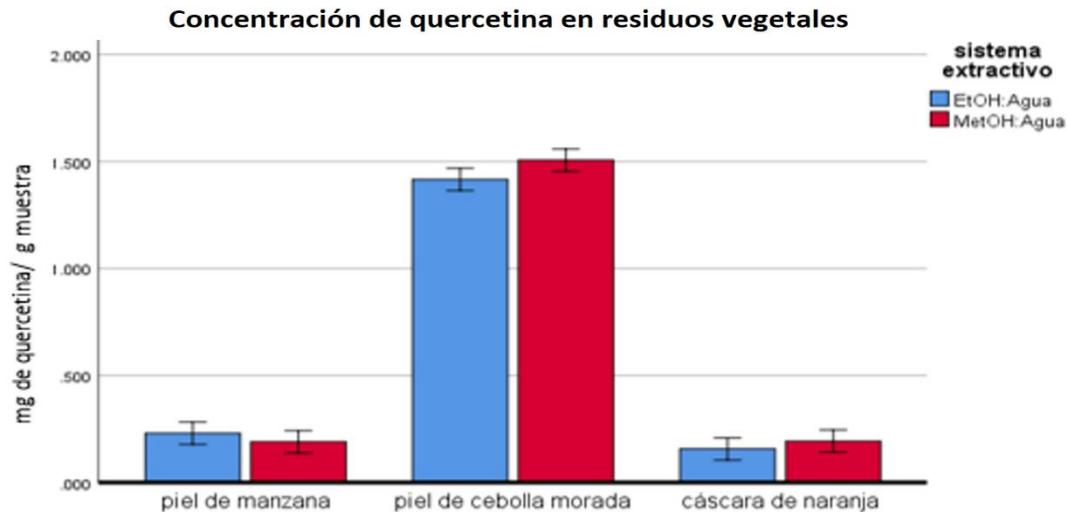


Figura 28. Concentración de quercetina por gramo de muestra seca, por par de disolventes metanol:agua y etanol:agua relación (80:20) mediante EAU.

8.5.4 Rutina

Entre los alimentos consultados y referenciados con generoso contenido de rutina podemos encontrar la planta de *Camellia sinensis* y que, paralelo a esta muestra los cítricos forman parte de la familia Rutacea donde se le conoce a la rutina como el flavonoide glucosilado de los cítricos según Gupta N et al, 2014.

Siguiendo el párrafo anterior, cabe mencionar que se analizó en este proyecto la presentación individual del té negro, es decir, bolsas de té negro, las cáscaras de naranja y limón (tabla 13), resultando una mayor concentración para la muestra de té negro con el par de disolventes etanol:agua (80:20) con 0.19 ± 0.02 mg de rutina por gramo de

muestra seca en comparación con el sistema extractivo metanol:agua (80:20) con una cantidad de 0.14 ± 0.03 mg de rutina por gramo de muestra seca obteniendo para este un 73.68 % de lo extraído para esta muestra.

Tabla 13. Contenido de rutina en muestras (mg rutina/g muestra).

Cáscara de limón		Té negro		Cáscara de naranja	
E:A (8:2)	M:A (8:2)	E:A (8:2)	M:A (8:2)	E:A (8:2)	M:A (8:2)
Prom= 0.10	0.19	0.19	0.14	0.13	0.10
D.S. = 0.01	0.02	0.02	0.03	0.03	0.01
0.10 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.10 ± 0.01

En el artículo de Rodica-Nascu et al, 2011 sitúa al té negro como el valor medio de las muestras extraídas, las cuales son té verde, blanco y negro, dicho esto y basándonos en el té negro Rodica-Nascu, et al, 2011 obtuvo un 3.314 mg de rutina por gramo de muestra, valor mucho mayor al obtenido en este trabajo.

Observamos que el menor contenido de rutina en las muestras analizadas en este proyecto fue el cítrico limón con 0.10 mg y 0.19 mg por gramo de muestra seca siendo el de mayor concentración con el par de disolventes etanol: agua (80:20) puesto que con la muestra conformada con el par de disolventes de metanol solo alcanza un 52.63 % basado en el mayor rendimiento para esta muestra (figura 29).

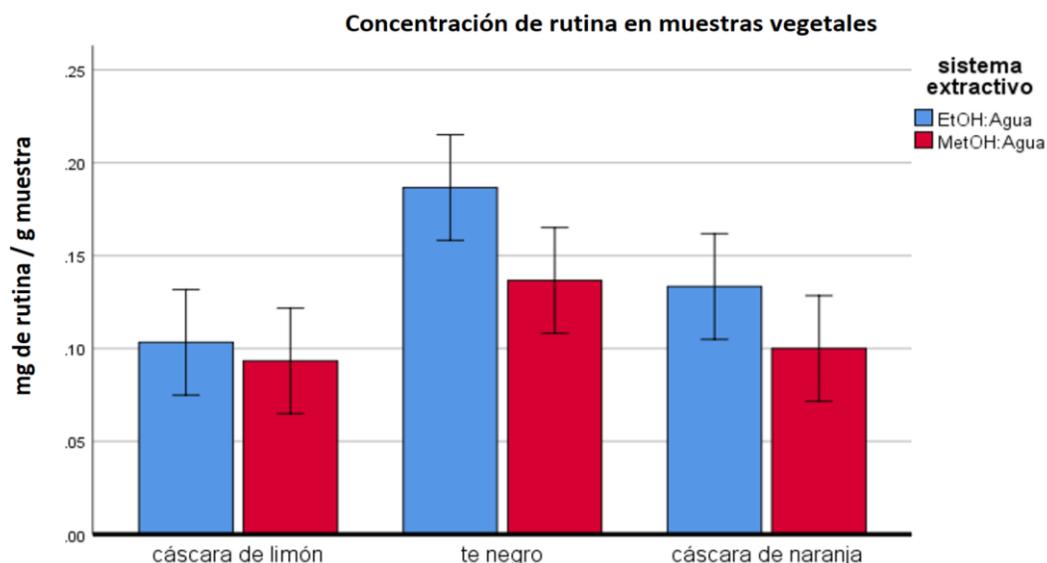


Figura 29. Concentración de rutina por gramo de muestra seca, por par de disolventes metanol:agua y etanol:agua relación (80:20) mediante EAU.

Si bien Loizzo, et al 2012 obtuvo un 25.3-35.1 mg de rutina por 100 g de muestra, cabe mencionar que escalando datos a un gramo se aproxima a lo que se extrajo para este trabajo pero que aún se encuentra por debajo con lo reportado.

8.6 Tratamiento asistido por enzimas

La mayoría de los compuestos antioxidantes son solubles en solventes polares, pero las grandes cantidades de polisacáridos altamente viscosos actúan como una barrera física. Las enzimas pueden descomponer las paredes celulares y los materiales de almacenamiento para liberar compuestos libres y polisacáridos unidos a los polifenoles (Conde et al, 2010).

Figura 30. Muestras mediante extracción asistido por enzimas



Retomando el anterior párrafo, en la figura 30 se puede observar cualitativamente que el tratamiento por enzimas tiene un efecto positivo en la extracción puesto que la lisis en la pared celular de las muestras analizadas denota que la pectina entre otros componentes que conforman dicha barrera física se ha llevado a cabo en comparación con la imagen de los controles en el cual se presencia que los componentes de la pared celular no han sido degradados y que por ende, denota una viscosidad de la muestra siguiendo lo mencionado por Conde et al,2010.

8.6.1 Fenoles totales

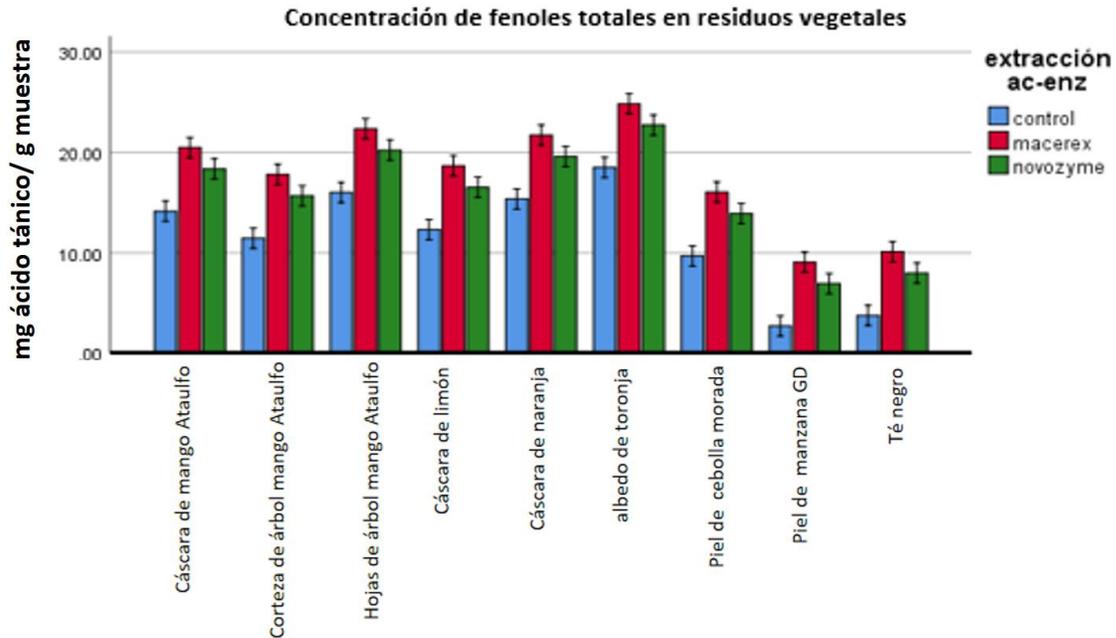


Figura 31. Concentración de fenoles totales expresado en mg de ácido tánico por gramo de muestra seca, mediante EAE al 5%.

Por otra parte, se puede mostrar en la figura 31 que, las 3 muestras con mayor concentración de fenoles expresados en mg equivalentes de ácido tánico por gramo de muestra, se obtuvieron con la enzima macerex. Dichos resultados fueron la cáscara de toronja con 26.2 ± 0.34 mg de ácido tánico, seguido de la cáscara de naranja con 23.48 ± 0.45 mg de ácido tánico y por último la hoja de mango Ataulfo el cual contiene 23.01 ± 0.45 mg de ácido tánico dado por cada gramo de muestra analizada respectivamente. Si bien, las muestras que menor cantidad de fenoles totales fueron con los controles efectuados en la piel de la cebolla morada 10.21 ± 0.67 mg de ácido tánico/g muestra, piel de manzana 4.94 ± 0.20 mg de ácido tánico/g muestra, y té negro 6.05 ± 0.22 mg de ácido tánico/g muestra, debido a que solo hubo agitación pero no hubo

la lisis que efectua la enzima (novozyme) o el complejo enzimático (macereX) en la pared celular de las muestras.

En dichas extracciones se observa que existen diferencias significativas entre las muestras (véase anexo), pero entre la piel de manzana y el té negro no se aprecian dichas diferencias, también no se obtuvo diferencias significativas entre corteza de árbol de mango Ataulfo y cáscara de limón, entre cáscara de mango Ataulfo y cáscara de naranja dulce y por último la cascára de naranja y hoja de mango Ataulfo.

