



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**



**“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE  
CAROTENOIDES, FITOESTEROLES Y POLIFENOLES  
EXTRAÍBLES Y NO EXTRAÍBLES DE EXTRACTOS  
ACUOSOS Y SUBPRODUCTOS DE NARANJA, MANDARINA  
Y TORONJA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LAURA DANIELA RODRÍGUEZ VILLANUEVA**

**DIRIGIDA POR**

**DRA. IZA FERNANDA PÉREZ RAMÍREZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2021.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE  
CAROTENOIDES, FITOESTEROLES Y POLIFENOLES  
EXTRAÍBLES Y NO EXTRAÍBLES DE EXTRACTOS  
ACUOSOS Y SUBPRODUCTOS DE NARANJA, MANDARINA  
Y TORONJA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**LAURA DANIELA RODRÍGUEZ VILLANUEVA**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. IZA FERNANDA PÉREZ RAMÍREZ**

**SINODALES**

**Dra. IZA FERNANDA PÉREZ RAMÍREZ  
DIRECTOR**

**Dra. ROSALÍA REYNOSO CAMACHO  
SINODAL**

**M.I.M. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ  
SINODAL**

**Q.A. ANA MARÍA SOTELO GONZÁLEZ  
SINODAL**

Three horizontal lines with handwritten signatures above them, corresponding to the sinodal members listed on the left.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vii
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Compuestos bioactivos.....	1
1.1.1. Compuestos polifenólicos.....	1
1.1.1.1. Ácidos fenólicos.....	2
1.1.1.1.1. Ácidos hidroxibenzoicos.....	3
1.1.1.1.2. Ácidos hidroxicinámicos.....	3
1.1.1.2. Flavonoides.....	4
1.1.1.2.1. Flavonas.....	5
1.1.1.2.2. Flavanonas.....	5
1.1.1.2.3. Flavanoles.....	6
1.1.1.3. Taninos.....	7
1.1.1.3.1. Taninos condensados.....	7
1.1.1.3.2. Taninos hidrolizables.....	8
1.1.2. Terpenos.....	8
1.1.2.1. Fitoesteroles.....	9
1.1.2.2. Carotenoides.....	10
1.2. Fuentes de compuestos bioactivos.....	10
1.2.1. Cítricos.....	11
1.2.1.1. Producción de cítricos.....	12
1.2.1.2. Toronja.....	13
1.2.1.3. Naranja.....	14
1.2.1.4. Mandarina.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. General.....	17

2.2. Específicos.....	17
3. METODOLOGÍA.....	18
3.1. Material de estudio.....	18
3.2. Métodos.....	18
3.2.1. Obtención de decocciones y subproductos de cítricos.....	18
3.2.2. Extracción de polifenoles extraíbles de los subproductos.....	19
3.2.3. Extracción de polifenoles no extraíbles de los subproductos...	20
3.2.3.1. Extracción de polifenoles hidrolizables.....	20
3.2.3.2. Extracción de proantocianidinas no extraíbles.....	21
3.2.4. Cuantificación e identificación de compuestos bioactivos presentes en las decocciones y en los subproductos de cítricos.....	21
3.2.4.1. Determinación de fenoles totales.....	21
3.2.4.2. Cuantificación de flavonoides totales.....	22
3.2.4.3. Identificación de compuestos polifenólicos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS <sup>E</sup> .....	23
3.2.4.4. Identificación de compuestos polifenólicos poliméricos extraíbles.....	24
3.2.4.5. Determinación del grado de polimerización media de proantocianidinas.....	24
3.2.4.6. Cuantificación de proantocianidinas no extraíbles.....	27
3.2.4.7. Extracción y determinación de carotenoides.....	26
3.2.4.8. Identificación de carotenoides.....	27
3.2.4.9. Extracción y cuantificación de fitoesteroles.....	27
3.2.4.10. Identificación de fitoesteroles.....	28
3.2.5. Análisis estadístico.....	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Cuantificación de compuestos polifenólicos extraíbles de las decocciones y de los subproductos.....	29

4.2. Identificación y cuantificación de compuestos polifenólicos totales y extraíbles de las decocciones y de los subproductos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS <sup>E</sup> .....	30
4.2.1. Flavonoides.....	31
4.2.2. Ácidos fenólicos.....	38
4.3. Identificación de polifenoles poliméricos de los subproductos.....	41
4.3.1. Grado de polimerización media de proantocianidinas.....	41
4.3.2. Caracterización de polifenoles poliméricos por medio de UPLC-ESI-QqQ MS <sup>2</sup> y de MALDI-TOF MS.....	41
4.4. Identificación y cuantificación de polifenoles no extraíbles de los subproductos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS <sup>E</sup> .....	44
4.4.1. Polifenoles hidrolizables.....	44
4.4.2. Proantocianidinas.....	46
4.5. Identificación y cuantificación de carotenoides totales de las decocciones y de los subproductos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS <sup>E</sup> .....	47
4.6. Identificación y cuantificación de fitoesteroles totales de las decocciones y de los subproductos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS <sup>E</sup> .....	48
5. CONCLUSIONES.....	51
6. BIBLIOGRFÍA.....	51

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Contenido de polifenoles totales de varios extractos de toronja con diferentes tratamientos.....	14
2	Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles, carotenoides y fitoesteroles en las decocciones y subproductos de cítricos.....	30
3	Perfil de compuestos polifenólicos de las decocciones de frutos cítricos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS <sup>E</sup> .....	33
4	Perfil de compuestos polifenólicos extraíbles de los subproductos de frutos cítricos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS <sup>E</sup> .....	34
5	Perfil de compuestos polifenólicos hidrolizables de los subproductos de frutos cítricos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS <sup>E</sup> .....	45
6	Perfil de carotenoides y fitoesteroles de los subproductos de cítricos.....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química del ácido gálico (A) y de la quercetina (B), importantes compuestos polifenólicos.....	2
2	Estructura química del ácido protocatéquico (A), ácido vanílico (B) y del ácido gálico (C), ejemplos de los ácidos hidroxibenzoicos.....	3
3	Estructura química del ácido ferúlico (A) y del ácido clorogénico (B), ambos se tratan de ácidos hidroxicinámicos.....	4
4	Estructuras químicas generales de los flavonoides.....	4
5	Estructura química de las flavonas.....	5
6	Estructura química de las flavanonas.....	5
7	Estructura química de los flavonoles.....	6
8	Estructura química de la quercetina (A) y del kaempferol (B), flavonoles más comunes que se encuentran en alimentos como glucósidos.....	6
9	Estructura química de las proantocianidinas.....	7
10	Estructura química del escualeno y sus derivados triterpenos cíclicos.....	9
11	Estructura química del $\beta$ -caroteno.....	10
12	Principales países productores de cítricos.....	12
13	Estructura química de los carotenoides que pueden encontrarse en la naranja, la diferente sustitución de R1 da como resultado diferentes compuestos bioactivos.....	15
14	Espectros de masas de alta resolución a alta (superior) y baja (inferior) energía de colisión de las flavanonas identificadas en las decocciones y subproductos de cítricos: naringina (A), narirutina (B), hesperidina (C) y neohesperidina (D).....	36
15	Espectros de masas de alta resolución a alta (superior) y baja (inferior) energía de colisión de las flavonas identificadas en las decocciones y subproductos de cítricos: roifolina (A) y diosmina (B).....	38

16	Espectros de masas de alta resolución a alta (superior) y baja (inferior) energía de colisión de los ácidos fenólicos identificados en las decocciones y subproductos de cítricos: hexósido de ácido hidroxibenzoico (A), hexósido de ácido dihidroxibenzoico (B) y ácido sinapoilquínico (C).....	40
17	Grado de polimerización media de las proantocianidinas extraíbles de los subproductos de cítricos.....	41
18	Espectro de MALDI-TOF MS de las proantocianidinas extraíbles del subproducto de naranja.....	42
19	Espectro de MALDI-TOF MS de las proantocianidinas extraíbles del subproducto de mandarina.....	43
20	Espectro de MALDI-TOF MS de las proantocianidinas extraíbles del subproducto de toronja.....	43

## RESUMEN

Los cítricos son los frutos con mayor producción a nivel mundial, y son usados para consumo en fresco y para su procesamiento; sin embargo, se genera una gran cantidad de residuos agroindustriales compuestos principalmente de cáscaras y semillas. Se ha reportado que los residuos o subproductos de frutas son ricos en compuestos bioactivos que pueden ayudar a prevenir una serie de padecimientos, y en el caso de los cítricos, sus residuos son ricos en polifenoles y carotenoides. En este proyecto se realizó una caracterización exhaustiva de las decocciones de naranja, mandarina y toronja y de los subproductos obtenidos durante su elaboración. Se realizó la determinación de polifenoles totales, carotenoides y fitoesteroles por medio de métodos espectrofotométricos (UV/VIS) y posteriormente, se realizó la identificación y cuantificación de polifenoles y carotenoides por medio de espectrometría de masas (UPLC-DAD-ESI-QTOF MS<sup>E</sup>). Finalmente, se realizó la identificación de polifenoles poliméricos por medio de espectrometría de masas (MALDI-TOF MS) y se determinó el grado de polimerización media por medio de la reacción de floroglucocinólisis. Los resultados obtenidos demostraron que las decocciones de frutos cítricos se tratan de bebidas ricas en compuestos polifenólicos como hesperidina, naringina y narirutina; por otra parte, no se detectó la presencia de carotenoides y fitoesteroles. Los subproductos de los frutos cítricos presentaron una gran cantidad de flavanonas. Además, los subproductos de naranja y mandarina presentaron alta concentración de violaxantina y  $\beta$ -criptoxantina, mientras que el subproducto de toronja presentó un bajo contenido de estos compuestos. Por otro lado, todos los subproductos de frutos cítricos presentaron  $\beta$ -sitosterol como el fitoesterol mayoritario, seguido por  $\beta$ -campesterol. El grado de polimerización media de los subproductos de los frutos cítricos indicó la presencia de proantocianidinas de bajo peso molecular. Los resultados obtenidos en este proyecto sugieren que las decocciones de los frutos cítricos y los subproductos generados durante su elaboración son fuentes importantes de compuestos bioactivos, por lo que pueden ser utilizados como ingredientes funcionales.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1. Compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son compuestos esenciales y no esenciales que se encuentran en la naturaleza y pueden tener un efecto en la salud humana (Biesalski y col., 2009). El metabolismo de las plantas es el que da lugar a estos compuestos bioactivos que también pueden clasificarse como metabolitos primarios y secundarios; los metabolitos primarios son aquellos que cumplen funciones vitales en las plantas y, en cambio, los metabolitos secundarios no poseen una función definida (Martín, 2018).

En los últimos años se han realizado diferentes estudios para conocer la composición de los alimentos, esto con la finalidad de identificar los compuestos que pueden contribuir en las actividades biológicas ya conocidas o si su ingesta puede prevenir el desarrollo de diversas patologías (Biesalski y col., 2009). Con estos estudios se ha podido elucidar una infinidad de compuestos bioactivos, los cuales pueden ser clasificados en terpenoides (carotenoides y esteroides), compuestos polifenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y taninos) y tioles (Drago y col., 2006).

#### 1.1.1. Compuestos polifenólicos

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios, reciben su nombre debido a que todos derivan del fenol, se caracterizan por tener un anillo aromático central con uno o más grupos hidroxilo (Figura 1) y han demostrado tener actividad antioxidante (Drago y col., 2006); por ello, han sido objeto de estudio como agentes preventivos ante diferentes patologías, ya que la misma acción que ejercen en las plantas como protectores de daños oxidativos, la llevan a cabo en el organismo humano (Chasquibol y col., 2003).

La principal característica de estos compuestos es su acción antioxidante y su bloqueadora contra enzimas específicas que causan inflamación, otra característica que poseen es la de modificar el metabolismo de las prostaglandinas y por ende, evitar que se formen cúmulos de plaquetas (Chasquibol y col., 2003).

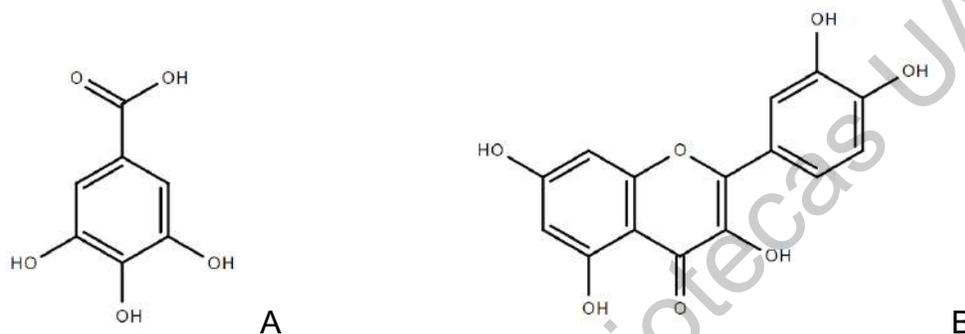


Figura 1. Estructura química del ácido gálico (A) y de la quercetina (B), importantes compuestos polifenólicos (Peñarrieta y col., 2014).

Estos compuestos pueden ser extraíbles (EPP) o no extraíbles (NEPP), los primeros se tratan de compuestos que poseen una mayor biodisponibilidad (Holts y Williamson, 2008). En cambio, los NEPP se tratan de polifenoles simples o de bajo peso molecular que se encuentran unidos a la matriz vegetal, principalmente a fibra dietética (como los polifenoles hidrolizables), así como de polifenoles de alto peso molecular, como proantocianidinas y taninos hidrolizables, que su extracción no puede realizarse con disolventes. Los EPP representan los compuestos que pueden ser absorbidos en el intestino delgado, mientras que los NEPP llegan casi intactos al colon, donde son metabolizados por la microbiota y pueden ser absorbidos (Arranz y col., 2009).

#### 1.1.1.1. Ácidos fenólicos

Peñarrieta y col. (2014) señalan que la presencia de más de un grupo hidroxilo y una mayor separación del grupo carbonilo al anillo aromático aumenta la capacidad antioxidante de este tipo de compuestos.

#### 1.1.1.1.1. Ácidos hidroxibenzoicos

Los ácidos hidroxibenzoicos poseen un grupo carboxílico y uno o más grupos hidroxilo en un anillo aromático (Figura 2), y pueden encontrarse en frutas, verduras y cereales. Este tipo de compuestos han demostrado tener actividad biológica, pues en modelos animales han protegido al hígado frente a diferentes lesiones (Peñarrieta y col., 2014).