8.6.2 Flavonoides totales

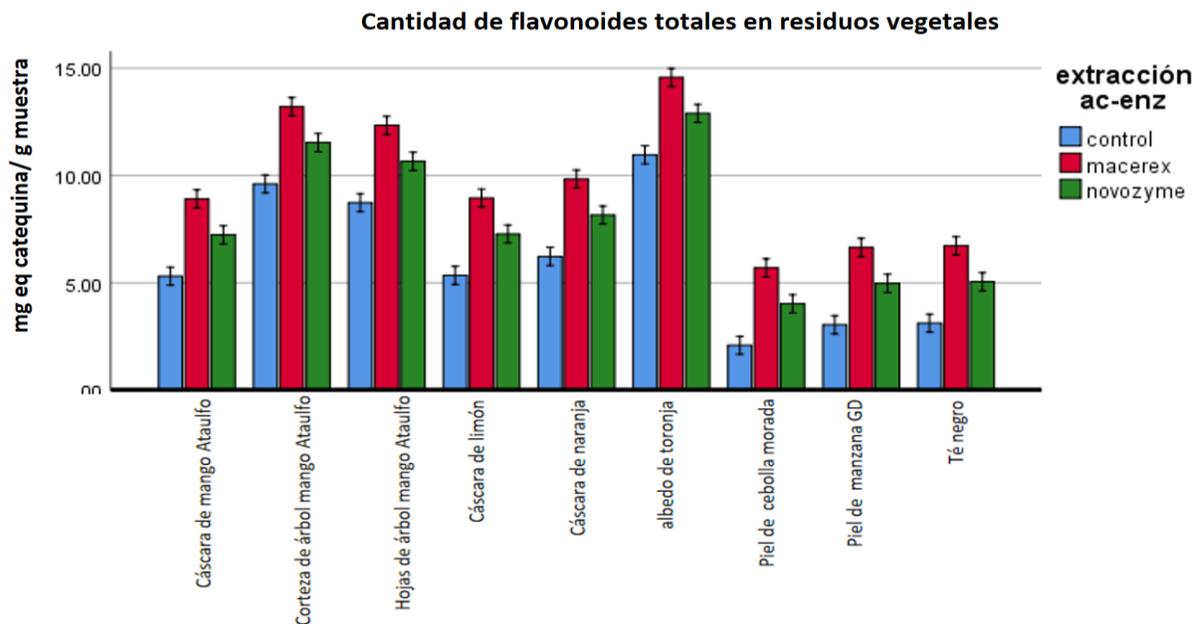


Figura 32. Concentración de flavonoides totales expresado en mg de catequina por gramo de muestra seca, mediante EAE al 5%.

En los tratamientos enzimáticos, para la figura 32, los resultados dados para los flavonoides totales están expresados en mg equivalentes de catequina/g muestra.

De las muestras analizadas, las 3 muestras que presentan un mayor contenido de flavonoides totales fueron el albedo de toronja con un contenido de 15.33 ± 0.47 mg de catequina/ g muestra, seguido de la corteza de árbol de mango con 13.31 ± 0.32 mg de catequina/ g muestra y la tercera muestra con mayor contenido fue la hoja de mango con 12.63 ± 0.36 mg de catequina/ g muestra, en donde la enzima macerex fue la que obtuvo mejor cuantificación en dichas muestras. De lado contrario, las tres muestras con menor cantidad de flavonoides totales y con tratamiento enzimático fue para novozyme, en orden decreciente fueron el té negro con 6.74 ± 0.20 mg de catequina/ g muestra, seguido de la piel de manzana Golden con 6.62 ± 0.44 mg de catequina/ g muestra y por último la piel de la cebolla morada con 5.45 ± 0.45 mg de catequina/ g muestra.

En dichas extracciones se observa que existen diferencias significativas entre las muestras (véase anexo), pero entre la piel de manzana y el té negro no se aprecian dichas diferencias y también no se obtuvo diferencias significativas entre cáscara de mango Ataulfo y cáscara de limón.

8.6.3 Extracción enzimática de mangiferina, naringina, quercetina y rutina en algunos residuos

Basándonos en los resultados obtenidos en ultrasonido y tomando únicamente en cuenta las muestras que obtuvieron mayores cantidades de mangiferina, quercetina, rutina y naringina, se prosigió a realizar las extracciones asistidas mediante enzimas, empleando la enzima novozyme 33095 la cual tiene una actividad pectin liasa y

poligaracturonasa y la enzima Macerex la cual tiene una mezcla de celulasa, hemicelulasa y pectinasa.

De acuerdo con la figura 33, la extracción enzimática con novozyme 33095 en la corteza del árbol de mango Ataulfo tiene un rendimiento 35.99 % resultando que el tratamiento control fue de 6.39 ± 0.27 mg de mangiferina por gramo de muestra seca y se extrajo 8.69 ± 0.25 mg de mangiferina por gramo de muestra seca mientras que macerex tuvo un rendimiento de 53.36 % pues se extrajo 9.80 ± 0.61 mg de mangiferina por gramo de muestra seca.

Siguiendo el caso del albedo de la cáscara de toronja, se muestra que el control arrojó 7.99 ± 0.13 mg de naringina por gramo de muestra seca y que la mejor extracción fue con la enzima macerex con un 61.82 % pues se obtuvo 12.93 ± 0.15 mg de naringina en comparación con novozyme el cual dio 10.42 ± 0.38 mg de naringina en un gramo de muestra seca y un rendimiento de 30.41% .

Para la piel de cebolla, se encontró que la cantidad de quercetina en el control fue de 0.60 ± 0.07 mg de quercetina en un gramo de muestra y con el tratamiento con macerex se obtuvo una concentración de 1.13 ± 0.10 mg de quercetina en un gramo de muestra seca que representa un rendimiento de extracción de 88.33%, mientras que para novozyme se obtuvo 0.95 ± 0.06 mg de quercetina en un gramo de muestra seca que corresponde a un 58.33% de rendimiento.

Por último, y observando la cantidad de rutina en té negro, el control indica una extracción de 0.053 ± 0.015 mg de rutina, para macerex 0.086 ± 0.013 mg mientras que para novozyme es de 0.072 ± 0.013 mg de rutina, lo cual novozyme da mayor rendimiento de 62.26% en comparación con macerex 35.85 %.

Se observa que macerex fue positivamente preponderante en las extracciones de corteza de árbol del mango variedad Ataulfo, piel de cebolla morada y té negro debido a su mezcla que posee este sistema enzimático, dado que ayuda a la sensibilización de la pared celular de las muestras, aunque no fue así en el tratamiento del albedo de toronja.

De acuerdo con Conde et al, 2010 las variables que afectan el rendimiento y la actividad de extracción incluyen: tipo de muestra y etapas de pre acondicionamiento, temperatura, tipo y concentración de disolvente, tipo y concentración de enzimas; pudiendo ser que, el tipo de muestra, en este caso, el albedo de toronja es una fuente abundante de pectina dando una mejor extracción con novozyme que es una enzima con actividad pectin liasa y poligaracturonasa.

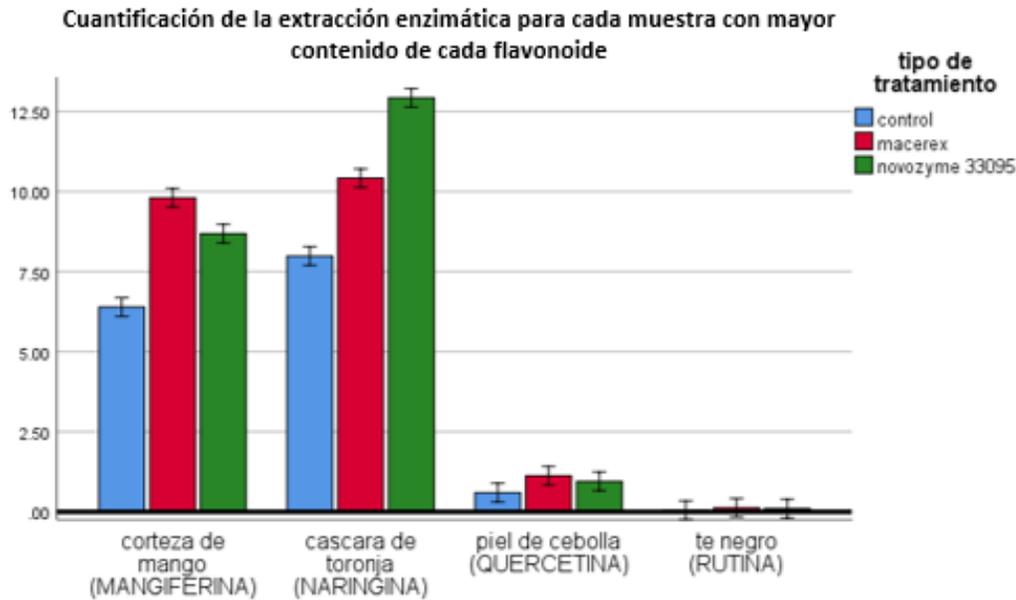


Figura 33. Concentración de mangiferina, naringina, quercetina y rutina por gramo de muestra seca, mediante EAE al 5%.

En el artículo de Puri, et al, 2012, muestra un listado de extracción asistida por enzimas donde presenta los compuestos bioactivos que se extrajeron de diversas fuentes vegetales, las enzimas utilizadas y los rendimientos; ejemplo de ello es la cáscara de toronja del cual se extrajo azúcar y su rendimiento de extracción fue de 0.6377%. También realiza una extracción para cáscara de cítricos evaluando la cantidad de polifenoles y utilizando cellulzyme MX (celulasa) se obtuvo 65.5% de rendimiento.

9 Conclusiones

- Siendo específicos, el sistema de extracción asistida por ultrasonido por par de disolventes conformado por etanol: agua (80:20) se obtuvieron los mejores resultados para fenoles totales, poniendo como ejemplos: las hojas del árbol de mango Ataulfo y el albedo de la cáscara de la toronja.

Las hojas de mango Ataulfo con 84.63 mg de ácido tánico /g de muestra seca en comparación con la extracción por par de disolventes metanol: agua, 80:20 con un contenido de 75.09 mg de ácido tánico/g de muestra; también la muestra del albedo de la cáscara de toronja pues el contenido por par de disolventes con etanol: agua (80:20) fue de 77.38 mg de ácido tánico/ g muestra seca en contraste con el contenido obtenido para la misma muestra pero con el par de disolventes metanol: agua, 80:20, se extrajo solo 67.99 mg de ácido tánico/ g muestra seca (véase figura 24 o anexo en análisis estadísticos).

- Para flavonoides totales la mayor concentración se obtuvo en la cáscara de naranja usando el par de disolventes etanol: agua, (80:20), mediante la extracción asistida por ultrasonido con una concentración de 41.25 mg de catequina/ g muestra en comparación con el par de disolventes metanol: agua (80:20) con 35.39 mg de catequina/g muestra.
- La concentración más alta de mangiferina se obtuvo en la extracción asistida por ultrasonido con el par de disolventes metanol: agua (80:20) para la muestra de la corteza del árbol con una concentración de 33.86 mg de mangiferina/ g muestra.

- El albedo de la cáscara de toronja fue la muestra con la mayor cantidad de naringina cuando se extrajo mediante EAU y el par de disolventes etanol: agua (80:20) con un contenido de 17.2 mg naringina/ g muestra.
- Siguiendo con la quercetina, si bien la piel de cebolla es una fuente de quercetina como se ha citado en diversos artículos se observa que también la concentración es 1.51 mg de quercetina/ g muestra con EAU-metanol: agua (80:20) en relación a las cáscaras de naranja (0.193 mg quercetina/ g muestra) y piel de manzana (0.190 mg quercetina/ g muestra).
- Para la rutina, la EAU etanol: agua (80:20) del té negro fue la muestra que obtuvo las mejores concentraciones con 0.1867 mg rutina/ g muestra versus las cascara de limón y naranja. Además, la EAU por par de disolventes usando metanol: agua dio diferencias significativas entre el té negro versus la muestra de cáscara de limón y cáscara de naranja.
- Basándonos en los resultados obtenidos en ultrasonido y tomando únicamente en cuenta las muestras que obtuvieron mayores cantidades de mangiferina, quercetina, rutina y naringina, se analizaron dichas muestras para tratarlas con enzimas, en la cual, las muestras con mayor contenido de fenoles totales cuantificados por EAE fue con la enzima macerex, dando una concentración en el albedo de la cáscara de toronja de 26.2 mg de ácido tánico/ g muestra, pero si se compara con los extractos mediante EAU con el par de disolventes con el que

obtuvo mayor concentración de fenoles, expresado en mg de ácido tánico por g muestra, se obtuvo una concentración en etanol: agua (80:20) de 77.38 mg de ácido tánico/ g muestra, solo muestra un rendimiento de 33.62 % con respecto a esta extracción; y en metanol :agua (80:20) una concentración de 67.99 mg ácido tánico/ g muestra seca mostrando apenas un rendimiento de 38.27 % con respecto a este sistema.

- Para los flavonoides totales expresado en mg de catequina/ g de muestra nuevamente mostró una mayor concentración usando la enzima macerex y en la muestra del albedo de cáscara de toronja fue de 15.33 mg /g muestra seca, pero no mayor a lo obtenido en la EAU en etanol: agua (80:20) ya que para esta muestra se obtuvo una concentración de 31.87 mg/ g muestra seca y para EAU metanol: agua (80:20), se obtuvo una concentración de 28.86 mg/ g muestra seca.
- Respecto a la cuantificación de cada flavonoide de interés, en el caso de la mangiferina usando la EAE, otra vez la enzima macerex tuvo una mayor concentración obtenida, puesto que en la muestra de la corteza del árbol de mango Ataulfo se obtuvo un 9.80 mg de mangiferina/ g muestra seca, empero con la EAU en metanol: agua (80:20) la concentración de mangiferina en esta misma muestra fue de 33.86 mg de mangiferina/ g muestra seca y en EAU en etanol: agua (80:20) la concentración fue de 28.81 mg de mangiferina/ g muestra seca.

- Para el flavonoide de la naringina mediante EAE la enzima novozyme 33095 lideró en cuanto a cuantificación de la naringina para el albedo de la cáscara de toronja pues se obtuvo 12.93 mg de naringina/ g de muestra seca; una vez más, comparando con EAU en etanol: agua (80:20) se obtuvo 17.20 mg naringina/ g muestra seca mientras que para la EAU en metanol: agua (80:20) se obtuvo 14.27 mg naringina/ g de muestra seca.
- Para la cuantificación de quercetina mediante EAE, la enzima macerex arrojó una concentración en la piel de cebolla morada de 1.13 mg de quercetina / g de muestra seca, pero para EAU en metanol: agua (80:20) se obtuvo una concentración de 1.51 mg de quercetina/ g muestra seca y EAU en etanol: agua (80:20) una concentración de 1.41 mg de quercetina/ g muestra seca.
- Por último, la rutina encontrada en el té negro con respecto a EAE es con macerex con una concentración de rutina de 0.086 mg de rutina/ g de muestra seca, pero en EAU en etanol: agua (80:20) la concentración fue de 0.1867 mg de rutina/ g muestra seca y en EAU en metanol: agua (80:20) existe una concentración de 0.1367 mg de rutina/ g muestra seca.

10 Perspectivas

El tiempo y temperatura de extracción tanto en la parte enzimática como por el método de ultrasonido, puede ser otro parámetro a medir en éstos métodos no convencionales de extracción.

También como parte del pretratamiento, en donde se contempla el secado y la pulverización de las muestras, posteriormente a estas 2 etapas de pretratamiento se podría usar en primera instancia una extracción enzimática seguida de una extracción asistida por ultrasonido.

Al menos cada muestra presenta un flavonoide de interés en éste proyecto, pero a modo de seguimiento, se podría buscar los flavonoides de esta tesis u otros compuestos fenólicos y/o sustancias bioactivas de forma cualitativa mediante cromatografía en capa fina. Esto puede no ser limitativo a este tipo de compuestos ya mencionados, también podría trabajarse en compuestos que son utilizadas en la industria de alimentos, tales como: la pectina y aceites esenciales, en donde los residuos de los cítricos son una buena fuente de este homopolisacárido.

11 BIBLIOGRAFIA

Abdel-Gawad M., El-Hashash M., El-Sayed M., El-Wakil E., Abdel-Lateef E. (2014). Chromathographic Isolation of allium cepa (ssp. Red onion) and its cytotoxic activity against human liver carcinoma cell lines (HEPG2). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6, pp. 108-111.

Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias (16 de julio de 2012). https://dof.gob.mx/nota_detalle_popup.php?codigo=5259470.

Administración de Alimentos y Medicamentos. Ingredientes y empaques alimentarios, generalmente reconocidos como seguros, 09 de junio de 2019. Departamento de Salud y Servicio Humanos de los Estados Unidos. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>

Aehle W, (2004), *Enzymes in industry, production and application*. Darmstadt, Alemania, Editorial Wiley VCH. https://www.academia.edu/11945432/Enzymes_in_Industry_Production_and_Applications.

Agustí, M. Citricultura, Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona (2003), 2ª ed. pp. 19-22, 89-101, 162-163, 171-173.

Asociación de Fabricantes de Saborizantes y Extractos. Progreso reciente en consideración de ingredientes aromatizantes bajo la enmienda de los aditivos alimentarios. III. Sustancias generalmente reconocidas como seguras.

https://www.femaflavor.org/sites/default/files/3.%20GRAS%20Substances%282001-3124%29_0.pdf

Awad, M., De Jager, A., Van Westing, L. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit: characterization of variation. *Scientia Horticulturae* (83), pp.249-263.

Atalay, D., Erge, H.S. (2017). Determination of some physical and chemical properties of white, green and black teas (*Camellia sinensis*). *The Journal of Food*, 42, pp.494-504.

Ávalos-García, A., Pérez-Urría E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología, Serie Fisiología Vegetal*, 2, pp.119-145.

Ayala N and Calle A. (2016). Aplicación de técnicas de deshidratación, maceración y escaldado, para la conservación de manzanas Red Delicious, Flor de mayo y Emilia. Tesis de licenciatura. Universidad de Cuenca, Ecuador.

Benítez, V., Mollá E., Martín-Cabrejas M., Aguilera Y., López-Andréu, F., Cools K., Terry L. & Esteban R. (2011). Characterization of Industrial Onion Wastes (*Allium cepa* L.): Dietary Fibre and Bioactive Compounds. *Springer*, 66, pp. 48–57.

Berardini, N.; Fezer, R.; Conrad, J.; Beifuss, U.; Carle, R.; Schieber, A. (2005). Screening of mango (*Mangifera indica* L.) cultivars for their contents of flavonol O- and xanthone C-glycosides, anthocyanins and pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Easton, 53, pp. 1563-1570.

Cai, H., Zou H., Liu J., Xie W., Kuo J., Buyukadad M and Evrendilek F. (2018) Thermal degradations and processes of waste tea and tea leaves via TG-FTIR: Combustion performances, kinetics, thermodynamics, products and optimization. *Bioresource Technology*, 268, pp. 715-725.

Cervantes -Cardoza, V., Rocha-Guzmán N., Gallegos-Infante J., Rosales-Castro M., Medina-Torres L., González-Laredo R. (2010). Actividad antioxidante de extractos de semilla de tres variedades de manzana (*Malus domestica* Borkh -Rosaceae-) *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9, pp. 446-456.

Conde E., Moure A., Domínguez H., Parajó J. (2010). Extraction of natural antioxidants from plant foods. *Separation, Extraction and Concentration Processes in the Food, Beverage and Nutraceutical Industries*, 18, pp.506-594.

De la Rosa-Hernández, Martina; Wong-Paz, Jorge E.; Muñiz-Márquez, Diana B.; Carrillo Inungaray, María L.; Sánchez-González, José M. Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (*Citrus paradisi*) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 47, 2, 2016, pp. 22-35.

Dorta E., Lobo G., Gonzalez M. (2012). Reutilization of mango byproducts: study of the effect of extraction solvent and temperature on their antioxidant properties. *Journal Food Science*. 77, pp.80–88.

Escaplez M., Garcia-Perez J., Mulet A. and Carcel J. (2011). Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. Springer, *Food Engineering Reviews*, 3, pp. 108-120.

Foo L Y, Lu Y. 1999. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. *Food Chemistry*. 64, pp. 511 - 518.

Forero L., Pulido P. (2016). Extracción, purificación y cuantificación de mangiferina en la corteza de algunos cultivares de mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 10, pp. 292-300.

Galanakis Charis M., (2012) Recovery of high added value components from food wastes: conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends in Food Science & Technology*, 26, pp. 68-87.

García-Castello E., Rodríguez-López A., Mayor L., Ballesteros R., Conidi C. y Cassano A. (2015) Optimization of conventional and ultrasound assisted extraction of flavonoids from grapefruit (*Citrus paradisi* L.) solid wastes. Elsevier, *Food Science & Technology*, 64, pp. 1114-1122.

García Lidón, A., Del Rio Conesa J., Porrás Castillo I., Fuster Soler M., Ortuño Tomas A., El limón y sus componentes bioactivos, Consejería de agricultura, agua y medio ambiente, España, pp. 13, 17, 21, 49-78, 88-93.

García, M; García, H; Bello, L; Sáyago, S.; Doca, M. 2013. Functional properties and dietary fiber characterization of mango processing by-products (*Mangifera indica* L., cv Ataulfo and Tommy Atkins). *Plant foods for human nutrition*. 68, pp 254–258.

Gonzalez-Molina, E., Domínguez-Perles R., Moreno D. and García-Viguera C. (2009). Natural bioactive compounds of Citrus limón for food and health, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, pp. 327-345.

Gowe C. 2015. Review on potential use of fruit and vegetables by-products as a valuable source of natural food additives. *Food Science and Quality Management*, 45, pp. 47-61.