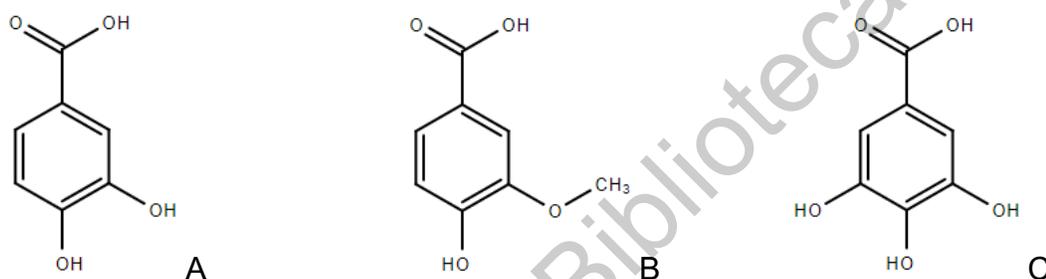


Figura 2. Estructura química del ácido protocatéquico (A), ácido vanílico (B) y del ácido gálico (C), ejemplos de los ácidos hidroxibenzoicos (Peñarrieta y col., 2014).

#### 1.1.1.1.2. Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos se caracterizan por tener un doble enlace (Figura 3), esto hace que aumente su resonancia, es decir, una deslocalización de los electrones en los enlaces  $\pi$  estabilizando los radicales libres, por lo tanto, hace que la capacidad antioxidante de la molécula incremente (Peñarrieta y col., 2014). Además de poseer capacidad antioxidante, estos compuestos han mostrado actividad antígeno tóxica y antiproliferativa en células (Ferguson y col., 2005).

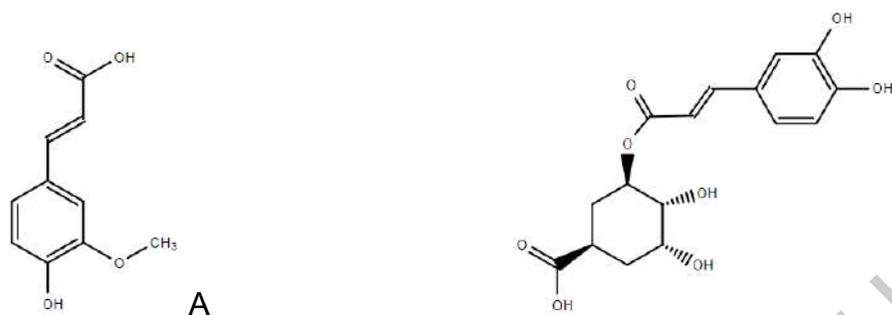


Figura 3. Estructura química del ácido ferúlico (A) y del ácido clorogénico (B) (Peñarrieta y col., 2014).

### 1.1.1.2. Flavonoides

Los flavonoides se tratan de compuestos que poseen una estructura C6-C3-C6 (Figura 4), la cual consiste en dos anillos aromáticos (anillos A y B) unidos por una cadena de tres carbonos, que se encuentra organizada en un heterociclo oxigenado (anillo C) (Fraga y col., 2010). La estructura básica de algunos flavonoides es el esqueleto flavano (Figura 4-A) y para otros la estructura básica es aquella que posee un grupo cetónico en el carbono 4 del anillo C (Figura 4-B) (Leyva y col., 2011).

Estos compuestos son los responsables del color de las flores y frutas, el término proviene del latín “flavus” que significa amarillo pues varios flavonoides purificados poseen este color (Peñarrieta y col., 2014).

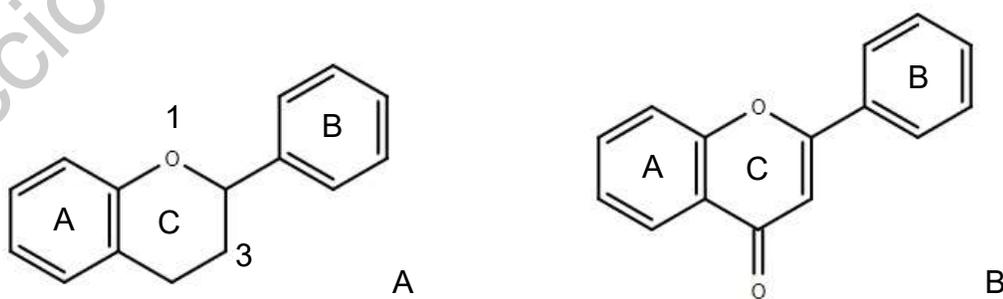


Figura 4. Estructuras químicas de los flavonoides (Leyva y col., 2011).

#### 1.1.1.2.1. Flavonas

Las flavonas son compuestos que poseen una estructura química como la que se muestra en la figura 6-B, poseen un enlace insaturado en las posiciones 2 y 3 del anillo C (Figura 5), este tipo de compuestos se encuentran presentes en los alimentos en forma de compuestos O-glucósidos y C-glucósidos.

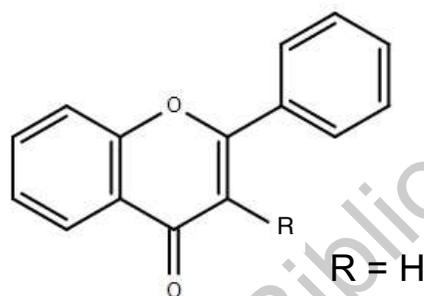


Figura 5. Estructura química de las flavonas (Leyva y col., 2011).

#### 1.1.1.2.2. Flavanonas

Las flavanonas poseen la misma estructura química que los demás flavonoides, sin embargo, se diferencian en que en su anillo C (Figura 4-A) poseen un grupo cetónico en la posición 4 (Figura 6); este tipo de compuestos exhiben actividad antiinflamatoria como efecto terapéutico (Peñarrieta y col., 2014).

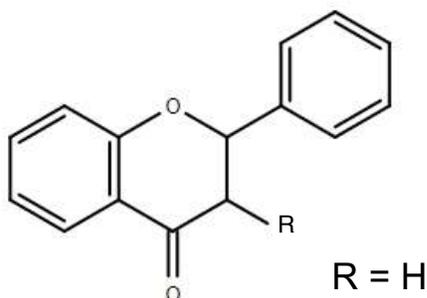


Figura 6. Estructura química de las flavanonas (Leyva y col., 2011).

### 1.1.1.2.3. Flavonoles

Estos compuestos se diferencian de los demás flavonoides por tener un grupo hidroxilo en su carbono 3 del anillo C (Figura 4-B) y en el carbono 4 del mismo anillo, tienen un grupo cetónico y poseen un doble enlace que une a los carbonos 2 y 3 (Figura 7) (Fraga y col., 2010).

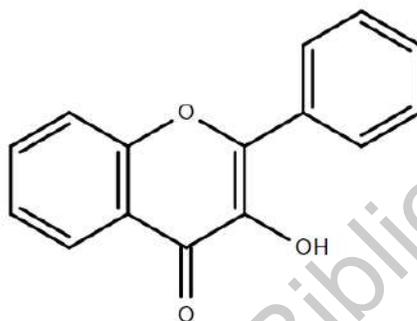


Figura 7. Estructura química de los flavonoles (Fraga y col., 2010).

Este tipo de compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en todos los pigmentos amarillos de las plantas, a pesar de que este es normalmente debido a los carotenoides (Cartaya y Reynaldo, 2001). En cuanto a su actividad biológica, este grupo de compuestos poseen actividad antioxidante, son antiinflamatorios y, además, tienen actividad antígenotóxica y antihiper glucemiante (Peñarrieta y col., 2014).

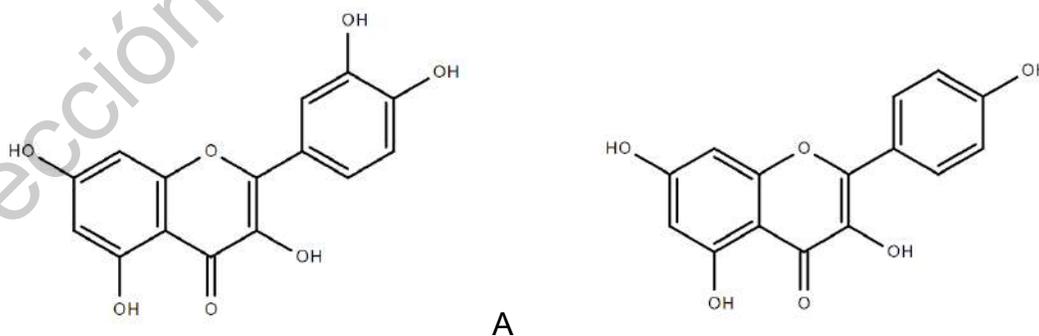


Figura 8. Estructura química de la quercetina (A) y del kaempferol (B), flavonoles más comunes que se encuentran en alimentos como glucósidos (Peñarrieta y col., 2014).

### 1.1.1.3. Taninos

Tomás-Barberán (2003) señala que estos compuestos se tratan de moléculas poliméricas de elevada masa molecular y pueden clasificarse en dos grupos: taninos condensados y taninos hidrolizables. Esta clasificación abarca a diversos compuestos fenólicos que se caracterizan por unirse a las proteínas y precipitar, pueden ser encontrados en hojas, frutos y cortezas (Peñarrieta y col., 2014).

#### 1.1.1.3.1. Taninos condensados

Los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas, son oligómeros de los flavanoles (específicamente de los flavan-3-oles) y sus estructuras químicas (Figura 9) están definidas no sólo por su tipo de monómero, sino también por el tipo de enlaces entre ellos (Fraga y col., 2010).

Se conocen por su actividad astringente en las plantas, así como por ser los compuestos que les brindan el aroma y el color. Se han reportado monómeros y decámeros de estos compuestos en extracciones acuosas; sin embargo, se ha encontrado una mayor cantidad de estos compuestos en los subproductos en forma de taninos no extraíbles (Zurita y col., 2012).

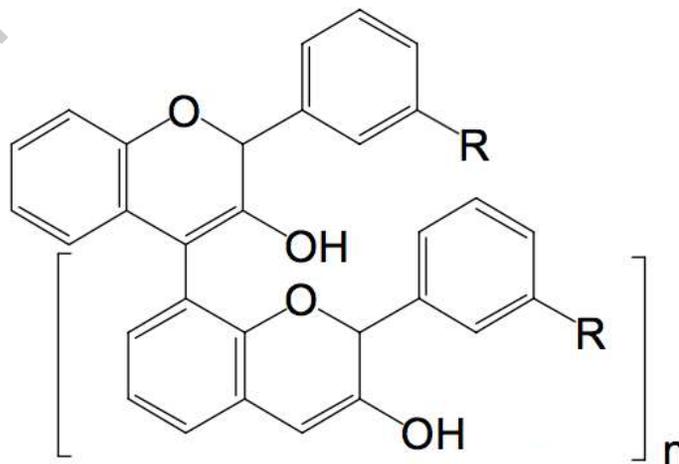


Figura 9. Estructura química de las proantocianidinas (Leyva y col., 2011).

#### 1.1.1.3.2. Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables son polímeros hidrolizados fácilmente por ácidos en sus componentes: un núcleo central constituido por un poliol (generalmente D-glucosa o catequina) y un ácido carboxílico fenólico esterificando parcial o totalmente en la molécula central. Este tipo de compuestos se clasifican de acuerdo con el ácido carboxílico fenólico que presentan, si es ácido gálico se denominan galotaninos y en caso de ser ácido elágico se les llama elagitaninos (Fraga y col., 2010).

La estructura química de los elagitaninos consiste en un núcleo poliol (glucosa) y ésteres del ácido hexahidroxidifénico (HHDP). La razón por la cual se les llama elagitaninos a estos compuestos, se debe a que, en presencia de bases o ácidos, el HHDP espontáneamente se reordena para formar la unidad de ácido elágico. Este compuesto ha demostrado actividad antibacteriana (Peñarrieta y col., 2014) y son los principales compuestos bioactivos asociados a los efectos benéficos de la granada (Sánchez y col., 2005).

Los galotaninos se caracterizan en tener un núcleo de glucosa esterificado con ácido gálico y sus derivados, haciéndolos solubles en agua; estos compuestos han demostrado tener actividad antioxidante y antibacteriana (Peñarrieta y col., 2014).

#### 1.1.2. Terpenos

Este tipo de compuestos constituye el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, la ruta biosintética de la cual se originan da lugar a metabolitos primarios que son importantes para la supervivencia de las plantas como hormonas, carotenoides, plastoquinas, ubiquinonas y esteroides (Ávalos y Pérez-Urria., 2009).

### 1.1.2.1. Fitoesteroles

Los fitoesteroles son triterpenos que se derivan del escualeno, su principal función en las plantas es determinar la viscosidad y estabilidad de las membranas, hay algunos que tienen funciones protectoras como la ecdisona. El escualeno químicamente consiste en una cadena lineal de 30 carbonos que es base para la formación de los triterpenos cíclicos (Figura 10), estos poseen en su estructura química un alcohol (Ávalos y Pérez-Urria., 2009).

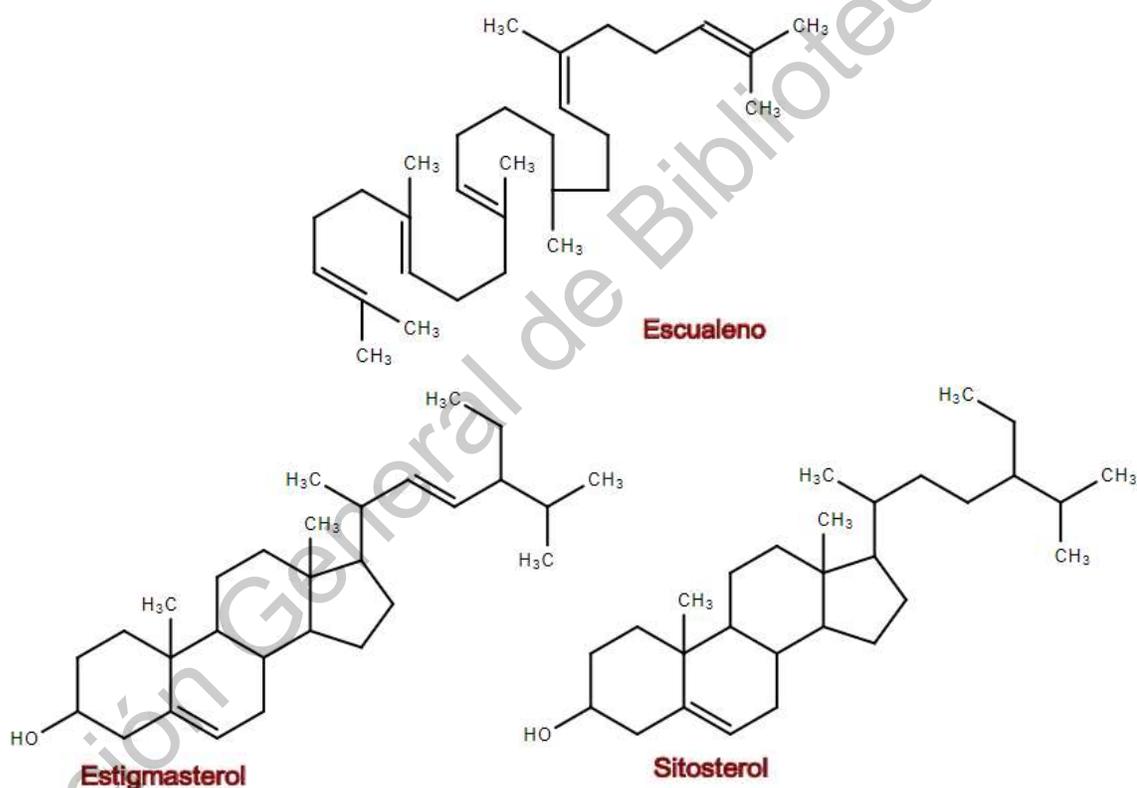


Figura 10. Estructura química del escualeno y sus derivados triterpenos cíclicos (Ávalos y Pérez-Urria., 2009).