Guía de la industria Química, 2015. *Aditivos alimentarios: seguridad e innovación*.
<https://guiaquimica.mx/secciones/2015/aditivos-alimentarios>

Gupta N, Chauhan RS and Kumar J., (2014). Rutin: A bioactive flavonoid, *Handbook of Medicinal Plants and their Bioactive Compounds*, p.p 51-57

Gupta K and Joshi V. (2000). Fermentative utilization of waste from food processing industry in: *Postharvest Technology of Fruits and Vegetables: Handling Processing Fermentation and Waste Mangement* ,2, Indus Pub Co, New Delhi.

Ignat, I., Volf I. and Popa V. (2013). *Analytical Methods of Phenolic Compounds*. Springer, 67, 2061-2092.

Janick, J. (2002). Wild apple and fruit trees of Central Asia. *Horticultural Reviews* 29. 416 pp.

Jeszka-Skowron M., Krawczyk M., Zgoła-Grzes'kowiak A. (2015). Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals, *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 70-77.

Jiang D., Dai Z, Li Y. (2004). Pharmacological effects of xanthones as cardiovascular protective agents. *Cardiovascular Drug Reviews*, 22, 91-102.

Jutiviboonsuk A., Sardsaengjun C. (2010) Mangiferin in Leaves of three Thai Mango (*Mangifera indica* L.) varieties. *Isan Journal Pharmaceutical Sciences*, 6, 3, pp122-129.

Kahn M., Abert-Vian M., Dangles O., Chemat F. (2009). Ultrasound-assisted extraction polyphenols (flavanone glycoside) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. *Elsevier, Food chemistry*, 119, pp. 851-858.

Kawaii S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K. and Yano M. (1999). Quantitation of Flavonoid Constituents in Citrus Fruits. *Journal agriculture, Food Chemistry*, 47, pp.3565-3571.

Khitma A., Randa A., Amro B. (2018). Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits, *Wiley; Food science and nutrition*, 6, pp. 1214–1219.

Lakhanpal P and Kumar D (2007). Quercetin: A Versatile Flavonoid. *Internet Journal of Medical Update*, 2, pp. 22-37.

Łata B, Trampczynska A, Paczesna J. 2009. Cultivar variation in apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae*, 121, pp.176 - 181.

Li, B., Smith B and Hossain M. (2006). Extracction of phenolics from citrus peels I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48, pp. 182-188.

Loizzo M., Tundis R., Bonesi M., Menichini F., De Luca D., Colica C. and Menichini F. (2012) Evaluation of Citrus aurantifolia peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anti-cholinesterase activities, *Journal Society of Chemical Industry, Food Agriculture*, 92, pp. 2960–2967.

Martínez A., Flavonoides. (2005). Material didáctico. Universidad de Antioquía, Colombia.

Masibo M. and He Q. (2008). Major mango Polyphenols and Their Potential Significance to Human Health. *Institute of Food Technologists*, 7, pp.309-319.

Meyer A, Jepsen S, Sorensen N. (1998). Enzymatic release of antioxidants for human low density lipoprotein from grape pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, pp. 2439-2446.

M'hiri N., Ioannou I., Mihoubi Boudhrioua N., Ghoul M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and Bioproducts processing*, 96, pp. 161-170.

Morales Toledo, L. (2016). Caracterización y análisis de compuestos bioactivos en quelites de la familia Amaranthaceae: Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.

Mortensen A. (2006). Sweeteners permitted in the European Union: safety aspects. *Scandinavian Journal of Food and Nutrition*, 50, pp. 104-116.

Muniglia L., Claisse N., Baudalet P., Ricochon G. (2014). *Enzymatic Aqueous Extraction*. Springer, 8, pp.167-204.

Nascu-Briciu R., Codruta S., Baciú S. (2011). Optimum ultrasound assisted extraction conditions of some flavonoids from green tea leaves. control quality of green tea product by tlc fingerprinting, Taylor&Francis Group, *Analytical Letters*, 44, pp. 2865–2875.

Negi J., Bisht V., Singh P., Rawat. M., Joshi G. (2013). Naturally Ocurring Xanthones: Chemistry and Biology. *Journal of Applied Chemistry*. pp. 1-10.

Nogata Y., Sakamoto K., Shiratsuchi H., Ishii T., Yano M. and Ohta Hidekai. (2006). Flavonoid Composition of Fruit Tissues of Citrus Species, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70, pp.178-192.

Ochoa C., Ayala A. (2004). Los flavonoides: apuntes generales y su aplicación en la industria de alimentos, *Ingenieria y competitividad*, 6, pp. 93-104.

Ojewole, J. (2005). Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic potential effects of *Mangifera indica* Linn (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27, pp. 547-549.

Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura (s.f.). Inocuidad y calidad de los alimentos: especificaciones para aromatizantes. Organización de las Naciones Unidas. <https://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-flav/en/?lang=es>

Ortiz H, A. (2007) Té, Tecnología de Alimentos de la Universidad del Valle, Colombia. pp. 7-18.

Panche A., Diwan A and Chandra S. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 5, pp.1-15.

Pico Y, (2013). Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples, *Analytical Chemistry*, 43, pp. 84-98.

Pinto M., Sousa M., Nascimento M. (2005). Xanthone derivatives: new insights in biological activities, *Current Medicinal Chemistry*, 12, pp. 2517–2538.

Pinelo M, Arnous A, Meyer A. (2006). Upgrading of grape skins: significance of plant cell-wall, structural components and extractions techniques for phenol release. *Food Science & Technology*, 17, pp. 579-590.

Planeación Agrícola Nacional (2017-2030). Mango Mexicano. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257078/Potencial-Mango.pdf>

Puri M., Sharma, D. and Barrow, C.J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in biotechnology*, 30,1, pp. 37–44.

Rieger M. (2006). Introduction to fruit crops. Haworth Food & Agricultural Products Press, New York. pp.157, 168, 169, 177.

Rohn, S., Buchner, N., Driemel, G., Rauser, M., Kroh, L. (2007). Thermal degradation of onion quercetin glucoside under roasting conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, pp.1568-1573.

Rosa M., Tundis R., Bonesi M., Menichini F., De Luca D., Colica C., Menichini F. (2012). Evaluation of *Citrus aurantifolia* peel and leaves extracts for their chemical composition, antioxidant and anticholinesterase activities. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 92, pp. 2960-2967.

Ruiz-Montañez G., Ragazzo-Sánchez J.A., Calderón-Santoyo M., Velázquez-de la Cruz G., Ramírez de León J.A., Navarro-Ocaña A. (2014). Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food Chemistry*, 159, pp. 267-272.

Saha S., Sadhukhan P., Sil P. (2016). Mangiferin: A xanthonoid with multipotent antiinflammatory potential, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 42, pp. 459–474.

Sainz R. (2008). Maceración enzimática de tejidos vegetales. Acción de protopectinasa de *Geotrichum klebahnii* sobre cáscara de pomelo. Tesis de grado. Universidad de Quilmes, Argentina.

Shah K A, Patel M B, Patel R J, Parmar P K. (2010). *Mangifera Indica* (Mango), *Pharmacognosy review*, 4, pp. 42-48.

Shinde S., Chavan A. (2014). Isolation of mangiferin from different varieties of *Mangifera indica* dried leaves. *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 5, pp. 928-934.

Shukla P., Gopalkrishna B., (2012). Isolation of rutin from phyllanthus amarus, *International Journal Pharmaceutical Science and Research*, 3, pp.1198-1201,

Sousa M., Pinto M. (2005). Synthesis of xanthones: an overview, *Current Medicinal Chemistry*, 12, pp.2447–2479.

Stalikas Constantine (2010). Phenolics acid and flavonoids: occurrence and analytical methods. *Free Radicals and Antioxidant Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 5, pp 65-90.

Tang-Bin Zou, En-Qin Xia, Tai-Ping He, Ming-Yuan Huang, Qing Jia and Hua-Wen Li. (2014). Ultrasound-Assisted Extraction of Mangiferin from Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves Using Response Surface Methodology, *Molecules*, 19, pp. 1411-1421

Vieira L., Kijjoa A., (2005). Naturally-occurring xanthones: recent developments. *Current Medicinal Chemistry*, 12, pp. 2413–2446.

Vizkopicova J., Ondrejovic M. and Sturdik E. (2009). The potential and practical applications of acylated flavonoids, *Pharmazie*, 64, pp. 355–360.

Wach A., Pyrzynska K. and Biesaga M. (2005). Quercetin content in some food and herbal samples, Elsevier, *Food Chemistry*, pp. 699-704.

Wall-Medrano A., Olivas-Aguirre F., Velderrain-Rodríguez G., González-Aguilar A., De la Rosa A., López-Díaz J y Álvarez-Parrilla E. (2015). El mango: aspectos agroindustriales, valor nutricional/funcional y efectos en la salud, *Nutrición Hospitalaria*,31, pp. 67-75.

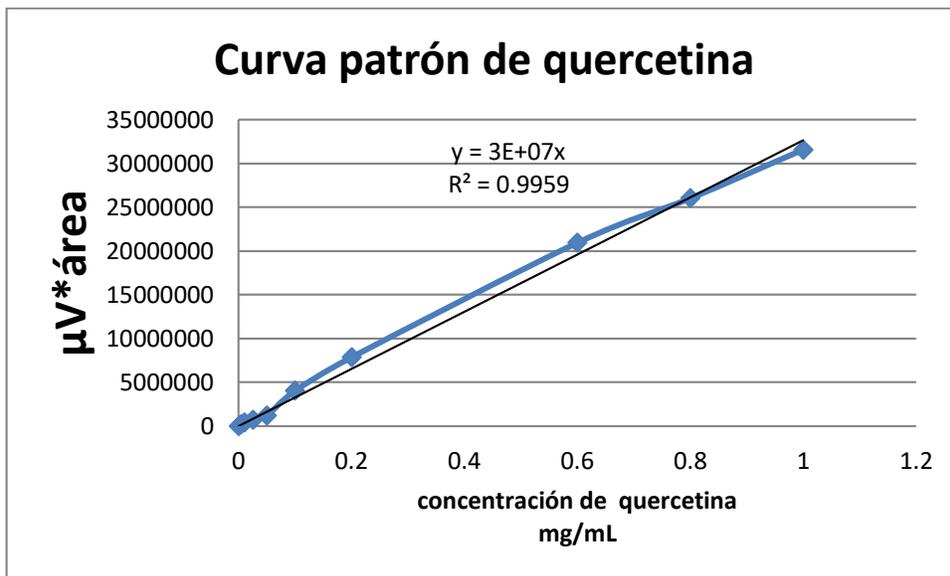
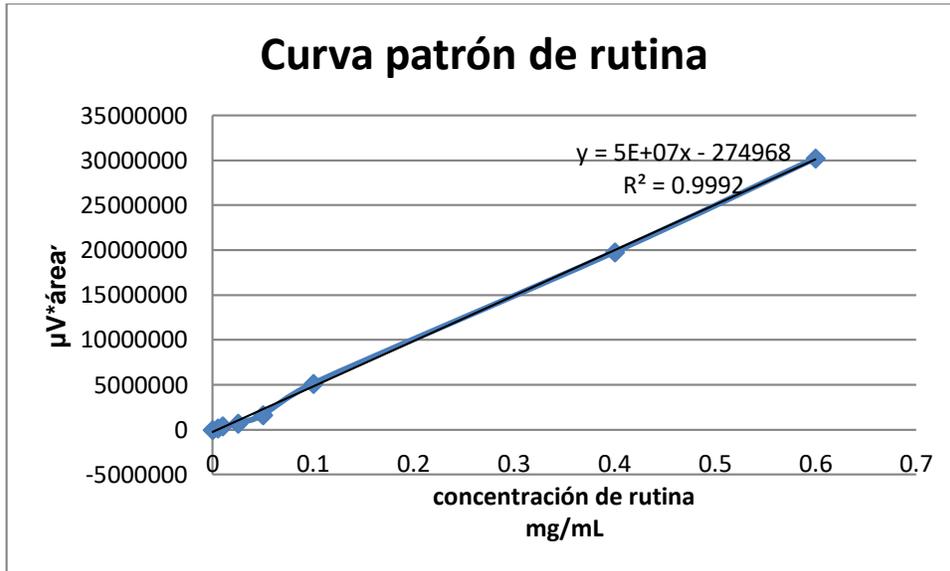
Wolfe K, Wu X, Liu RH. (2003). Antioxidants activity of apple peels. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 51, pp. 609 - 614.