### 1.1.2.2. Carotenoides

Los carotenoides son tetraterpenos que poseen actividad antioxidante, este tipo de compuestos están presentes en los pigmentos de color amarillo, naranja y rojo de los vegetales, los más conocidos son el  $\beta$ -caroteno (Figura 11),  $\alpha$ -caroteno, y licopeno (Drago y col., 2006). Estos compuestos han sido identificados como protectores contra la peroxidación de lípidos y ácidos nucleicos, aterogénesis y cáncer (Chasquibol y col., 2003).

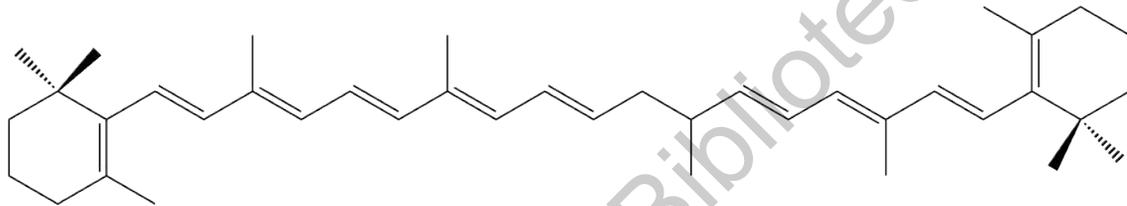


Figura 11. Estructura química del  $\beta$ -caroteno.

### 1.2. Fuentes de compuestos bioactivos

Como se ha mencionado antes, los compuestos bioactivos se encuentran en la naturaleza y los seres humanos podemos tener acceso a los beneficios que estos proporcionan al ingerir productos naturales, pues estos producen polifenoles y carotenoides como metabolitos secundarios y a su vez, estos están involucrados en muchos procesos como el crecimiento, la pigmentación, la resistencia ante patógenos y el estrés ambiental al que se encuentran expuestas las plantas (Fraga y col., 2010).

Favela-Hernández y col. (2016) indican que los productos naturales, como las frutas, son fuentes importantes de compuestos bioactivos y que siempre han sido el principal punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos. Castro-Vazquez y col. (2016) reportan que los residuos de los cítricos representan la mitad del peso de los frutos y estos son generados en grandes cantidades anualmente, los

residuos de los frutos cítricos representan una fuente importante de compuestos bioactivos como ácidos fenólicos y flavonoides; estos compuestos bioactivos se han asociado a varios efectos benéficos para la salud, ya que pueden actuar como cardioprotectores, antitrombóticos, antimicrobianos, anticarcinogénicos y como antialérgicos. Estos efectos son producidos por los compuestos polifenólicos que contienen, pues son ellos los que pueden reducir las especies reactivas de oxígeno (EROS) y las de nitrógeno (ERN) (Castro-Vazquez y col., 2016).

### 1.2.1. Cítricos

La taxonomía de los cítricos indica que pertenecen al orden de las *Geraniales*, a la familia de las *Rutáceas*, y al género *Citrus* el cual está compuesto por plantas de mediano a gran desarrollo, con hojas perennes, flores solitarias o en cimas terminales o axilares, el fruto de este tipo de árboles frutales es una hespéride con número variable de semillas (Beñatena, 1972).

Este tipo de frutos se desarrollan en casi todas las regiones del mundo, la mayoría de ellos provienen de las zonas tropicales y subtropicales de Asia y del archipiélago Malayo. Estos frutos se han cultivado desde hace más de 4000 años (Gmitter, y col., 1990) y desde entonces han sido considerados como las frutas frescas de mayor valor nutritivo (Solleiro y col., 2019).

En los últimos años y tras varios estudios se ha encontrado que los frutos cítricos presentan niveles significativos de compuestos bioactivos de características antioxidantes, como compuestos polifenólicos, flavonoides, ácidos fenólicos y beta-caroteno. Al encontrarse distribuidos en las plantas ofrecen propiedades funcionales y además, proporcionan el color y sabor a muchas de ellas (Cebadera y col., 2017). Los frutos cítricos se caracterizan por tener un alto contenido de naringina, que es un compuesto fenólico con propiedades antiinflamatorias, actividad anticancerígena y actividad antioxidante, además, ha demostrado ser agente hipolipemiante y funciona como un neuroprotector (Castro-Vazquez y col., 2016).

Otro compuesto fenólico que contiene este tipo de frutos es la hesperidina que posee varios efectos benéficos para la salud como propiedades anti-carcinogénicas, actividad antioxidante y actividad antiinflamatoria (Castro-Vazquez y col., 2016).

#### 1.2.1.1. Producción de cítricos

Ordoñez-Gómez y col. (2018) indican que el cultivo de cítricos, es uno de los más comerciales e importantes en el mundo, este incluye naranjas, mandarinas, limones, y toronja, se estima que la producción de estos frutos oscila entre 80 a 115 millones de toneladas métricas por año.

México es uno de los principales países productores de cítricos (Figura 12), pues ocupa el cuarto lugar con aproximadamente 7.5 millones de toneladas, la primera posición la ocupa China con una producción de 29.6 millones de toneladas, seguido por Brasil que anualmente produce 19 millones de toneladas y Estados Unidos con 9.4 millones de toneladas (Cebadera y col., 2017).



Figura 12. Principales países productores de cítricos (Cebadera y col., 2017).

A nivel mundial México ocupa el 5º lugar como país productor de naranja, el 4º como productor de toronja y se posiciona en el 13º lugar como productor de mandarina;

estos frutos son uno de los productos más exportados y tienen como destino principal Estados Unidos, Francia, Holanda, Japón, entre otros países (Solleiro y col., 2019).

Específicamente en México los cítricos tienen un alto consumo, esto puede demostrarse con el crecimiento que ha presentado en la última década la superficie sembrada y cosechada de cítricos que fue de un 7.5% pues pasó de 530,363.7 hectáreas a 569,914.3 hectáreas. El cítrico con mayor cantidad de hectáreas sembradas y cosechadas es la naranja con un 58.9% y 60.5% respectivamente, le sigue la mandarina con 3.8% de hectáreas sembradas y con 4% de hectáreas cosechadas, la toronja por su parte presenta 3.4% de hectáreas sembradas y 3.3% de hectáreas cosechadas (Solleiro y col., 2019).

#### 1.2.1.2. Toronja

La toronja (*Citrus paradisi* Macf.) es una especie de cítrico que tras varios estudios ha demostrado poseer una cantidad importante de compuestos bioactivos, como algunos flavonoides; entre ellos se encuentra la naringina, la isonaringina y la narirutina, así como un alto contenido de ácido ascórbico y carotenoides (Rincón y col., 2005).

Por otro lado, Castro-Vázquez y col. (2016) reportaron que las cáscaras de toronja pueden ser consideradas como una fuente de compuestos fenólicos que pueden ser utilizados como agentes antioxidantes o pueden formar parte de estrategias farmacológicas. Dichos autores reportaron que el tratamiento térmico de las cáscaras de toronja aumenta el contenido de polifenoles totales, lo que contribuye a un aumento de su capacidad antioxidante (Cuadro 1).

Cuadro 1. Contenido de polifenoles totales de varios extractos de toronja con diferentes tratamientos.

Fruto	Contenido de polifenoles totales
	Media $\pm$ DS
Toronja blanca fresca	49.14 $\pm$ 7.91
Toronja rosa fresca	27.95 $\pm$ 0.83
Toronja blanca secada a 45 °C	52.95 $\pm$ 4.83
Toronja rosa secada a 45 °C	42.29 $\pm$ 3.30
Toronja blanca secada a 60 °C	63.35 $\pm$ 0.84
Toronja rosa secada a 60 °C	49.36 $\pm$ 3.57
Toronja blanca secada por congelación	84.60 $\pm$ 10.80
Toronja rosa secada por congelación	66.70 $\pm$ 1.54

Resultado expresados como mg equivalentes de ácido gálico por g de fruto seco (Castro-Vazquez, 2016).

### 1.2.1.3. Naranja

La naranja (*Citrus sinensis*) es una especie de cítrico cuyo cultivo representa el mayor porcentaje de producción anual de cítricos con un 70%, este fruto proviene de Asia y es consumida a nivel mundial principalmente por su alto contenido de vitamina C (Favela-Hernández y col., 2016).

La naranja es considerada como una rica fuente de compuestos bioactivos que le proporcionan los efectos farmacológicos, entre ellos se encuentra una gran variedad de flavonoides y caratenoides como la  $\beta$ -criptoxantina y la luteína (Figura 13) (Favela-Hernández y col., 2016).

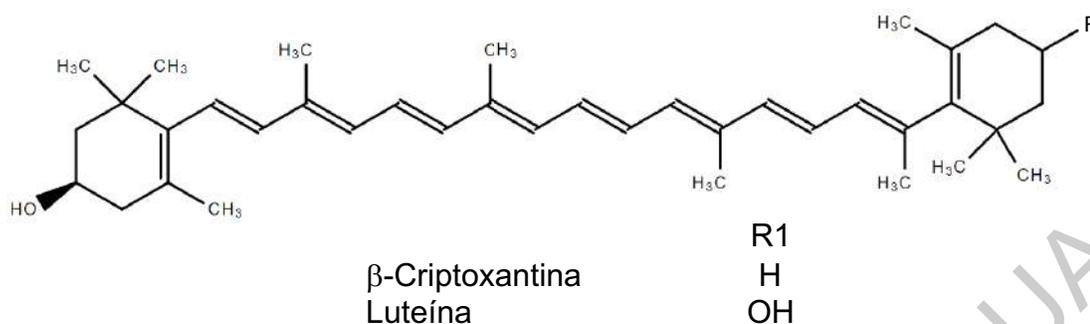


Figura 13. Estructura química de los carotenoides que pueden encontrarse en la naranja, la diferente sustitución de R1 da como resultado diferentes compuestos bioactivos (Favela-Hernández y col., 2016).

El consumo de naranjas ha crecido en los últimos años y esto se debe a su alto contenido de compuestos fenólicos, ya que estos compuestos bioactivos pueden disminuir el riesgo de sufrir alguna enfermedad cardiovascular, así como diabetes, artritis; además, se ha demostrado que pueden prevenir el cáncer debido a su actividad antiinflamatoria y antioxidante (Fallico y col., 2017).

Ben Abdelaali y col. (2018) reportan que esta variedad de cítricos también presenta un alto contenido de carotenoides, siendo que el interés hacia estos compuestos bioactivos deriva de los efectos benéficos que pueden proporcionar a la salud. El principal carotenoide presente en el jugo de naranja es el isómero (9Z)-violaxantina, sin embargo, también pueden encontrarse en menor proporción otros compuestos como la zeaxantina, y la luteína.

#### 1.2.1.4. Mandarina

La mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) forma parte de las frutas con mayor consumo a nivel mundial (Wang y col., 2017); su origen fue en Asia y hoy día puede encontrarse distribuida en todo el mundo, pero principalmente en regiones tropicales y subtropicales como Brasil, Portugal, Grecia, Italia y Egipto (Ferreira y col., 2018). Wang y col. (2017) reportaron que los compuestos fenólicos son los responsables de

la capacidad antioxidante que posee la mandarina, donde la hesperidina es uno de los principales compuestos que participan en tal actividad. Además, pudieron demostrar que los extractos obtenidos de este fruto cítrico mostraron un efecto citotóxico en líneas celulares de tumores gástricos.

La cáscara de la mandarina puede ser reutilizada, por su alto contenido de polifenoles, en la industria cosmética y en la industria farmacéutica. Las cáscaras secas de este cítrico se usan en la medicina tradicional china para el tratamiento de indigestión, asma y bronquitis. En los últimos años y tras varios estudios se ha encontrado que el contenido de flavonoides de la mandarina le proporciona actividad anticancerígena por los mecanismos que estos presentan, como la inhibición de proliferación celular, apoptosis y la supresión génica tumoral (Ferreira y col., 2018).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. General

Identificar y cuantificar por medio de espectrofotometría UV/VIS y espectrometría de masas los carotenoides, los fitoesteroles y los compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles de decocciones de naranja, mandarina y toronja y de los subproductos obtenidos durante su elaboración.

### 2.2. Específicos

- Determinar el contenido de carotenoides, fitoesteroles, compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles de decocciones y subproductos de naranja, mandarina y toronja.
- Identificar y cuantificar los carotenoides, los fitoesteroles y los polifenoles (extraíbles y no extraíbles) de decocciones y subproductos de naranja, mandarina y toronja por medio de espectrofotometría de masas.
- Identificar el perfil y el grado de polimerización media de polifenoles poliméricos de subproductos de naranja, mandarina y toronja.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Material de estudio

Los frutos cítricos fueron donados por agricultores del estado de Veracruz, fueron lavados con agua potable y jabón y una vez secos, se cortaron en rodajas de aproximadamente 1 cm de ancho para colocarlos en charolas de acero inoxidable y secarlos en un horno de circulación forzada a 40 °C durante 24 h. Al término de este proceso, las rodajas fueron molidas y se guardaron en congelación a -20 °C hasta su uso.

#### 3.2. Métodos

##### 3.2.1. Obtención de decocciones y subproductos de cítricos.

Para realizar las decocciones de los frutos cítricos, 10 g de cada fruto seco y molido se colocaron en 500 mL de agua hirviendo (95 °C); al adicionar el fruto se apagó el calentamiento del agua y se dejó reposar 15 minutos. Al término de este tiempo se aforó a 500 mL y se filtró. Las decocciones se almacenaron en congelación a -20 °C y protegidas de la luz hasta su análisis. Cabe señalar que las decocciones son una preparación utilizada para la elaboración de bebidas funcionales.

El residuo de cada decocción se secó a 45 °C en un horno de circulación forzada durante 2 h y al residuo seco se le consideró como el subproducto de la decocción de los frutos cítricos. Los subproductos secos fueron molidos en un procesador de alimentos (Nutribullet) y después se tamizaron en una malla no. 40 (425 µm). Estas muestras se almacenaron en bolsas de plástico con cierre hermético y se almacenaron en congelación a -20 °C y protegidas de la luz hasta su análisis.

### 3.2.2. Extracción de polifenoles extraíbles de los subproductos.

Para la obtención de los polifenoles extraíbles (EPP) se utilizó la metodología descrita por Pérez-Jiménez y col. (2008) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.3 g de cada subproducto, las muestras se colocaron en tubos Falcon protegidos de la luz y a cada tubo se le agregaron 12 mL de una solución de metanol:agua (50:50 v/v) acidificada con HCl para obtener un pH final de 2. Para el análisis del perfil de polifenoles extraíbles por Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Resolución acoplado a un Detector de Arreglo de Diodos y a un Espectrómetro de Masas de Cuadrupolo-Tiempo de vuelo con una interfase de ionización por Electrospray (UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>), se pesaron 0.4 g de cada muestra por triplicado, de igual manera se colocaron en tubos Falcon protegidos de la luz y se les añadió 4 mL de la solución de metanol:agua (50:50 v/v) acidificado. Todos los tubos se incubaron en agitación constante durante 1 h a temperatura ambiente y al término del tiempo señalado, se centrifugaron durante 10 min a 3500 rpm y se recuperó el sobrenadante en otro tubo Falcon.

El residuo se lavó con 12 mL de acetona/agua (70:30 v/v) y en el caso de los tubos de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup> se lavaron con 4 mL de la misma solución. Todos los tubos se agitaron durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se aforó a un volumen final de 30 mL con una solución que contenía el 50% de metanol/agua (50:50 v/v) acidificado y 50% de acetona/agua (70:30 v/v), Los tubos para el análisis de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup> se llevaron a un volumen final de 10 mL con la misma solución.

Los extractos de EPP se utilizaron para realizar la determinación de fenoles y flavonoides totales, así como para el perfil de compuestos polifenólicos correspondientes por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>. Para poder realizar el perfil de EPP, se tomó 1 mL de los extractos de EPP para llevarlos a sequedad en

un concentrador a vacío “Speedvac” de la marca Thermo Fischer durante 48 h. Las muestras se almacenaron en congelación a -20 °C y protegidas de la luz hasta su análisis.

El residuo de la extracción de EPP fue secado a 45 °C en un horno de circulación forzada durante 24 h, este residuo fue empleado para la obtención de NEPP.

### 3.2.3. Extracción de polifenoles no extraíbles de los subproductos.

#### 3.2.3.1. Extracción de polifenoles hidrolizables.

Los polifenoles hidrolizables (HPP) se obtuvieron a partir del residuo seco obtenido en la sección 3.2.2 y con la metodología reportada por Quatrin y col. (2019) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.1 g de cada residuo y se les agregaron 12 mL de agua grado HPLC y 5 mL NaOH 10 M. Se incubaron en agitación constante durante 16 h a temperatura ambiente y el pH de las muestras se ajustó con HCl 6 M a un pH final de 2.0 - 3.0. Al término del tiempo señalado, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 2000 g y se recuperaron los sobrenadantes. El residuo se lavó con 5 mL de agua grado HPLC y se centrifugó de acuerdo con las condiciones mencionadas anteriormente, ambos sobrenadantes se mezclaron y se les consideró como la fracción alcalina de HPP.

Al residuo obtenido se le realizó una hidrólisis ácida, se le agregaron 2.5 mL de HCl, se incubaron durante 30 min a 85 °C y se les ajustó el pH con NaOH 10 M para alcanzar un pH final de 2.0 - 3.0. Se centrifugaron durante 10 min a 2000 g, se recuperaron los sobrenadantes y el residuo obtenido se lavó con 5 mL de agua grado HPLC y después, se centrifugó de acuerdo con las condiciones mencionadas anteriormente. Ambos sobrenadantes se mezclaron y se les consideró como la fracción ácida de HPP.

Se tomó una alícuota de 1 mL de cada extracto de HPP para llevarlos a sequedad en un concentrador a vacío "Speedvac" de la marca Thermo Fischer durante 48 h. Las muestras fueron almacenadas en congelación a -20 °C y protegidas de la luz hasta su análisis.

#### 3.2.3.2. Extracción de proantocianidinas no extraíbles.

Se realizó la extracción de proantocianidinas no extraíbles (NEPA) a partir del residuo obtenido durante la extracción de EPP indicado en la sección 3.2.2 siguiendo la metodología descrita por Zurita y col. (2012) con algunas modificaciones. Se pesaron 0.2 g del residuo seco de cada muestra y se colocaron en tubos de vidrio con rosca, se les agregaron 4 mL de butanol:HCl:FeCl<sub>3</sub> (97.5:2.5:0.07, v/v/m) y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 1 h, agitándolos en intervalos de 10 - 15 min.

Al término del tiempo indicado se sacaron los tubos del baño de agua y se dejaron enfriar, el contenido de cada uno se trasvasó a tubos Falcon protegidos de la luz para después ser centrifugados a 2500 g por 10 min a 25 °C. El sobrenadante se colocó en matraces volumétricos de 10 mL y el residuo de los tubos Falcon se lavó 2 veces con 2 mL de la solución butanol:HCl:FeCl<sub>3</sub> y se centrifugaron de acuerdo con las condiciones mencionadas anteriormente. Al finalizar los 3 sobrenadantes se juntaron y se aforaron con la solución de butanol:HCl:FeCl<sub>3</sub>. Las muestras se almacenaron a -20 °C y protegidas de la luz hasta su análisis.

#### 3.2.4. Cuantificación e identificación de compuestos bioactivos presentes en las decocciones y en los subproductos de cítricos.

##### 3.2.4.1. Determinación de fenoles totales.

El contenido de fenoles totales se determinó con el método de Folin y Ciocalteu (Singleton y col., 1999). Para llevar a cabo la metodología, se tomó una alícuota de 6 µL de las decocciones obtenidas en la sección 3.2.1, 8 µL de los extractos

obtenidos en el punto 3.2.2 y 2  $\mu\text{L}$  de los extractos obtenidos en el punto 3.2.3.1. Se completó el volumen de las alícuotas a 25  $\mu\text{L}$  con agua grado HPLC, después se les agregaron 12.5  $\mu\text{L}$  del reactivo de Folin Ciocalteu 1 N y la microplaca se puso en agitación durante 5 min. Al término del tiempo señalado se agregaron 62.5  $\mu\text{L}$  de carbonato de sodio al 20%, las muestras se dejaron reposar durante 30 min en la oscuridad y al término del tiempo se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 765 nm con un espectrofotómetro de la marca Multiskan GO. La cuantificación se realizó con una curva de calibración de una solución del estándar de ácido gálico. Los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico/g para los subproductos y como  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico/mL para las decocciones.

#### 3.2.4.2. Cuantificación de flavonoides totales.

Para la determinación de flavonoides totales se empleó el método de Oomah y col. (2005). Se tomó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de las decocciones obtenidas en la sección 3.2.1 y 50  $\mu\text{L}$  de los extractos de EPP obtenidos en la sección 3.2.2. Las alícuotas fueron colocadas en una microplaca de 96 pocillos junto con 180  $\mu\text{L}$  de agua grado HPLC y 20  $\mu\text{L}$  de una solución metanólica de 10 g/L de 2-aminoetildifenilborato.

Para la cuantificación de flavonoides totales se preparó una solución del estándar de rutina a una concentración de 1 mg/mL para realizar una curva de calibración de rutina de 0 a 56  $\mu\text{g/mL}$ . El volumen de cada punto de la curva se completó a 230  $\mu\text{L}$  con agua grado HPLC y se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de la solución metanólica de 2-aminoetildifenilborato. La curva y las muestras fueron leídas a una longitud de onda de 404 nm con un espectrofotómetro de marca Multiskan GO. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de rutina/g para los extractos de los subproductos y como mg equivalentes de rutina/mL para las decocciones.

### 3.2.4.3. Identificación de compuestos polifenólicos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>.

Las decocciones se filtraron (0.45  $\mu\text{m}$ ) para ser analizadas, mientras que, los extractos concentrados de EPP y HPP (ácidos y alcalinos) se resuspendieron en 200  $\mu\text{L}$  de metanol y se agitaron en un vórtex durante 1 min. Después se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min a 4°C. Todas las muestras se colocaron en viales de cromatografía utilizando insertos de 250  $\mu\text{L}$  y se almacenaron a -20 °C y protegidos de la luz hasta su análisis.

El perfil de compuestos polifenólicos extraíbles de las decocciones y los extractos de los residuos de las mismas fue analizado en un UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup> a presión atmosférica. Las muestras se mantuvieron a 10 °C en el automuestreador y se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  de cada una en una columna BEH Acquity C18 (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) a 35 °C. La fase móvil consistió en (A) agua con 0.1% de ácido fórmico y (B) acetonitrilo a un flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones de los gradientes fueron las siguientes: 0% B a los 0 min, 15% B a los 2.5 min, 21% B a los 10 min, 90% B a los 12 min y 95% B a los 13 min, seguido de una re-equilibración del sistema (0% B a los 15 min durante 2 min), con un tiempo total de corrida de 17 min. Las condiciones del espectrómetro de masas fueron las siguientes: adquisición de datos en modo de ionización negativa (ESI-) en un rango de masas de 100 a 1200 Da; voltaje del capilar: 2 kV; voltaje del cono: 40 eV; energía de baja colisión: 6 V; energía de alta colisión: 15 - 45 V; temperatura de la fuente: 120 °C; gas de desolvatación: N<sup>2</sup> a 450 °C y 800 L/h; flujo del gas de cono: 50 L/h. Se realizó la corrección de masas con leucina encefalina (50 pg/mL) a 10  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Con respecto al DAD, se realizó el monitoreo de las absorbancias a 214, 280, 320 y 360 nm.

La identificación de los compuestos se realizó por medio del análisis de su masa exacta (error de masas <5 ppm), distribución isotópica y patrón de fragmentación en el software Unifi (Waters Co.). La cuantificación de los polifenoles se realizó por

medio de la construcción de curvas de calibrado con ácido elágico (ácidos hidroxicinámicos y elagitaninos), ácido gálico (ácidos hidroxibenzoicos y galotaninos), (-)-epicatequina (flavanoles), hesperidina (flavanonas) y rutina (flavonoles).

#### 3.2.4.4. Identificación de compuestos polifenólicos poliméricos extraíbles.

Se tomó una alícuota de 4 mL del extracto de EPP obtenido en la sección 3.2.2 y se llevó a sequedad en un concentrador a vacío. Posteriormente, se resuspendió la muestra en 200  $\mu$ L de acetona:agua 70:30 (v/v) y se mezcló con 200  $\mu$ L de agua con 1% de ácido trifluoroacético, 10 mg/mL de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y 1 mg/mL de cloruro de sodio.

El perfil de proantocianidinas se realizó por medio del equipo de Ionización/Desorción por Láser Asistida por Matriz (MALDI) acoplada a un Espectrómetro de Masas de Tiempo de Vuelo (TOF MS), aplicándose las condiciones siguientes: modo de adquisición: reflector; polaridad de voltaje: positiva; voltaje de aceleración: 20 kV; voltaje de reflector: 21 kV; número de disparos: 200 (Bruker microflex).

#### 3.2.4.5. Determinación del grado de polimerización media de proantocianidinas.

Para determinar el grado de polimerización media de proantocianidinas se realizó la metodología descrita por Kennedy y colaboradores (2001) con algunas modificaciones. Se tomaron 50 mg de cada subproducto de cítricos (sección 3.2.1) y se adicionó 1 mL de una solución de acetona:agua:ácido acético (70:28:2 v/v/v). Se sometieron durante 1 min al Ultraturrox y se aplicaron ciclos de ultrasonido de 15 s con 45 s de reposo en 3 ocasiones. Se centrifugaron por 10 min a 10000 rpm a 4 °C, el sobrenadante de cada muestra se colocó en tubos Falcon y se tomó una alícuota de 2.5 mL de cada muestra para llevarse a sequedad en un concentrador "CentriVap" de la marca Labconco.

Al extracto concentrado de cada muestra se le adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de metanol que contenía HCl 0.1 N, 50 mg/mL floroglucinol y 10 mg/mL de ácido ascórbico para incubarse por 20 min a 50 °C. Para detener la reacción las muestras se colocaron en hielo y se llevaron 1 mL con acetato sódico 40 mM. Se centrifugaron por 10 min a 2500 g y el sobrenadante recuperado se filtró (0.45  $\mu\text{m}$ ).

Se inyectó 1 mL de cada muestra en una columna BEH Acquity (2.1 x 50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) a 40 °C en un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Resolución acoplado a un Espectrómetro de Masas de Triple Cuadrupolo con una interfase de Ionización por Electro spray (UPLC-ESI-QqQ MS<sup>2</sup>). La fase móvil fue (A) agua con 2.5% de ácido acético y (B) acetonitrilo a un flujo de 0.5 mL/min. Las condiciones de los gradientes fueron: 3% B a los 0 min, 9% B a los 0.34 min, 16% B a los 1.02 min, 50% B a los 3.06 min, 3% B a los 3.54 min y 3% B a los 4 min. Las condiciones del Espectrómetro de Masas fueron las siguientes: adquisición de datos en modo de ionización negativa (ESI-) en un rango de masas de 100 a 1100 Da; voltaje capilar: 2.5 kV; voltaje del cono: 30 V; energía de baja colisión: 5 V; energía de alta colisión: 15 - 45 V; temperatura de la fuente: 150 °C; temperatura de desolvatación: 300 °C, caudal de gas cónico: 150 L/h; flujo de gas de desolvatación: 500 L/h; flujo de gas de colisión: 0.13 mL/min; flujo de gas del nebulizador: 7.0 bares.

Los monómeros de flavan-3-oles y sus aductos se cuantificaron en comparación con la curva de calibración de (+)-catequina con sus correspondientes factores de respuesta. El grado de polimerización media de proantocianidinas se determinó conforme a lo reportado por Kennedy y colaboradores (2001).

#### 3.2.4.6. Cuantificación de proantocianidinas no extraíbles.

De cada muestra obtenida en el punto 3.2.3.2 se tomó una alícuota de 300  $\mu\text{L}$  y se colocó en una microplaca de fondo plano. La absorbancia de las muestras se leyó a

2 longitudes de onda diferentes, la primera longitud de onda fue de 450 nm para identificar el contenido de los compuestos de xantilio y a 555 nm, para identificar el contenido de monómeros de antocianidina. Las diferencias de los resultados obtenidos a ambas longitudes de onda se interpolaron con la curva de calibración de Zurita y col. (2012), y se expresaron como mg equivalentes de proantocianidinas/g de subproducto.