Yáñez X., Lugo L., Parada D. (2007). Estudio del aceite esencial de la cáscara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad Valenciana) cultivada en Labateca (Norte de Santander, Colombia). *Bistua*, 5, pp.3-8.

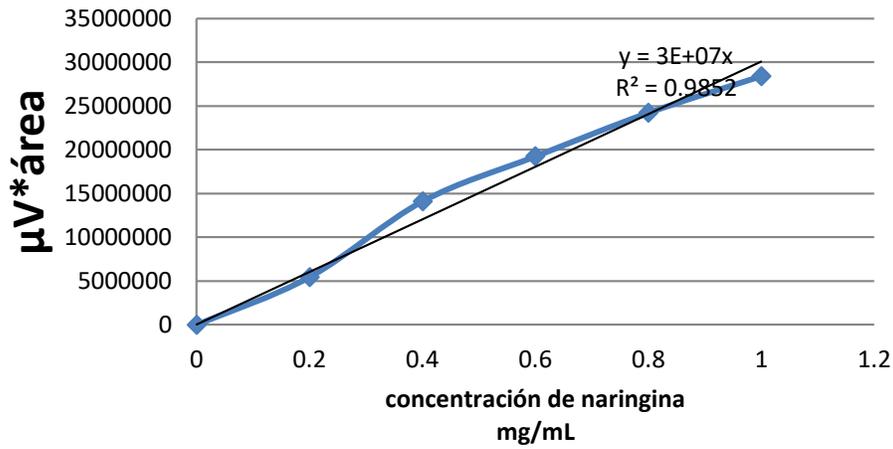
Yusof S., Mohd H and Swee G. (1989). Naringin Content in Local Citrus Fruits. *Elsevier, Food Chemistry*, 37, pp.113-121.

12 ANEXO

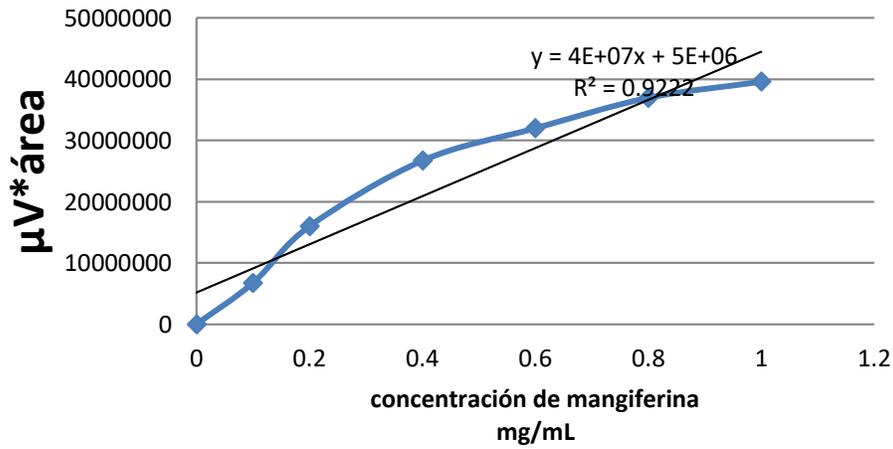
12.1 Curvas de calibración (HPLC)



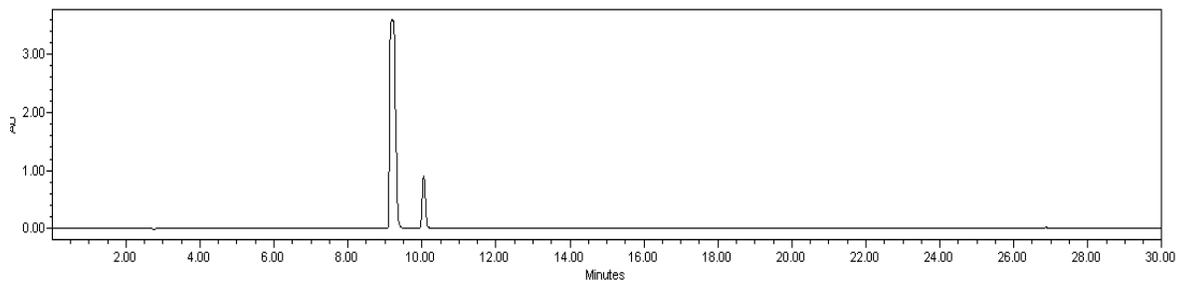
Curva patrón de naringina



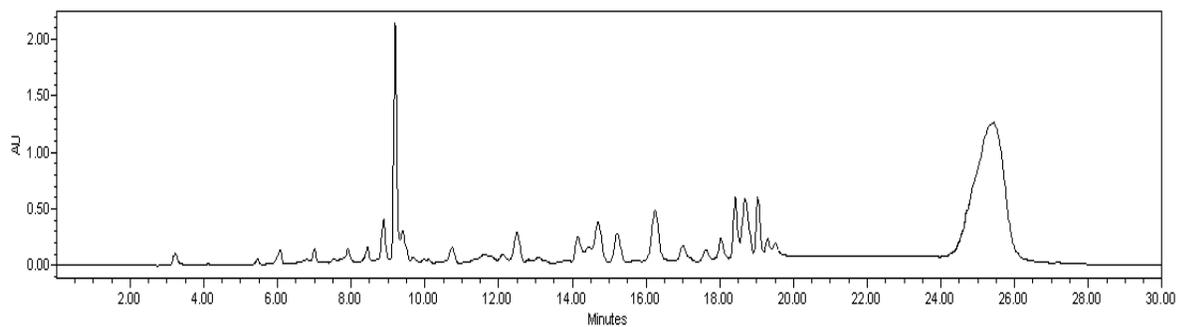
Curva patrón de mangiferina



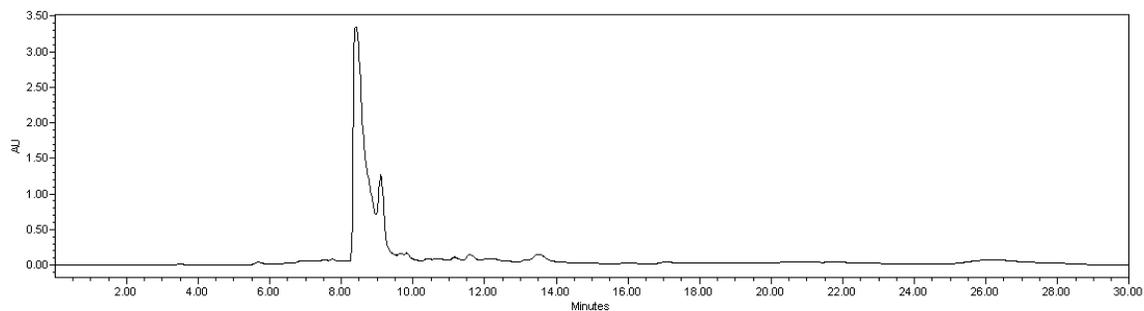
12.2 Cromatogramas obtenidos por HPLC



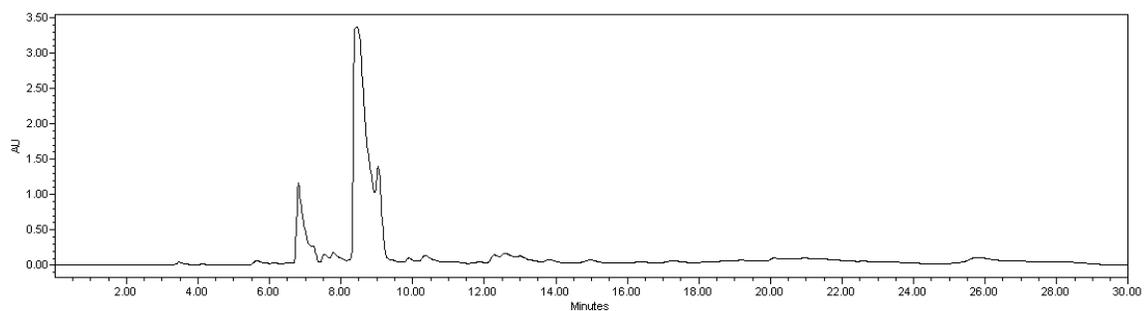
Mangiferina std (tiempo de retención: 9.30±0.07 minutos)