#### 3.2.4.7. Extracción y determinación de carotenoides.

La determinación de carotenoides se realizó de acuerdo con la metodología reportada por Olives y col. (2006) con algunas modificaciones. Se realizaron los extractos con 250 µg del subproducto obtenido en el punto 3.2.1. y para las decocciones se tomaron 250 µL de cada una. Se agregaron 10 mL de una solución de extracción de hexano:acetona:etanol (50:25:25: v/v/v) a cada muestra y se agitaron durante 30 min. Después, se les añadió 15 mL de agua destilada, se dejaron reposar hasta la separación de fases, se centrifugaron por 10 min a 4000 g y se recuperó la fase orgánica (fase superior) y se colocó en tubos Falcon protegidos de la luz. La fase acuosa se lavó 3 veces con 10 mL de la solución de extracción y se mezclaron las fases orgánicas para ser analizadas posteriormente.

Los extractos fueron analizados a una longitud de onda de 446 nm en un espectrofotómetro con celda de cuarzo. La concentración de β-caroteno se calculó de acuerdo con la ley de Lambert-Beer con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de } \beta - \text{caroteno} = \frac{(ABS)(PM)(\text{factor de dilución})}{(\epsilon)(\text{distancia})}$$

Dónde:

ABS= Absorbancia de 446 nm

PM= Peso molecular (536.8726 g/mol)

ε= Coeficiente de extinción molar para β-caroteno en hexano (139200 L/mol\*cm)

Distancia= 1 cm

Los resultados se expresaron como mg equivalentes de  $\beta$ -caroteno/g para los extractos de los subproductos y como  $\mu$ g equivalentes de  $\beta$ -caroteno/mL para los extractos de las decocciones.

#### 3.2.4.8. Identificación de carotenoides.

Se tomó una alícuota de 2 mL del extracto de carotenoides obtenido en la sección 3.2.5.7, el cual se llevó a sequedad y se resuspendió en 200  $\mu$ L de metanol. Cada muestra fue filtrada (0.45  $\mu$ m) para su análisis por medio del sistema de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup> (Reynoso-Camacho y col., 2021). Las muestras (5  $\mu$ L) se inyectaron en una columna Acquity BEH C8 (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu$ m) a 35 °C. La fase móvil consistió en (A) acetonitrilo:metanol 70:30 (v/v) y (B) agua a un flujo de 0.4 mL/min. Las condiciones de gradiente fueron: 20% B a los 0 min, 20% B a los 2 min, 0% B a los 7 min, 0% B a los 11.6 min, 20% B a los 12.6 min, 0% B a los 14.6 min.

Con respecto al DAD, se realizó el monitoreo de las absorbancias a 330 y a 450 nm y se realizó la cuantificación de los carotenoides por medio de la construcción de una curva de calibrado con  $\beta$ -caroteno. Las condiciones del QToF MS<sup>E</sup> fueron las descritas en la sección 3.2.5.3 pero en modo de ionización positiva con un voltaje de capilar de 3.5 kV. Los resultados se expresaron como  $\mu$ g/g para los subproductos y como  $\mu$ g/mL para las decocciones.

#### 3.2.4.9. Extracción y cuantificación de fitoesteroles.

Se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción enzimática del  $\beta$ -sitosterol descrito por Prado y colaboradores (2013) con algunas modificaciones. La preparación de las muestras consistió en pesar 50 mg del subproducto obtenido en el punto 3.2.1 y para las decocciones se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L. Las muestras

se sometieron a un proceso de saponificación al añadir 5 mL de hidróxido de potasio metánolico 0.5 M y se incubaron durante 1 h en un baño de agua a 80 °C. Al término del tiempo indicado, se les agregó 1 mL de agua HPLC y 2 mL de hexano y se centrifugaron por 5 min a 2800 g. Se tomaron alícuotas de 600 µL de la fase acuosa (sobrenadante) de cada tubo, se colocaron en microtubos y fueron llevados a sequedad en un concentrador a vacío durante 48 h.

Se agregaron 40 µL de isopropanol a cada extracto concentrado de fitoesteroles y se mezclaron con un vórtex. Después se le añadieron 300 µL de reactivo enzimático de colesterol (Colesterol-LQ, Spinreact) a cada muestra y se incubaron a 35°C durante 15 minutos. Al término del tiempo de incubación, se tomaron 300 µL de cada muestra y se colocaron en una microplaca de fondo plano para medir la absorbancia a una longitud de onda de 500 nm. Se realizó una curva de calibración con β-sitosterol y los resultados se expresaron como mg equivalentes de β-sitosterol/g para los extractos de los subproductos y como µg equivalentes de β-sitosterol/mL para los extractos de las decocciones.

#### 3.2.4.10. Identificación de fitoesteroles.

La identificación de los fitoesteroles se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Reynoso-Camacho y colaboradores (2021). El extracto concentrado de fitoesteroles se disolvió en 200 µL de isopropanol y se filtró (0.45 µm) para ser analizado por medio del sistema de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>. Las muestras (2 µL) se inyectaron en una columna BEH C8 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm) a 35 °C. La fase móvil consistió en (A) agua y (B) metanol a un flujo de 0.3 mL/min. Las condiciones de gradiente fueron: 90% B a los 0 min, 100% B a los 5.5 min, 100% B a los 7 min, 90% B a los 9 min, 90% B a los 10 min.

El monitoreo de las absorbancias se realizó a 250 y a 254 nm y la cuantificación de los fitoesteroles se realizó con una curva de calibración con el estándar de β-

sitosterol. Las condiciones del QTOF MS<sup>E</sup> fueron las descritas en la sección 3.2.5.8. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g/g}$  para los subproductos y como  $\mu\text{g/mL}$  para las decocciones.

### 3.2.5. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar de tres réplicas independientes. El análisis estadístico se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95% seguido de una prueba de Tukey. Los datos se analizaron en el paquete estadístico JMP.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Cuantificación de compuestos polifenólicos extraíbles de las decocciones y de los subproductos.

Durante el desarrollo de este proyecto se realizó la cuantificación de compuestos polifenólicos extraíbles de las decocciones y de los subproductos de los frutos cítricos por medio de espectrofotometría de UV/VIS. Los resultados obtenidos se presentan en el Cuadro 2, donde se muestra el contenido de compuestos bioactivos totales de cada una de las decocciones de los frutos cítricos evaluados y de los subproductos correspondientes. Los resultados muestran que la decocción de mandarina presentó el mayor contenido de fenoles y flavonoides totales con  $381.60 \pm 18.23 \mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico (EAG)/mL y  $32.13 \pm 1.38 \mu\text{g}$  equivalentes de rutina (ER)/mL respectivamente. Así mismo, el subproducto de mandarina presentó el contenido más alto de polifenoles hidrolizables ácidos ( $1.34 \pm 0.05 \text{ mg EAG/g}$ ) y de polifenoles hidrolizables alcalinos ( $2.74 \pm 0.12 \text{ mg EAG/g}$ ), mientras que el subproducto de toronja presentó el mayor contenido de polifenoles extraíbles ( $19.87 \pm 1.71 \text{ mg EAG/g}$ ) y de flavonoides totales ( $6.10 \pm 0.33 \text{ mg ER/g}$ ). Al comparar estos resultados con los obtenidos con la decocción de toronja, es posible inferir que el

mayor contenido de compuestos bioactivos son retenidos en la matriz de la toronja durante la decocción con agua, esto quiere decir que al realizar extracciones con compuestos orgánicos y/o acuosos es posible tener una mejor extracción de los mismos.

Cuadro 2. Contenido de compuestos polifenólicos extraíbles y no extraíbles, carotenoides y fitoesteroles en las decocciones y subproductos de cítricos.

Compuestos bioactivos	Naranja	Mandarina	Toronja
<b>Decocciones</b>			
Fenoles totales ( $\mu\text{g}$ EAG/mL)	201.12 $\pm$ 9.34b	381.60 $\pm$ 18.23a	109.32 $\pm$ 5.51c
Flavonoides totales ( $\mu\text{g}$ ER/mL)	15.53 $\pm$ 0.91c	34.13 $\pm$ 1.38a	30.25 $\pm$ 2.18b
Carotenoides totales ( $\mu\text{g}$ $\beta$ -CE/mL)	ND	ND	ND
Fitoesteroles totales ( $\mu\text{g}$ $\beta$ -SE/mL)	ND	ND	ND
<b>Subproductos</b>			
Fenoles extraíbles (mg EAG/g)	7.86 $\pm$ 0.36b	8.87 $\pm$ 0.74b	19.87 $\pm$ 1.71a
Flavonoides totales (mg ER/g)	3.66 $\pm$ 0.15b	4.12 $\pm$ 0.19b	6.10 $\pm$ 0.33a
Proantocianidinas extraíbles (mg PA/g)	19.70 $\pm$ 0.78c	34.33 $\pm$ 2.26a	28.21 $\pm$ 1.52b
Proantocianidinas no extraíbles (mg PA/g)	1.43 $\pm$ 0.00a	1.57 $\pm$ 0.10a	1.57 $\pm$ 0.07a
Polifenoles hidrolizables con ácido (mg EAG/g)	0.73 $\pm$ 0.04b	1.34 $\pm$ 0.05a	0.74 $\pm$ 0.06b
Polifenoles hidrolizables con álcali (mg EAG/g)	1.81 $\pm$ 0.06b	2.74 $\pm$ 0.12a	0.51 $\pm$ 0.04c
Carotenoides totales (mg $\beta$ -CE/g)	2.79 $\pm$ 0.24c	5.44 $\pm$ 0.21b	7.14 $\pm$ 0.32a
Fitoesteroles totales (mg $\beta$ -SE/g)	ND	ND	ND

Los datos son mostrados como media  $\pm$  desviación estándar. EAG: equivalentes de ácido gálico, ER: equivalentes de rutina, PA: equivalentes de proantocianidinas, ND: no detectado. Letras diferentes indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las muestras.

Los resultados obtenidos presentan diferencias con los reportados en la literatura, sin embargo, esto puede deberse a diferencias en los métodos de extracción, a la región de procedencia del material de estudio y al estado de maduración de este (Wang y col., 2016; Ferreira y col., 2018).

#### 4.2. Identificación y cuantificación de compuestos polifenólicos totales y extraíbles de las decocciones y de los subproductos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>.

En el Cuadro 3 se muestra el perfil de compuestos polifenólicos totales de las decocciones de los frutos cítricos, donde se identificaron 8 flavanonas, 2 flavonas, 7 flavonoles y 5 ácidos hidroxicinámicos, mientras que no fueron detectados ácidos

hidroxibenzoicos. El perfil de polifenoles extraíbles de los subproductos de los cítricos se muestra en el Cuadro 4, donde se observa una gran variedad de compuestos polifenólicos totales en los subproductos como 12 flavanonas, 5 flavonas, 7 flavonoles, 4 ácidos hidroxibenzoicos y 6 ácidos hidroxicinámicos.

#### 4.2.1. Flavonoides

El perfil de polifenoles de las decocciones y de los subproductos (Cuadro 3 y 4) mostró un alto contenido de flavonoides. Las flavanonas fueron los principales compuestos identificados en las decocciones, ya que en la naranja se encontraron en un 98.2%, en la mandarina en un 96.2% y en la toronja en un 96.8%. En cuanto a los subproductos de los cítricos, también las flavanonas fueron los compuestos mayoritarios, ya que se encontraron presentes en un 97.3% en el subproducto de la naranja, en un 96.2% en el subproducto de la mandarina y en un 85.8% en el subproducto de la toronja.

Levaj y colaboradores (2009) identificaron flavonoides como la hesperidina, naringina y narirutina como los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en la pulpa y cáscara de algunas variedades de la mandarina (satsuma y clementina), mientras que Ballistreri y colaboradores (2019) los identificaron en el jugo y en la cáscara de la naranja. Los resultados obtenidos concuerdan con lo anterior, dado que la hesperidina es la flavanona que predominó en las decocciones y en los subproductos de la naranja (57.7% y 66.3% respectivamente), y de la mandarina (72.4% y 70.8% respectivamente). En las decocciones y en los subproductos de la naranja se encontraron otros compuestos entre los que destacan la naringina (12.1% y 20% respectivamente) y la narirutina (11.5% y 17.9% respectivamente).

En cuanto a la toronja, Castro-Vázquez y colaboradores (2017) han reportado que la hesperidina se encuentra presente en el jugo de este cítrico en una cantidad menor al 2% y que no es posible detectarla en el extracto de la cáscara. Sin embargo, se ha reportado que esta flavanona se encuentra presente en gran cantidad en el aceite

de la semilla del cítrico (Yilmaz y col., 2019). Debido a que se utilizó toda la fruta (incluyendo semillas) para la elaboración de las decocciones y la obtención de los subproductos de la toronja, se detectó la presencia de la hesperidina (0.6% y 1.7% respectivamente), no fue un porcentaje tan alto porque no se realizó una obtención específica para el aceite contenido en la semilla del cítrico.

La naringina y la narirutina fueron los compuestos polifenólicos mayoritarios presentes en las decocciones (46.6% y 40.2% respectivamente) y en los subproductos (38.8% y 36.7% respectivamente) de la toronja, y además, estos se encontraron en mayor cantidad en comparación con las decocciones y subproductos de la naranja y de la mandarina. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Wu y colaboradores (2007), ya que ellos declaran a estas dos flavanonas como los compuestos polifenólicos mayoritarios en el jugo y cáscara de la toronja.

La identificación de las flavanonas mayoritarias presentes en las decocciones y subproductos de cítricos, se realizó al detectar sus fragmentos característicos en los espectros de masas (Figura 14) y además, los patrones de elución cromatográficos se compararon con los reportados en la literatura.

La naringina y la narirutina (Figura 14-A y 14-B) se identificaron como iones desprotonados  $[(M-H)^-]$  en  $m/z$  579 y su fragmento característico se identificó en  $m/z$  271 correspondiente a la pérdida de la parte dihexósida (-308 Da). Para confirmar la identidad de la naringina, su patrón de elución cromatográfico se comparó con un estándar comercial y se comprobó que era similar a lo reportado por Sung y colaboradores (2019).

Cuadro 3. Perfil de compuestos polifenólicos de las decocciones de frutos cítricos por medio de UPLC-QTOF MS<sup>E</sup>.

Compuesto	Tiempo (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada	Error (ppm)	Fragmentos	Naranja	Mandarina	Toronja
<b>Flavanonas</b>									
Naringina hexóxido	3.26	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	742.2320	741.2230	-2.4	579.1740, 459.1149, 151.0240	0.339 ± 0.024b	ND	0.424 ± 0.036a
Naringenina hexóxido	3.47	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	434.1213	433.1154	3.2	271.0611, 151.0237, 118.9283	0.349 ± 0.007b	0.001 ± 0.000c	0.459 ± 0.010a
Eriocitrina	4.07	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	596.1741	595.1667	-0.2	287.0560, 151.0034	0.119 ± 0.002a	0.013 ± 0.000b	0.002 ± 0.000c
Naringina*	5.21	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	580.1792	579.1710	1.1	459.1139, 271.0609, 151.0039	6.303 ± 0.906b	1.290 ± 0.091c	23.578 ± 4.600a
Narirutina	5.71	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	580.1792	579.17230	2.2	271.0612, 151.0036	5.642 ± 0.029 b	1.228 ± 0.003c	20.337 ± 0.017a
Hesperidina*	6.28	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	610.1898	609.1813	0.2	301.0716	18.168 ± 3.413a	7.693 ± 1.171b	0.324 ± 0.009c
Neohesperidina	6.90	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	610.1898	609.1806	-3.0	301.0715	ND	ND	3.306 ± 0.030
Poncirina	10.94	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	594.1949	593.1865	-1.8	285.1039	ND	ND	0.523 ± 0.002
<b>Flavonas</b>									
Roifolina	5.83	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	578.1656	577.1549	-2.3	269.0450	ND	ND	1.033 ± 0.003
Neodiosmina	6.32	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	608.1741	607.1659	-1.6	299.0559	ND	ND	0.004 ± 0.000
<b>Flavonoles</b>									
Kaempferol hexosa-ramnosil-hexósido	3.36	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	756.2113	755.2050	1.3	285.0452, 151.0237	0.029 ± 0.001a	0.002 ± 0.000b	ND
Kaempferol pentosa-rutinósido	4.69	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	740.2164	739.2072	-2.5	285.0609, 151.0234	0.002 ± 0.000b	ND	0.538 ± 0.022a
Quercetina rutinósido*	4.79	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.1534	609.1458	-0.5	301.0457, 179.029, 151.0243	0.262 ± 0.006b	0.390 ± 0.012c	0.030 ± 0.001a
Kaempferol hexosa -rhamnoside	4.86	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.1585	593.1497	-2.5	285.0388, 159.9304	0.002 ± 0.000a	ND	0.002 ± 0.000a
Kaempferol rutinósido	5.05	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.1585	593.1513	0.1	285.0389	2.620 ± 0.365a	0.367 ± 0.011c	1.945 ± 0.239b
Quercetina acetil-ramnósida	6.14	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	490.1111	489.1052	2.7	301.0380, 179.0328, 151.0304	ND	0.003 ± 0.000a	0.003 ± 0.000a
Quercetina acetil-hexosa- ramnósida	6.65	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	652.1640	651.1562	-0.8	301.0558, 179.0722, 151.0237	0.268 ± 0.006a	0.004 ± 0.000b	0.002 ± 0.000b
<b>Ácidos hidroxycinámicos</b>									
Ácido feruloilquinio	2.74	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	368.1107	367.1031	-1.0	193.0659, 191.0349	ND	0.004 ± 0.000	ND
Ácido cumaroil tartárico	2.79	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	296.0532	295.0454	-1.9	163.0246, 145.0294, 118.9281	0.001 ± 0.000a	ND	0.001 ± 0.000a
Ácido cumárico*	3.45	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	164.0475	163.0402	-2.3	145.9623, 119.0505, 93.0345	ND	ND	0.001 ± 0.000
Ácido ferúlico*	3.90	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.0579	193.0504	-1.0	177.9775, 134.0796, 89.0080	ND	0.002 ± 0.000	ND
Ácido sinapoilquinio	4.71	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	398.1213	397.1140	0.1	223.0117, 191.0711	ND	ND	0.004 ± 0.000

Los datos son mostrados como media ± desviación estándar. Los resultados son expresados como µg/mL. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) entre las muestras. \*Identificación confirmada con estándar comercial. ND: no detectado.

Cuadro 4. Perfil de compuestos polifenólicos extraíbles de los subproductos de frutos cítricos por medio de UPLC-QTOF MS<sup>E</sup>.

Compuesto	Tiempo (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada	Error (ppm)	Fragmentos	Naranja	Mandarina	Toronja
<b>Flavanonas</b>									
Naringina hexóxido	3.26	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	742.2320	741.2230	-2.4	579.1740, 459.1149, 151.0240	2.796 ± 0.398a	0.641 ± 0.092b	2.817 ± 0.398a
Naringenina hexóxido	3.47	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	434.1213	433.1154	3.2	271.0611, 151.0237, 118.9283	3.153 ± 0.226a	0.750 ± 0.124b	3.468 ± 0.375a
Eriocitrina	4.07	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	596.1741	595.1667	-0.2	287.0560, 151.0034	1.588 ± 0.005a	1.235 ± 0.160a	ND
Naringina*	5.21	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	580.1792	579.1800	1.1	459.1139, 271.0609, 151.0039	83.984 ± 8.411a	45.947 ± 6.125b	25.210 ± 3.391c
Narirutina	5.71	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	580.1792	579.17230	2.2	271.0612, 151.0036	90.335 ± 3.025 b	42.779 ± 1.045c	111.386 ± 4.771a
Hesperidina*	6.28	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	610.1898	609.1813	0.2	301.0716	397.474 ± 29.313a	260.452 ± 26.470b	117.722 ± 10.939c
Naringina malonato	6.51	C <sub>36</sub> H <sub>44</sub> O <sub>22</sub>	828.2324	827.2245	-0.7	579.0724, 459.0681, 159.0143	18.135 ± 0.798b	24.417 ± 3.682a	ND
Neohesperidina	6.90	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	610.1898	609.1806	-3.0	301.0715	1.209 ± 0.054 b	0.666 ± 0.090c	11.473 ± 0.213
Isosakuranetina	10.77	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	286.0841	285.0762	-2.3	151.0948	2.069 ± 0.033a	1.072 ± 0.055b	0.506 ± 0.033c
Didimina	10.83	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	610.18977	609.1813		593.1039	ND	ND	0.634
Naringenina*	10.87	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272.0685	271.0605	-2.5	151.0033, 119.0187	0.332 ± 0.015b	0.197 ± 0.009a	0.771 ± 0.099a
Poncirina	10.94	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	594.1949	593.1865		593.1030	ND	ND	6.482 ± 0.107
<b>Flavonas</b>									
Raiofolina	5.83	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>14</sub>	578.1656	577.1549	-2.3	269.0450	1.005 ± 0.087b	ND	17.069 ± 0.737a
Diosmina	5.79	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	608.1741	607.1661	-1.2	299.0560	3.175 ± 0.010a	1.176 ± 0.007b	0.408 ± 0.002c
Neodiosmina	6.32	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	608.1741	607.1659	-1.6	299.0559	ND	ND	1.700 ± 0.086
Nobiletina	12.66	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	402.1315	401.1244	0.5	359.1039	ND	ND	0.491 ± 0.026
Escutelarina	12.86	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.04774	285.0404	-0.1	285.0841	ND	ND	0.183 ± 0.003
<b>Flavonoles</b>									
Kaempferol hexosa-ramnosil-hexóxido	3.36	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>20</sub>	756.2113	756.2050	1.3	285.0452, 151.0237	0.310 ± 0.017a	0.356 ± 0.017a	0.325 ± 0.022a
Kaempferol pentosil-rutinósido	4.69	C <sub>33</sub> H <sub>40</sub> O <sub>19</sub>	740.2164	739.2072	-2.5	285.0609, 151.0234	0.402 ± 0.054b	0.105 ± 0.091c	0.969 ± 0.100a
Quercetina rutinoside*	4.79	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	610.1534	609.1458	-0.5	301.0457, 179.0294, 151.0243	0.983 ± 0.038b	2.426 ± 0.219a	0.818 ± 0.045c
Kaempferol hexosa-ramnósido	4.86	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.1585	593.1497	-2.5	285.0388, 159.9304	0.273 ± 0.052a	0.152 ± 0.031b	0.274 ± 0.029a
Kaempferol rutinósido	5.05	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>15</sub>	594.1585	593.1513	0.1	285.0389	7.044 ± 0.561a	5.453 ± 0.800b	5.021 ± 0.566b
Quercetina acetil-ramnósido	6.14	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>	490.1111	489.1052	2.7	301.0380, 179.0328, 151.0304	0.536 ± 0.068a	0.493 ± 0.074b	0.422 ± 0.058b
Quercetina acetil-hexose-ramnósido	6.65	C <sub>29</sub> H <sub>32</sub> O <sub>17</sub>	652.1640	651.1562	-0.8	301.0558, 179.0722, 151.0237	0.862 ± 0.172b	1.436 ± 0.129a	0.435 ± 0.063c
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>									
Ácido galoilquínico	0.54	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	344.0744	343.0680	2.7	191.0559, 169.0558	0.801 ± 0.048c	1.459 ± 0.083b	1.812 ± 0.204a
Ácido hidroxibenzóico hexóxido	1.14	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub>	300.0845	299.0772	-0.3	136.9832	1.248 ± 0.247c	1.777 ± 0.308b	2.258 ± 0.435a
Ácido hidroxibenzóico	1.47	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.0317	137.0242	-1.6	93.0286	0.808 ± 0.050b	ND	0.905 ± 0.071a
Ácido dihidroxibenzóico hexóxido	1.81	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>9</sub>	316.0794	315.0713	-2.7	152.044	3.169 ± 0.160b	2.563 ± 0.323c	7.634 ± 0.382a
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>									
Ácido sinápico hexóxido	2.61	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	386.1213	385.1153	3.3	223.0661, 208.0365	0.332 ± 0.009	ND	ND
Ácido feruloiquinico	2.74	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	368.1107	367.1031	-1.0	193.0659, 191.0349	0.311 ± 0.006a	0.308 ± 0.042a	ND
Ácido cumaril tartárico	2.79	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub>	296.0532	295.0454	-1.9	163.0246, 145.0294, 118.9281	1.527 ± 0.026b	0.444 ± 0.034c	3.339 ± 0.594a
Ácido cumárico*	3.45	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	164.0475	163.0402	-2.3	145.9623, 119.0505, 93.0345	0.923 ± 0.023b	1.212 ± 0.225a	0.950 ± 0.073b
Ácido ferúlico*	3.90	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.0579	193.0504	-1.0	177.9775, 134.0796, 89.0080	0.321 ± 0.022b	0.563 ± 0.021a	ND
Ácido sinapoiquinico	4.71	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	398.1213	397.1140	0.1	223.0117, 191.0711	0.940 ± 0.133b	ND	6.452 ± 0.752a

Los datos son mostrados como media ± desviación estándar. Los resultados son expresados como µg/g. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) entre las muestras. \*Identificación confirmada con estándar comercial. ND: no detectado.

En el caso de la hesperidina (Figura 14-C), se identificó su ión desprotonado [(M-H)<sup>-</sup>] en m/z 609 y su fragmento característico en m/z 301, que también corresponde a la pérdida de su parte dihexósida (-308 Da). Para confirmar la identidad de la hesperidina, se comparó el tiempo de retención obtenido contra el de un estándar comercial y de esta forma se pudo definir si se trataba realmente de hesperidina (hesperetina 7-O-rutinósido) o si se trataba de neohesperidina (hesperidina 7-O-neohesperidósido), ya que estas dos flavanonas poseen un espectro de masas similar (Figura 14-C y 14-D).

Tras identificar correctamente ambas flavanonas, se identificó a la neohesperidina como el tercer polifenol mayoritario en las decocciones de la toronja y fue el cuarto mayoritario en el subproducto del mismo cítrico, representando el 6.5% y el 3.8% de los compuestos polifenólicos totales en las muestras (Cuadro 3 y 4). La neohesperidina se encontró en las decocciones de los tres cítricos (Cuadro 4); sin embargo, la presencia de esta flavanona únicamente se ha reportado previamente en el jugo de toronja y en proporciones similares con la hesperidina (Del Caro y col., 2004; Theile y col., 2017). Los resultados obtenidos en este estudio no reflejan esta proporción entre hesperidina y neohesperidina puesto que la concentración de neohesperidina fue mayor que la de hesperidina en la decocción de toronja (3.306 µg/mL y 0.324 µg/mL respectivamente), mientras que en el subproducto del mismo cítrico, la hesperidina tuvo mayor concentración que la neohesperidina (111.722 µg/g y 11.483 µg/g respectivamente).

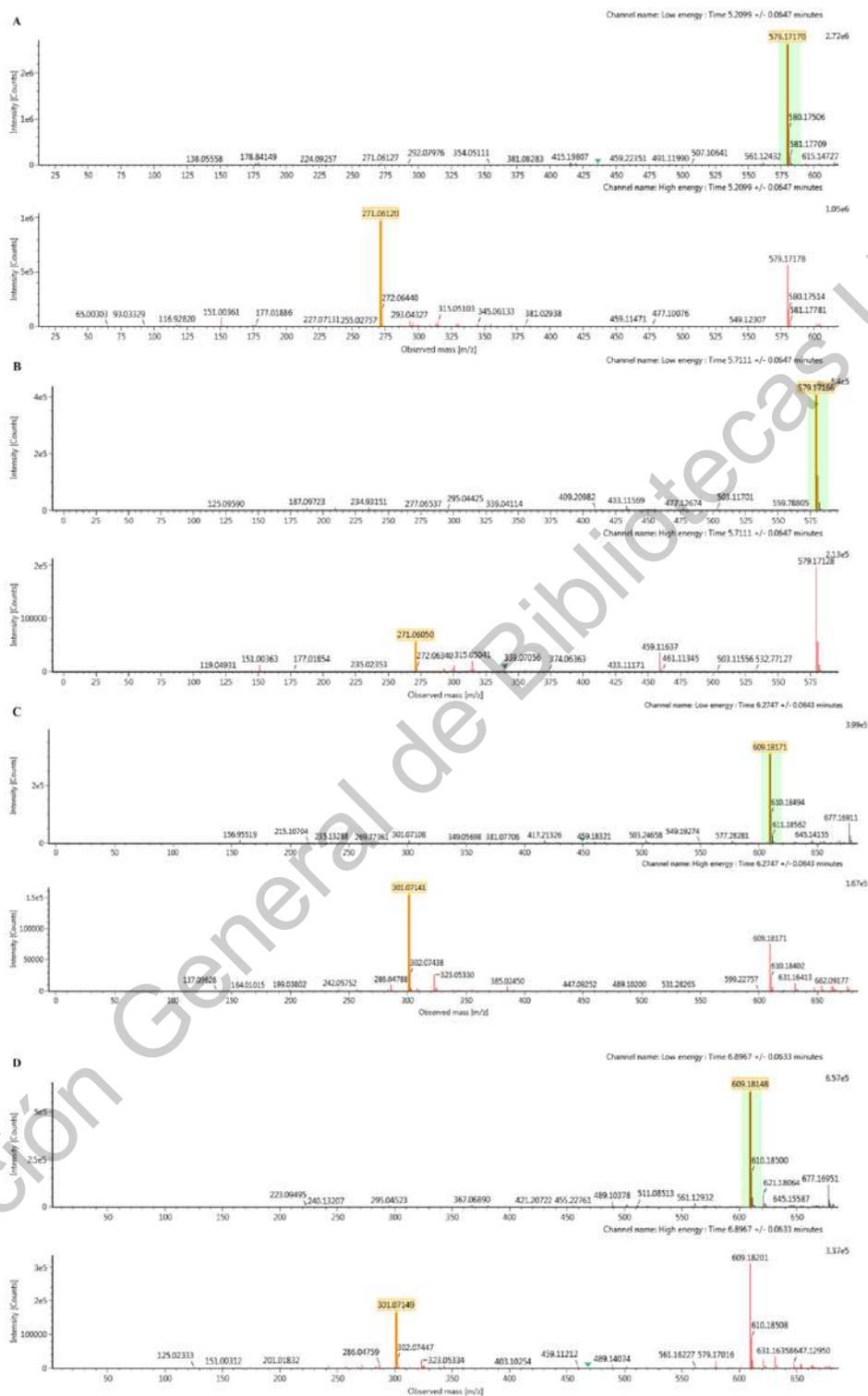


Figura 14. Espectros de masas de alta resolución a alta (superior) y baja (inferior) energía de colisión de las flavanonas identificadas en las decocciones y subproductos de cítricos: naringina (A), narirutina (B), hesperidina (C) y neohesperidina (D).