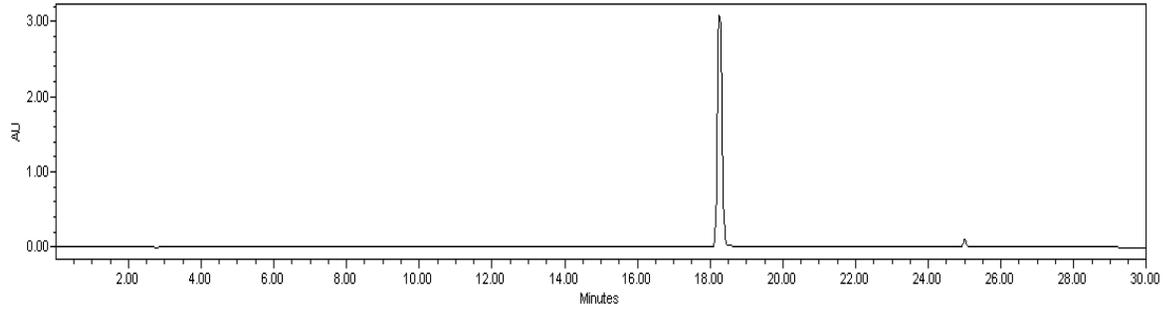
Cáscara de mango



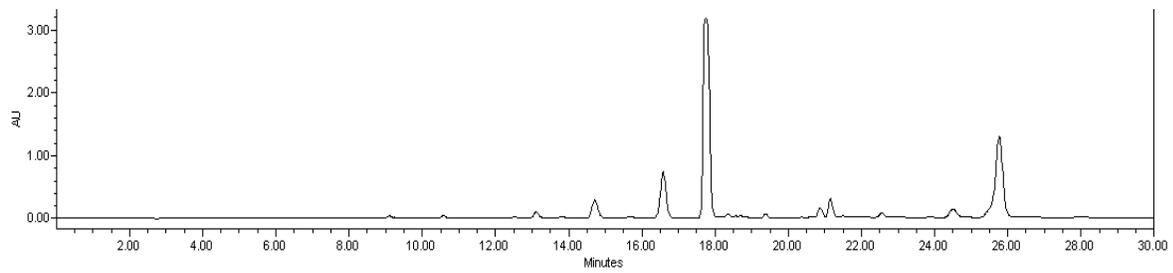
Corteza de árbol de mango



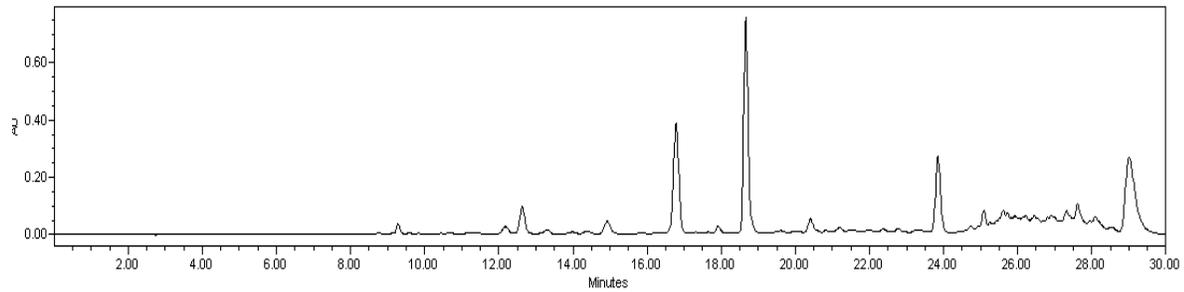
Hoja de árbol de mango



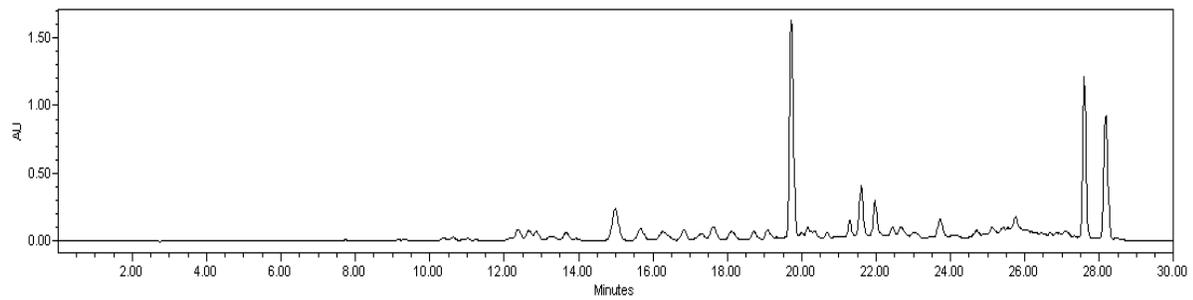
Naringina std (tiempo de retención: 18.26±0.17 minutos)



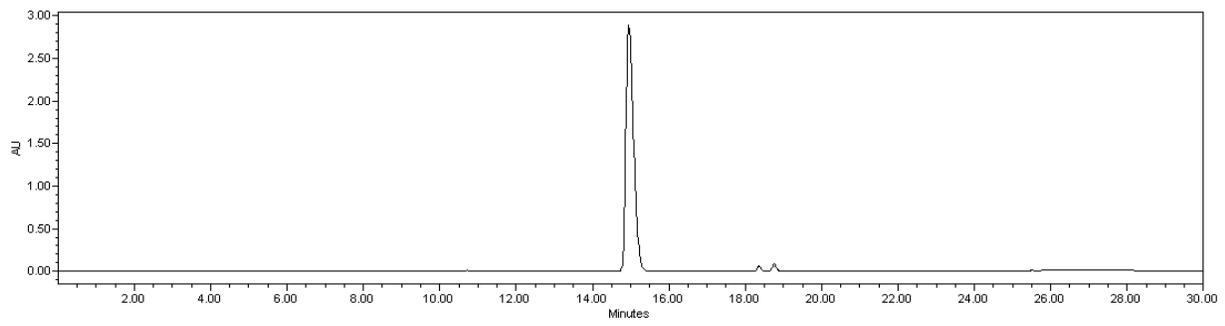
Toronja



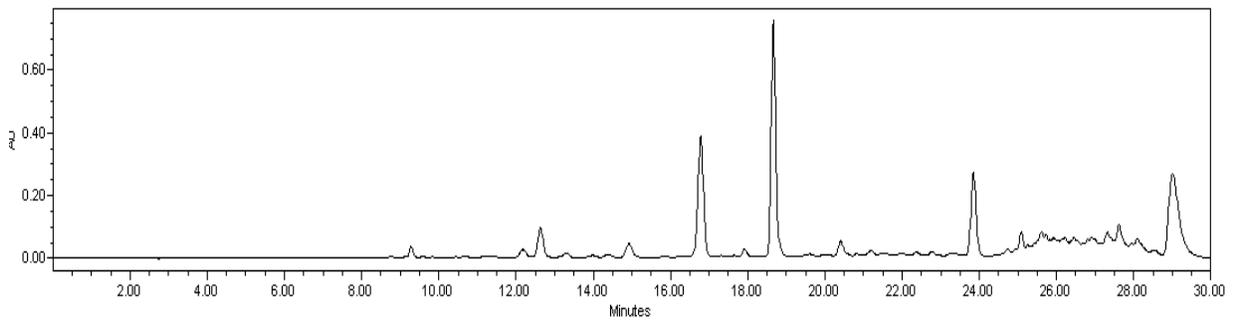
Naranja



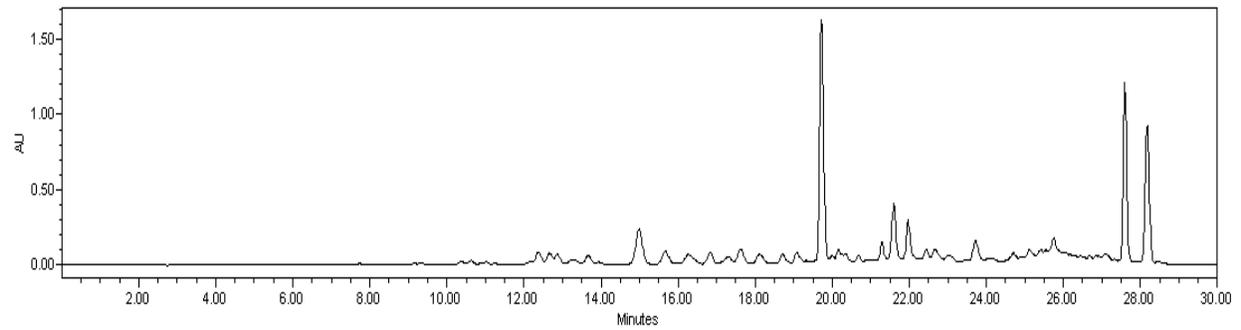
Limón



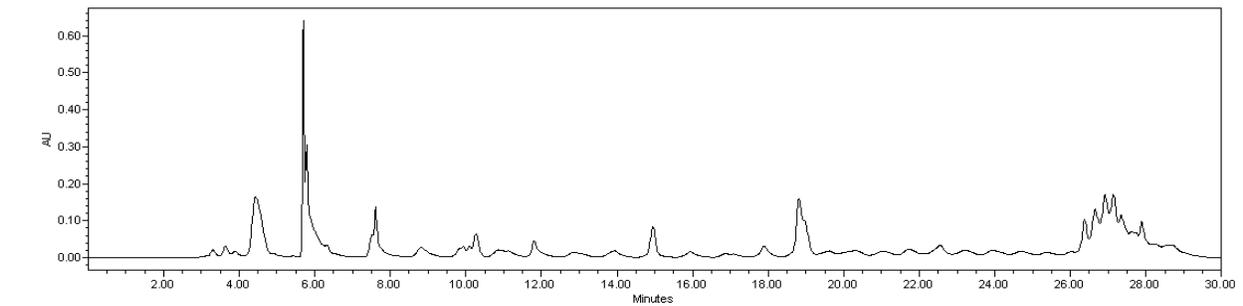
Rutina std (tiempo de retención: 15.69±0.50 minutos)