La roifolina es una polimetoxiflavona que pertenece al grupo de las flavonas y fue la única que se identificó de esta subclase; fue encontrada sólo en la decocción de toronja en cantidad baja, representando el 2% (Cuadro 3). La presencia de la roifolina sólo se ha detectado en el jugo de toronja (Goh y col., 2019), así como en la cubierta interna y externa de la semilla de toronja (Avula y col., 2016) y no se ha reportado su presencia en las cáscaras de toronja. Por lo anterior, es importante mencionar que esta flavona fue el tercer polifenol más abundante que se identificó en la fracción EPP del subproducto de toronja, pero contribuyó sólo con el 5.6% de polifenoles totales (Cuadro 4).

En 2011, Barreca y colaboradores identificaron la roifolina y su glucósido en el jugo de naranja agria pero en cantidad baja. Los resultados obtenidos en este estudio también muestran una cantidad baja de esta flavona pero en el subproducto de naranja (Cuadro 4) y no se identificó en la decocción del mismo cítrico (Cuadro 3), lo cual podría estar relacionado con su degradación térmica durante el proceso de decocción.

La diosmina es otra flavona que Bermejo y colaboradores (2011) identificaron como componente minoritario de las cáscaras de diferentes variedades de naranja y mandarina. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo anterior, pues esta flavona contribuyó solo con el 0.5 y 0.3% de los polifenoles totales de los subproductos de naranja y mandarina.

Se identificaron las flavonas mayoritarias de las decocciones y subproductos de cítricos de la misma forma que con las flavanonas, comparando sus fragmentos característicos de los espectros de masas (Figura 15) y los patrones de elución cromatográficos se compararon con los reportados en la literatura. La roifolina se identificó en forma de ion desprotonado en  $m/z$  577 y su fragmento característico se encontró en  $m/z$  269 (Figura 15-A); la diosmina (diosmetina 7-O-rutinosido) se identificó en  $m/z$  607 y su fragmento característico se encontró en  $m/z$  299 (Figura 15-B) que corresponde a la pérdida de su parte hexósida (-308 Da).

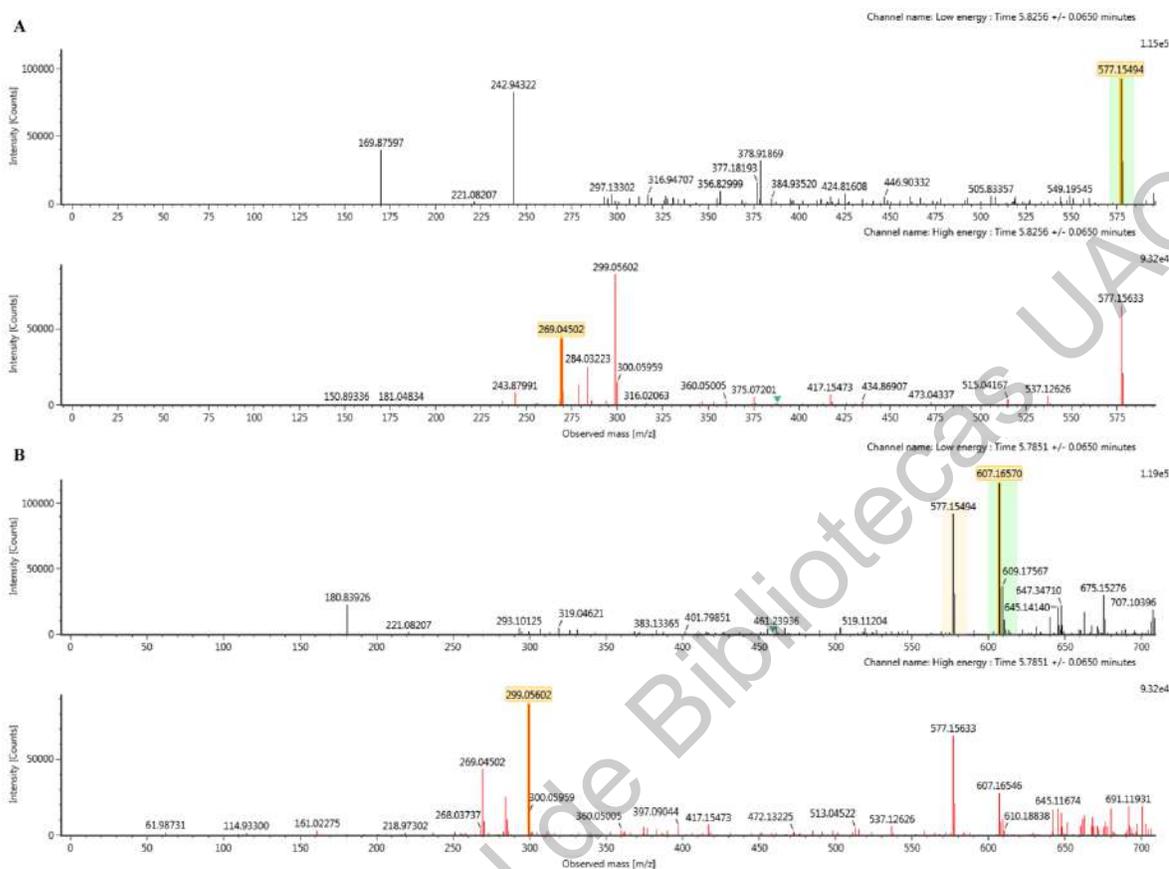


Figura 15. Espectros de masas de alta resolución a alta (superior) y baja (inferior) energía de colisión de las flavonas identificadas en las decocciones y subproductos de cítricos: roifolina (A) y diosmina (B).

En los Cuadros 3 y 4 se muestran los 7 flavonoles que se identificaron en las decocciones y subproductos de los cítricos, y a pesar de que estos flavonoles están constituidos por derivados de kaempferol y quercetina, no se detectaron sus agliconas en las muestras. Además, el contenido de estos flavonoides fue bajo al compararlo con las flavanonas y las flavonas (0.6 - 3.8 %).

#### 4.2.2. Ácidos fenólicos

En el Cuadro 3 se muestra que en cuanto al contenido de ácidos fenólicos, en las decocciones de cítricos sólo se identificaron cuatro ácidos hidroxicinámicos pero en concentración baja. Debido a lo anterior, estos ácidos fenólicos representaron sólo

el 0.06 y 0.01% de los compuestos polifenólicos totales en las decocciones de mandarina y toronja, mientras que en la decocción de naranja no se identificó ningún ácido fenólico. El ácido sinapoilquínico fue el ácido fenólico mayoritario en la decocción de toronja y, como se mencionó anteriormente, en los otros cítricos y sus subproductos se encontró en cantidad baja o nula.

El Cuadro 4 muestra que en los subproductos de los cítricos, la fracción de EPP presentó una mayor variedad de ácidos fenólicos, ya que se identificaron cuatro ácidos hidroxibenzoicos y cinco ácidos hidroxicinámicos. En todos los subproductos de cítricos se encontró la presencia del hexóxido del ácido hidroxibenzoico y del hexóxido del ácido dihidroxibenzoico; sin embargo, este último fue el que predominó y se encontró en una concentración mayor en el subproducto de toronja.

Tanto el hexósido de ácido dihidroxibenzoico como el hexósido de ácido hidroxibenzoico fueron identificados como iones desprotonados en  $m/z$  315 y 299, respectivamente, con su fragmento característico en  $m/z$  152 que corresponde a la pérdida de una unidad de hexosa (-163 Da) (Figura 16). El ácido sinapoilquínico se identificó en  $m/z$  397 ( $[M-H]^-$ ) con un fragmento en  $m/z$  191, que corresponde a la liberación del ácido quínico (Figura 16-C).

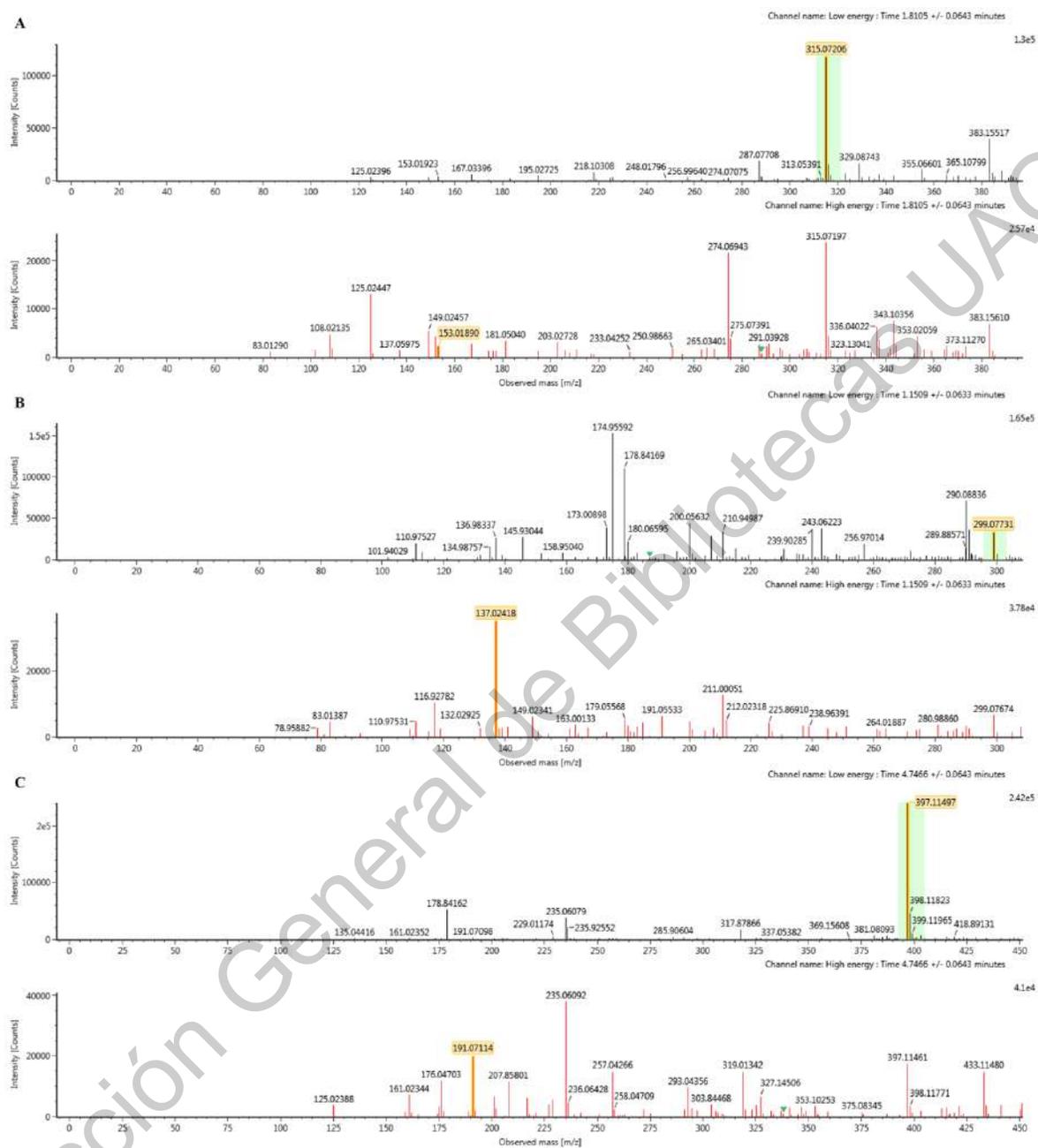


Figura 16. Espectros de masas de alta resolución a alta (superior) y baja (inferior) energía de colisión de los ácidos fenólicos identificados en las decocciones y subproductos de cítricos: hexósido de ácido hidroxibenzoico (A), hexósido de ácido dihidroxibenzoico (B) y ácido sinapoylquinico (C).

### 4.3. Identificación de polifenoles poliméricos de los subproductos.

#### 4.3.1. Grado de polimerización media de proantocianidinas.

Con respecto a los compuestos polifenólicos poliméricos, el grado de polimerización media de los subproductos de frutos cítricos se muestra en la Figura 17, en donde se observa un rango de 1.7 - 2.4, lo que indica la presencia de proantocianidinas de bajo peso molecular.

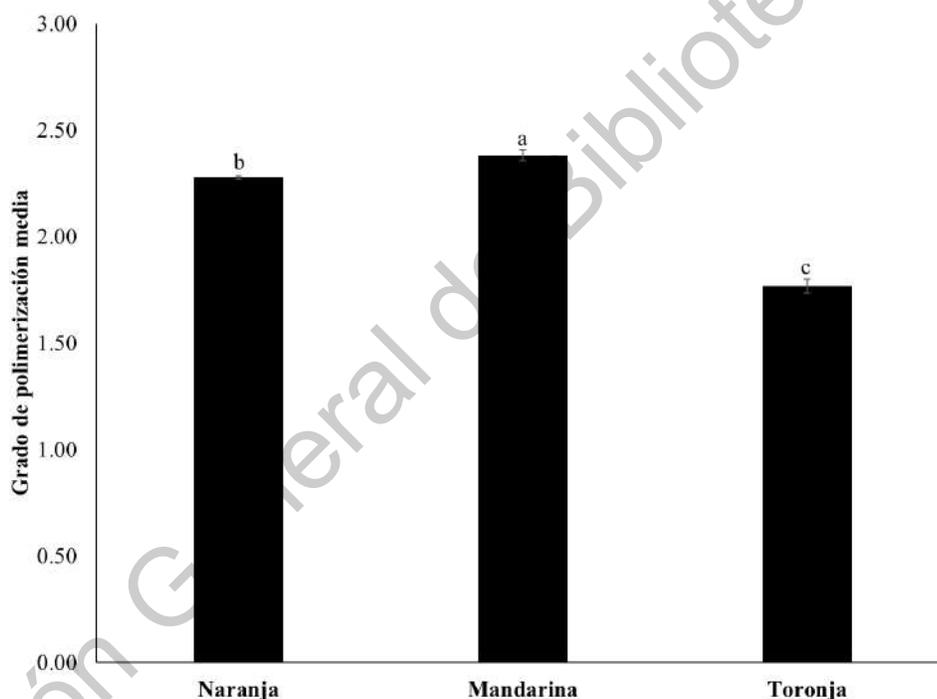


Figura 17. Grado de polimerización media de las proantocianidinas extraíbles de los subproductos de cítricos.