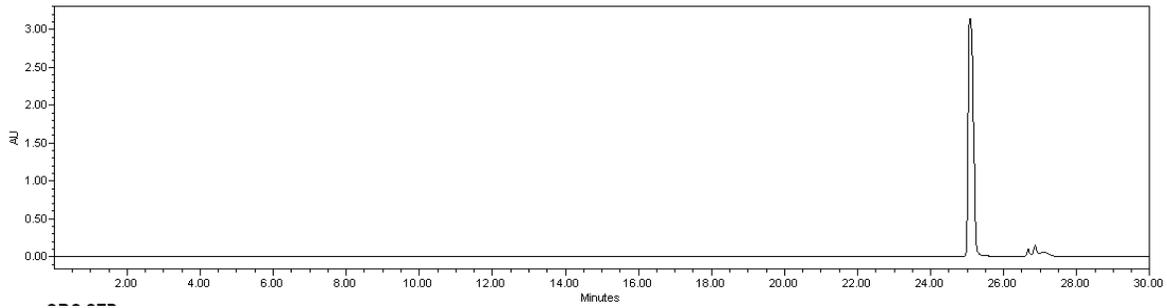
Naranja



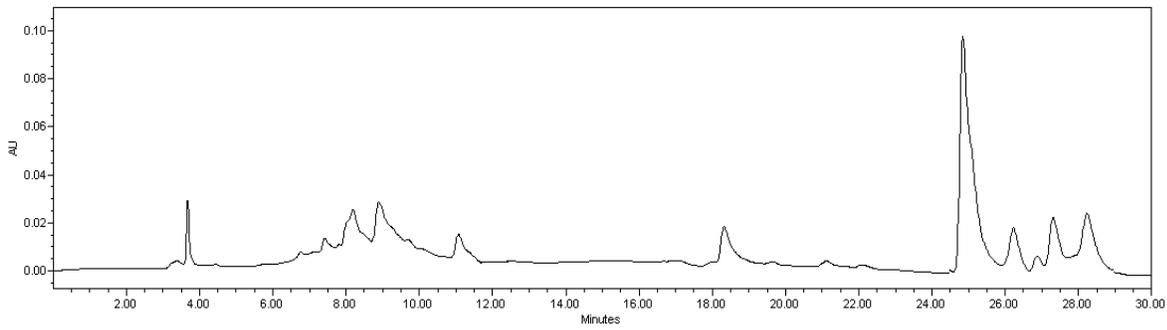
Limon



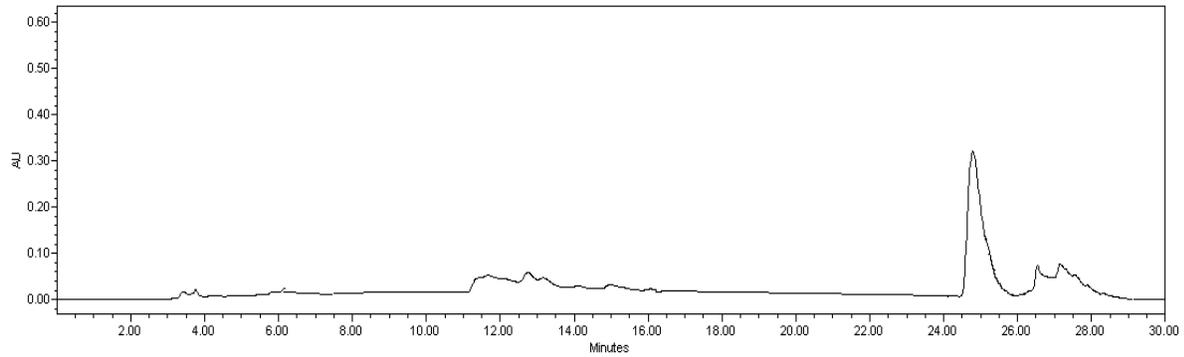
Te



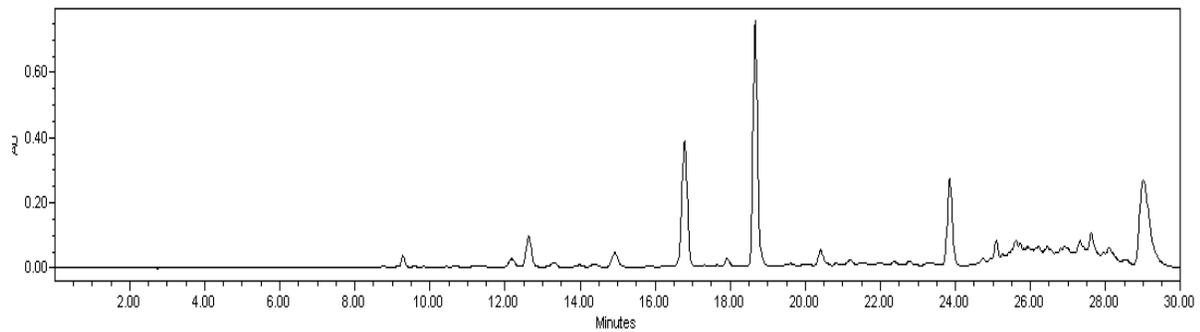
Quercetina std (tiempo de retención: 25.39±0.36 minutos)



Piel de manzana



Piel de cebolla



Cáscara de naranja

12.3 Análisis estadístico

El Análisis de varianza efectuado para este trabajo es de dos factores con una modalidad univariante, puesto que los factores nominales (tipo de muestra y sistema de extracción) muestran una relación con la cantidad de analito a cuantificar siendo esta modalidad univariante la que referencia de la significación estadística con respecto a la cuantificación en la muestra.

También se estableció un nivel de significancia de 5% ($\alpha=0.05$) y con una suma de cuadrados tipo III. Una vez realizado el análisis estadístico y si se encuentra diferencia entre las medias, es decir, que sean menor a 0.05, se realizan las pruebas post hoc, para este trabajo utilizando el método de Duncan. El software estadístico utilizado fue IBM SPSS.

Fenoles totales extracción asistida por ultrasonido

Factores inter-sujetos

		Etiqueta de valor	N
tipo de muestra	1	cáscara de mango Ataulfo	6
	2	corteza de mango Ataulfo	6
	3	hojas de mango Ataulfo	6
	4	cáscara de citrus aur. s (limón)	6
	5	cáscara de citrus sin (naranja d)	6
	6	Albedo cáscara de citrus p (toronja)	6
	7	piel de allium c (cebolla m)	6
	8	piel de malus cv (manzana)	6
	9	camelia sinensis (té negro)	6
sistema de extracción hidroalcohólica	1	etanol:agua (80:20)	27
	2	metanol:agua (80:20)	27

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: mg Ac. tánico/ g m

tipo de muestra	sistema de extracción	Media	Desv.	N
	hidroalcohólica		Desviación	
cáscara de mango Ataulfo	etanol:agua (80:20)	53.6133	2.89611	3
	metanol:agua (80:20)	43.3367	1.96617	3
	Total	48.4750	6.04849	6
corteza de mango Ataulfo	etanol:agua (80:20)	73.6467	3.95611	3
	metanol:agua (80:20)	63.0667	2.64341	3
	Total	68.3567	6.52965	6
hojas de mango Ataulfo	etanol:agua (80:20)	84.6367	2.77698	3
	metanol:agua (80:20)	75.0933	2.62064	3
	Total	79.8650	5.75798	6
cáscara de citrus aur. s (limón)	etanol:agua (80:20)	50.8700	2.04648	3
	metanol:agua (80:20)	43.1667	2.84018	3
	Total	47.0183	4.76490	6
cáscara de citrus sin (naranja d)	etanol:agua (80:20)	58.1067	7.92425	3
	metanol:agua (80:20)	43.0400	2.36112	3
	Total	50.5733	9.76979	6
albedo de citrus p (toronja)	etanol:agua (80:20)	77.3800	2.36835	3
	metanol:agua (80:20)	67.9967	1.78646	3
	Total	72.6883	5.47122	6
piel de allium c (cebolla m)	etanol:agua (80:20)	29.7867	2.58887	3
	metanol:agua (80:20)	22.4267	1.59193	3
	Total	26.1067	4.46603	6
piel de malus cv (manzana)	etanol:agua (80:20)	12.9133	2.88306	3
	metanol:agua (80:20)	7.1633	.98612	3
	Total	10.0383	3.69223	6
camelia sinensi (té negro)	etanol:agua (80:20)	21.5633	1.71343	3
	metanol:agua (80:20)	13.1533	.38682	3
	Total	17.3583	4.73842	6
Total	etanol:agua (80:20)	51.3907	24.60024	27
	metanol:agua (80:20)	42.0493	23.22131	27
	Total	46.7200	24.15847	54

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mg Ac. tánico/ g m

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	30528.072 ^a	9	3392.008	369.052	.000
Intersección	117868.954	1	117868.954	12824.192	.000
Muestra	29350.017	8	3668.752	399.162	.000
Mezcla	1178.054	1	1178.054	128.173	.000
Error	404.410	44	9.191		
Total	148801.435	54			
Total corregido	30932.482	53			

a. R al cuadrado = .987 (R al cuadrado ajustada = .984)

mg Ac. tánico/ g m

Duncan^{a,b}

tipo de muestra	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
piel de malus cv (manzana)	6	10.0383						
camelia sinensis (té negro)	6		17.3583					
piel de allium c (cebolla m)	6			26.1067				
cáscara de citrus aur. s (limón)	6				47.0183			
cáscara de mango Ataulfo	6				48.4750			
cáscara de citrus sin (naranja d)	6				50.5733			
corteza de mango Ataulfo	6					68.3567		
cáscara de citrus p (toronja)	6						72.6883	
hojas de mango Ataulfo	6							79.8650
Sig.		1.000	1.000	1.000	.060	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 9.191.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = .05.

Flavonoides totales extracción asistida por ultrasonido

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: mg de catequina/ g muestra

tipo de muestra	sistema de extracción	Media	Desv.	N
	hidroalcohólica		Desviación	
cáscara de mango Ataulfo	etanol:agua (80:20)	19.4500	2.94257	3
	metanol:agua (80:20)	17.0100	1.80011	3
	Total	18.2300	2.55846	6
corteza de mango Ataulfo	etanol:agua (80:20)	27.0600	2.27297	3
	metanol:agua (80:20)	26.3133	1.45679	3
	Total	26.6867	1.75576	6
hojas de mango Ataulfo	etanol:agua (80:20)	36.6900	2.17771	3
	metanol:agua (80:20)	33.8633	1.34098	3
	Total	35.2767	2.23903	6
cáscara de citrus aur. s (limón)	etanol:agua (80:20)	27.3867	.64081	3
	metanol:agua (80:20)	23.2000	.63506	3
	Total	25.2933	2.36305	6
cáscara de citrus sin (naranja d)	etanol:agua (80:20)	41.2500	.66461	3
	metanol:agua (80:20)	35.3967	2.37675	3
	Total	38.3233	3.56577	6
albedo de citrus p (toronja)	etanol:agua (80:20)	31.8767	2.12632	3
	metanol:agua (80:20)	28.8633	2.34148	3
	Total	30.3700	2.59337	6
piel de allium c (cebolla m)	etanol:agua (80:20)	23.4467	.83560	3
	metanol:agua (80:20)	19.2300	.48384	3
	Total	21.3383	2.38894	6
piel de malus cv (manzana)	etanol:agua (80:20)	8.4200	.70548	3
	metanol:agua (80:20)	5.9900	.94175	3
	Total	7.2050	1.52490	6
camelia sinensis (té negro)	etanol:agua (80:20)	9.8300	.83162	3
	metanol:agua (80:20)	8.3433	.59181	3
	Total	9.0867	1.03913	6
Total	etanol:agua (80:20)	25.0456	10.81339	27
	metanol:agua (80:20)	22.0233	10.05483	27
	Total	23.5344	10.45391	54

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mg de catequina/ g muestra

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	5671.477 ^a	9	630.164	229.941	.000
Intersección	29908.984	1	29908.984	10913.530	.000
Muestra	5548.171	8	693.521	253.060	.000
Mezcla	123.307	1	123.307	44.994	.000
Error	120.584	44	2.741		
Total	35701.045	54			
Total corregido	5792.061	53			

a. R al cuadrado = .979 (R al cuadrado ajustada = .975)

mg de catequina/ g muestra

Duncan^{a,b}

tipo de muestra	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
piel de malus cv (manzana)	6	7.2050						
camelia sinensi (té negro)	6	9.0867						
cáscara de mango Ataulfo	6		18.2300					
piel de allium c (cebolla m)	6			21.3383				
cáscara de citrus aur. s (limón)	6				25.2933			
corteza de mango Ataulfo	6				26.6867			
cáscara de citrus p (toronja)	6					30.3700		
hojas de mango Ataulfo	6						35.2767	
cáscara de citrus sin (naranja d)	6							38.3233
Sig.		.055	1.000	1.000	.152	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 2.741.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = .05.

Extracción asistida por enzimas: fenoles totales

Factores inter-sujetos

		Etiqueta de valor	N
tipo de muestra	1	cáscara de mango Ataulfo	9
	2	corteza de árbol de mango At	9
	3	hoja de mango Ataulfo	9
	4	cáscara de citrus aur (limón m)	9
	5	cáscara de citrus sinensis (naranja dulce)	9
	6	cáscara de citrus par. (toronja)	9
	7	piel de allium cepa (cebolla m)	9
	8	piel de malus (manzana G)	9
	9	camelia sinensi (té negro)	9
extracción ac-enz	1	Control	27
	2	Macerex	27
	3	Novozyme	27

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mg ácido tánico/g muestra

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2653.541 ^a	10	265.354	140.400	.000
Intersección	18394.502	1	18394.502	9732.592	.000
muestra	2090.383	8	261.298	138.254	.000
sistema	563.159	2	281.579	148.985	.000
Error	132.299	70	1.890		
Total	21180.343	81			
Total corregido	2785.841	80			

a. R al cuadrado = .953 (R al cuadrado ajustada = .946)

mg ácido tánico/g muestra

Duncan^{a,b}

tipo de muestra	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
piel de malus (manzana G)	9	6.2344					
camelia sinensi (té negro)	9	7.2833					
piel de allium cepa (cebolla m)	9		13.2044				
corteza de árbol de mango At	9			14.9767			
cáscara de citrus aur (limón m)	9			15.8267			
cáscara de mango Ataulfo	9				17.6611		
cáscara de citrus sinensis (naranja dulce)	9				18.8922	18.8922	
hoja de mango Ataulfo	9					19.5256	
cáscara de citrus par. (toronja)	9						22.0219
Sig.		.110	1.000	.194	.062	.332	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 1.890.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9.000.

b. Alfa = .05.

mg ácido tánico/g muestra

Duncan^{a,b}

extracción ac-enz	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control	27	11.5481		
Novozyme	27		15.7680	
Macerex	27			17.8926
Sig.		1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 1.890.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 27.000.

b. Alfa = .05.

Extracción asistida por enzimas: flavonoides totales

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: mg catequina/g muestra

extracción ac-enz	tipo de muestra	Media	Desv. Desviación	N
control	cáscara de mango Ataulfo	6.0467	.22898	3
	corteza de árbol de mango Ataulfo	9.0133	.34269	3
	hoja de mango Ataulfo	8.2533	.37314	3
	cáscara citrus aur (limón m)	5.0300	.21656	3
	cáscara de citrus sin (naranja d)	6.8167	.39068	3
	albedo de citrus par (toronja)	9.8600	.26514	3
	piel de allium cepa (cebolla morada)	2.8300	.21656	3
	piel de malus (manzana G)	3.2733	.21221	3
	camelia sinensis (té negro)	3.3333	.22679	3
	Total	6.0507	2.53560	27
macerex	cáscara de mango Ataulfo	8.4133	.35360	3
	corteza de árbol de mango Ataulfo	13.3133	.31723	3
	hoja de mango Ataulfo	12.6300	.36290	3
	cáscara citrus aur (limón m)	9.1767	.56889	3
	cáscara de citrus sin (naranja d)	9.2067	.18877	3
	albedo de citrus par (toronja)	15.3300	.47286	3
	piel de allium cepa (cebolla morada)	5.4500	.44508	3
	piel de malus (manzana G)	6.6167	.44276	3
	camelia sinensis (té negro)	6.7433	.19757	3
	Total	9.6533	3.27082	27
novozyme	cáscara de mango Ataulfo	6.9933	.31501	3
	corteza de árbol de mango Ataulfo	12.0200	.31193	3
	hoja de mango Ataulfo	10.8433	.27099	3
	cáscara citrus aur (limón m)	7.3700	.44978	3
	cáscara de citrus sin (naranja d)	8.2033	.22898	3
	albedo de citrus par (toronja)	13.2333	.34210	3
	piel de allium cepa (cebolla morada)	3.5367	.24583	3
	piel de malus (manzana G)	4.7867	.28184	3
	camelia sinensis (té negro)	4.8233	.29280	3
	Total	7.9789	3.29329	27
Total	cáscara de mango Ataulfo	7.1511	1.06461	9

corteza de árbol de mango Ataulfo	11.4489	1.93111	9
hoja de mango Ataulfo	10.5756	1.92822	9
cáscara citrus aur (limón m)	7.1922	1.83984	9
cáscara de citrus sin (naranja d)	8.0756	1.06788	9
albedo de citrus par (toronja)	12.8078	2.41138	9
piel de allium cepa (cebolla morada)	3.9389	1.20600	9
piel de malus (manzana G)	4.8922	1.47724	9
camelia sinensis (té negro)	4.9667	1.49528	9
Total	7.8943	3.35933	81

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mg catequina/g muestra

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	879.962 ^a	10	87.996	269.634	.000
Intersección sistema	5047.945	1	5047.945	15467.655	.000
muestra	175.502	2	87.751	268.882	.000
Error	704.460	8	88.058	269.821	.000
Total	22.845	70	.326		
Total corregido	5950.752	81			
	902.807	80			

a. R al cuadrado = .975 (R al cuadrado ajustada = .971)

mg catequina/g muestra

Duncan^{a,b}

tipo de muestra	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
piel de allium cepa (cebolla morada)	9	3.9389						
piel de malus (manzana G)	9		4.8922					
camelia sinensis (té negro)	9		4.9667					
cáscara de mango Ataulfo	9			7.1511				
cáscara citrus aur (limón m)	9			7.1922				
cáscara de citrus sin (naranja d)	9				8.0756			
hoja de mango Ataulfo	9					10.5756		
corteza de árbol de mango Ataulfo	9						11.4489	
albedo de citrus par (toronja)	9							12.8078
Sig.		1.000	.783	.879	1.000	1.000	1.000	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .326.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9.000.

b. Alfa = .05.

HPLC

mangiferina

Factores inter-sujetos

		Etiqueta de valor	N
sistema extractivo	1	EtOH:Agua	9
	2	MetOH:Agua	9
tipo de muestra	1	casara de mango	6
	2	hoja de mango	6
	3	corteza de mango	6

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: mg mangiferina/g muestra

sistema extractivo	tipo de muestra	Media	Desv. Desviación	N
EtOH:Agua	casara de mango	11.0867	.05859	3
	hoja de mango	8.8467	.72700	3
	corteza de mango	28.8133	.82100	3
	Total	16.2489	9.48902	9
MetOH:Agua	casara de mango	12.0867	.15948	3
	hoja de mango	23.3933	5.30877	3
	corteza de mango	33.8633	.59534	3
	Total	23.1144	9.80313	9
Total	casara de mango	11.5867	.55816	6
	hoja de mango	16.1200	8.65831	6
	corteza de mango	31.3383	2.83939	6
	Total	19.6817	10.00369	18

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mg mangiferina/g muestra

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1496.666 ^a	3	498.889	34.139	.000
Intersección muestra	6972.624	1	6972.624	477.137	.000
Mezcla	1284.554	2	642.277	43.951	.000
Error	212.111	1	212.111	14.515	.002
Total	204.588	14	14.613		
Total corregido	8673.878	18			
	1701.254	17			

a. R al cuadrado = .880 (R al cuadrado ajustada = .854)

mg mangiferina/g muestra

Duncan^{a,b}

tipo de muestra	N	Subconjunto	
		1	2
casara de mango	6	11.5867	
hoja de mango	6	16.1200	
corteza de mango	6		31.3383
Sig.		.059	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 14.613.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = .05.

naringina

Factores inter-sujetos

		Etiqueta de valor	N
sistema extractivo	1	EtOH:Agua	9
	2	MetOH:Agua	9
tipos de muestra	1	cáscara de toronja	6
	2	cáscara de naranja	6
	3	cáscara de limón	6

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: mg NRG/g muestra

		Media	Desv. Desviación	N
sistema extractivo	tipos de muestra			
EtOH:Agua	albedo de toronja	17.20000	.305123	3
	cáscara de naranja	.62333	.051316	3
	cáscara de limón	.02433	.001528	3
	Total	5.94922	8.443486	9
MetOH:Agua	albedo de toronja	14.26667	.448367	3
	cáscara de naranja	.48000	.050000	3
	cáscara de limón	.03033	.001528	3
	Total	4.92567	7.012085	9
Total	albedo de toronja	15.73333	1.642859	6
	cáscara de naranja	.55167	.090646	6
	cáscara de limón	.02733	.003559	6
	Total	5.43744	7.547531	18

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mg NRG/g muestra

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	959.587 ^a	3	319.862	507.627	.000
Intersección	532.184	1	532.184	844.586	.000
Mezcla	4.714	1	4.714	7.482	.016
muestra	954.873	2	477.436	757.699	.000
Error	8.822	14	.630		
Total	1500.593	18			
Total corregido	968.409	17			

a. R al cuadrado = .991 (R al cuadrado ajustada = .989)

mg NRG/g muestra
Duncan^{a,b}

tipos de muestra	N	Subconjunto	
		1	2
cáscara de limón	6	.02733	
cáscara de naranja	6	.55167	
albedo de toronja	6		15.73333
Sig.		.272	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .630.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = .05.

quercetina

Factores inter-sujetos

		Etiqueta de valor	N
sistema extractivo	1	EtOH:Agua	9
	2	MetOH:Agua	9
tipo de muestra	1	piel de manzana	6
	2	piel de cebolla morada	6
	3	cáscara de naranja	6

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: mg QRC/g muestra

		Media	Desv. Desviación	N
sistema extractivo EtOH:Agua	tipo de muestra piel de manzana	.23000	.020000	3
	piel de cebolla morada	1.41667	.032146	3
	cáscara de naranja	.15667	.047258	3
	Total	.60111	.613238	9
MetOH:Agua	tipo de muestra piel de manzana	.19000	.030000	3
	piel de cebolla morada	1.50667	.045092	3
	cáscara de naranja	.19333	.061101	3
	Total	.63000	.658768	9
Total	tipo de muestra piel de manzana	.21000	.031623	6
	piel de cebolla morada	1.46167	.060470	6
	cáscara de naranja	.17500	.052820	6
	Total	.61556	.617588	18

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mg QRC/g muestra

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	6.451 ^a	3	2.150	899.183	.000
Intersección	6.820	1	6.820	2852.190	.000
Mezcla	.004	1	.004	1.571	.231
muestra	6.447	2	3.223	1347.989	.000
Error	.033	14	.002		
Total	13.304	18			
Total corregido	6.484	17			

a. R al cuadrado = .995 (R al cuadrado ajustada = .994)

mg QRC/g muestra
Duncan^{a,b}

tipo de muestra	N	Subconjunto	
		1	2
cáscara de naranja	6	.17500	
piel de manzana	6	.21000	
piel de cebolla morada	6		1.46167
Sig.		.235	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .002.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = .05.

rutina

Factores inter-sujetos

		Etiqueta de valor	N
sistema extractivo	1	EtOH:Agua	9
	2	MetOH:Agua	9
tipo de muestra	1	cáscara de limón	6
	2	te negro	6
	3	cáscara de naranja	6

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: mg RTN/g muestra

sistema extractivo	tipo de muestra	Media	Desv. Desviación	N
EtOH:Agua	cáscara de limón	.1033	.01528	3
	te negro	.1867	.02517	3
	cáscara de naranja	.1333	.03215	3
	Total	.1411	.04256	9
MetOH:Agua	cáscara de limón	.0933	.01528	3
	te negro	.1367	.02887	3
	cáscara de naranja	.1000	.01000	3
	Total	.1100	.02646	9
Total	cáscara de limón	.0983	.01472	6
	te negro	.1617	.03656	6
	cáscara de naranja	.1167	.02805	6
	Total	.1256	.03792	18

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: mg RTN/g muestra

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	.017 ^a	3	.006	10.865	.001
Intersección	.284	1	.284	540.896	.000
Mezcla	.004	1	.004	8.303	.012
muestra	.013	2	.006	12.147	.001
Error	.007	14	.001		
Total	.308	18			
Total corregido	.024	17			

a. R al cuadrado = .700 (R al cuadrado ajustada = .635)

mg RTN/g muestra
Duncan^{a,b}

tipo de muestra	N	Subconjunto	
		1	2
cáscara de limón	6	.0983	
cáscara de naranja	6	.1167	
te negro	6		.1617
Sig.		.187	1.000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = .001.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Alfa = .05.