#### 4.3.2. Caracterización de polifenoles poliméricos por medio de UPLC-ESI-QqQ MS<sup>2</sup> y de MALDI-TOF MS.

El grado de polimerización media indicó que la fracción de EPP contiene proantocianidinas de bajo peso molecular o libres, por lo que se encontró una alta

cantidad de estos polifenoles en todos los subproductos cítricos (Cuadro 2) y además, en mayor cantidad que los polifenoles extraíbles y flavonoides. El subproducto de mandarina fue el que presentó el mayor contenido de proantocianidinas extraíbles, seguido del subproducto de toronja y, por último, el subproducto de naranja. La fracción de EPP se analizó por UPLC-ESI-QqQ MS<sup>2</sup> pero no se detectaron monómeros, dímeros o trímeros de flavanoles.

El análisis MALDI-TOF MS se realizó en la fracción EPP para identificar los compuestos polifenólicos poliméricos contenidos en los subproductos de cítricos (Figuras 18-20) pero los patrones de fragmentación obtenidos no correspondieron a proantocianidinas, elagitaninos o galotaninos, ya que no eran similares a los aductos calculados de polímeros compuestos por (epi)-catequina, (epi)-gallocatequina, (epi)-catequina galato, galato de (epi)-gallocatequina y (epi)-afzelequina.

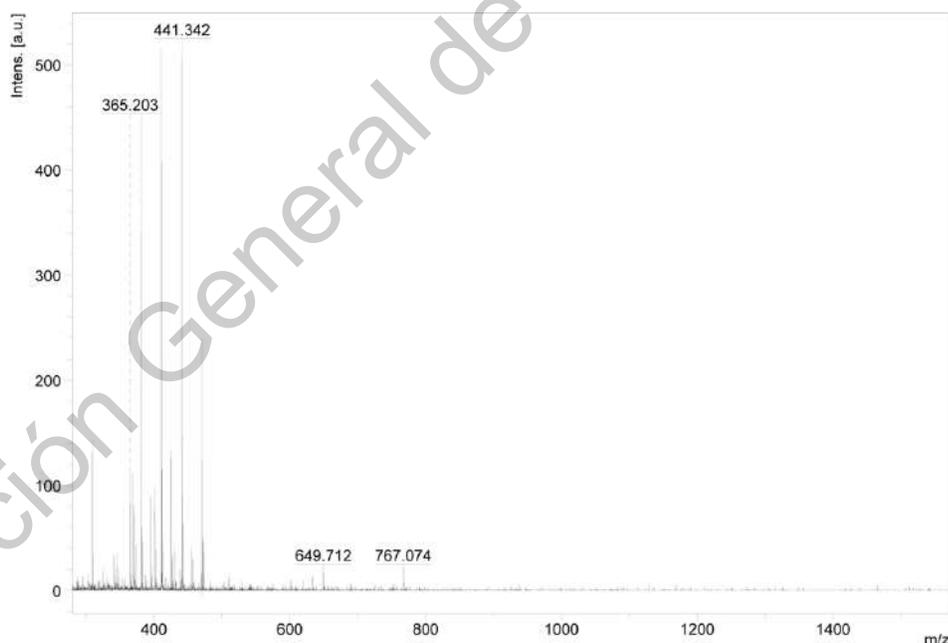


Figura 18. Espectro de MALDI-TOF MS de las proantocianidinas extraíbles del subproducto de naranja.

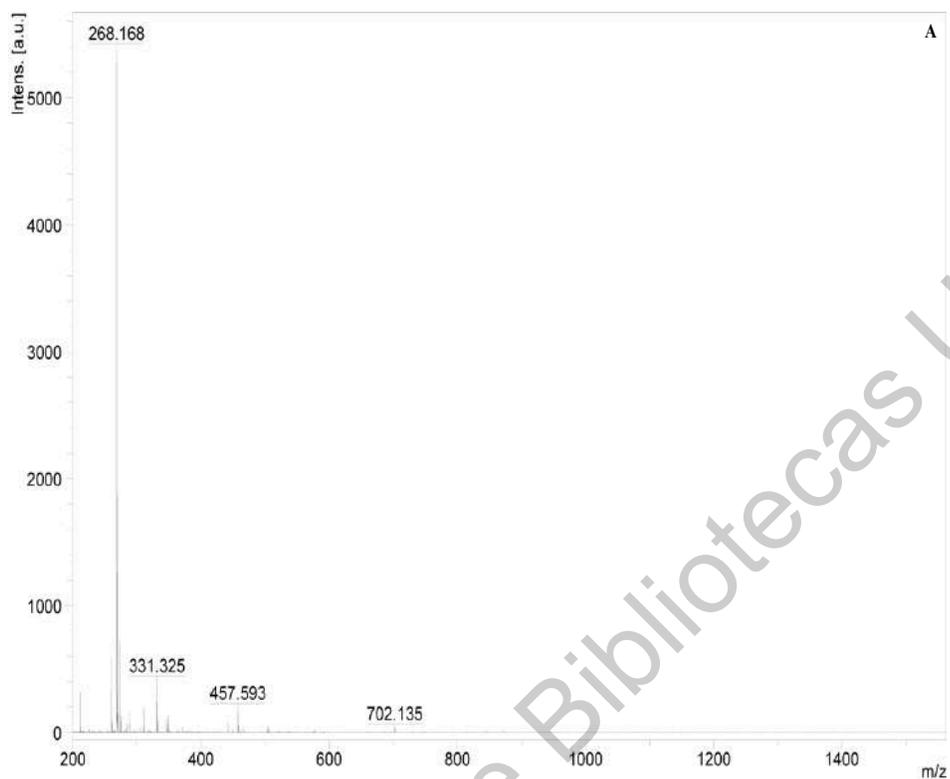


Figura 19. Espectro de MALDI-TOF MS de las proantocianidinas extraíbles del subproducto de mandarina.

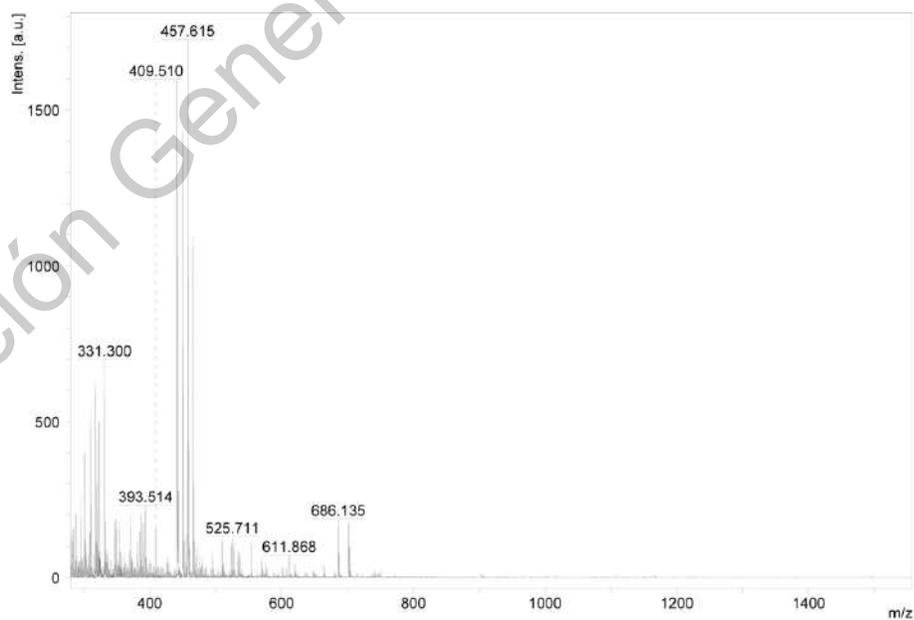


Figura 20. Espectro de MALDI-TOF MS de las proantocianidinas extraíbles del subproducto de toronja.

#### 4.4. Identificación y cuantificación de polifenoles no extraíbles de los subproductos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>.

##### 4.4.1. Polifenoles hidrolizables

Se realizó una caracterización exhaustiva de los polifenoles contenidos en la fracción NEPP de los subproductos de cítricos, ya que la composición de esta fracción de polifenoles no se ha reportado en estudios previos. Para poder realizar la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos contenidos en esta fracción fue necesario realizar una hidrólisis, ya que estos compuestos se encuentran unidos a la matriz por medio de enlaces glicosídicos, éter y éster (Wu y col., 2018).

Se realizó una hidrólisis ácida y una alcalina, ya que los ácidos hidrolizan los enlaces glicosídicos entre los polifenoles y la matriz del fruto, mientras que los álcalis hidrolizan los enlaces éster y/o éter. Se realizaron ambas hidrólisis debido a que varios autores han propuesto una hidrólisis combinada (ácido y álcali) para obtener el contenido total de polifenoles hidrolizables (Quatrin y col., 2019).

El contenido de polifenoles hidrolizables (HPP) de los subproductos se muestra en el Cuadro 2, donde se observa que el contenido de HPP fue relativamente bajo en comparación con el contenido de EPP en todos los subproductos. El subproducto de naranja y mandarina tuvieron un mayor contenido de HPP con álcali, mientras que el subproducto de toronja tuvo una mayor cantidad de HPP con ácido.

Ambas fracciones de HPP se analizaron mediante UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup> para identificar la composición de los subproductos de cítricos (Cuadro 5). En las fracciones de HPP (ácida y alcalina) se encontraron varios polifenoles; en la fracción ácida se identificaron dieciséis polifenoles y en la fracción alcalina se identificaron once polifenoles. A pesar de que en la fracción ácida se identificó una mayor variedad de polifenoles, estos se encontraron en baja cantidad.

Cuadro 5. Perfil de compuestos polifenólicos hidrolizables de los subproductos de frutos cítricos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>.

Compuesto	Tiempo (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada	Error (ppm)	Fragmentos	Naranja	Mandarina	Toronja
<b>Polifenoles hidrolizables ácidos</b>									
<b>Flavanonas</b>									
Naringenina*	10.87	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	272.0685	271.0605	-2.5	151.0033, 119.0187	0.124 ± 0.001b	ND	0.222 ± 0.003a
Isosakuranetina	10.77	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	286.0841	285.0762	-2.3	151.0948	1.502 ± 0.003a	0.470 ± 0.002b	ND
Didimina	10.83	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	610.18977	609.1813		593.1039	ND	0.025 ± 0.001	ND
Poncirina	10.94	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>14</sub>	594.1949	593.1865		593.1030	ND	0.024 ± 0.001	ND
<b>Flavonas</b>									
Diosmetina	11.45		300.0634	299.0568	2.3	300.0083	ND	ND	0.068 ± 0.001
Sinensetina	12.70		372.1209	371.1126	-2.8	341.0948	ND	0.859 ± 0.007	ND
Escutelarina	12.86	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.04774	285.0404	-0.1	285.0841	ND	ND	0.269 ± 0.001
Nobiletina	12.66	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	402.1315	401.1244	0.5	359.1039	ND	0.343 ± 0.001b	1.014 ± 0.002 a
Tangeretina	13.60		372.1209	371.1147	2.8	311.1279	0.783 ± 0.001b	ND	0.923 ± 0.010a
Diosmina	5.79	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	608.1741	607.1661	-1.2	299.0560	0.012 ± 0.000	ND	ND
<b>Flavonoles</b>									
Kaempferol	9.07	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	286.0477	285.0395	-3.5	255.0248, 227.0312	ND	ND	0.078 ± 0.002
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>									
Ácido gálico hexóxido	1.28	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	332.0744	331.0663	-2.4	169.0168	ND	ND	0.174 ± 0.003
Ácido vanílico*	1.86	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168.0423	167.0347	-1.7	136.9498, 109.0291	ND	ND	0.112 ± 0.002
Ácido hidroxibenzoico	1.47	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.0317	137.0242	-1.6	93.0286	ND	0.175 ± 0.002b	0.225 ± 0.007a
Ácido siríngico	2.98	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	198.0528	197.0455	-0.1	182.0215, 95.0130	ND	ND	0.788 ± 0.011
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>									
Ácido sinápico	3.99	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	224.0685	223.0606	-2.8	208.0386	0.023 ± 0.001	ND	ND
<b>Polifenoles hidrolizables alcalinos</b>									
<b>Flavanonas</b>									
Naringina hexóxido	3.26	C <sub>33</sub> H <sub>42</sub> O <sub>19</sub>	742.2320	741.2230	-2.4	579.1740, 459.1149, 151.0240	1.143 ± 0.007	ND	ND
Naringenina hexóxido	3.47	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>10</sub>	434.1213	433.1154	3.2	271.0611, 151.0237, 118.9283	3.153 ± 0.226a	0.749 ± 0.006b	0.054 ± 0.000c
Eriocitrina	4.07	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub>	596.1741	595.1667	-0.2	287.0560, 151.0034	0.260 ± 0.005a	0.155 ± 0.004b	ND
Naringina*	5.18	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>14</sub>	580.1792	579.1800	1.1	459.1139, 271.0609, 151.0039	43.868 ± 0.212a	41.020 ± 0.482a	0.889 ± 0.011
Hesperidina*	6.28	C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub>	610.1898	609.1813	0.2	301.0716	567.080 ± 0.891b	1324.242 ± 3.737a	0.217 ± 0.004
<b>Flavonas</b>									
Nobiletina	12.66	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	402.1315	401.1244	0.5	359.1039	ND	ND	0.236 ± 0.001
<b>Ácidos hidroxibenzoicos</b>									
Ácido gálico hexóxido	1.28	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> O <sub>10</sub>	332.0744	331.0663	-2.4	169.0168	ND	0.211 ± 0.003	ND
Ácido vanílico*	1.86	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	168.0423	167.0347	-1.7	136.9498, 109.0291	0.300 ± 0.007b	0.356 ± 0.007a	ND
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>									
Ácido ferulolquinico	2.74	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>	368.1107	367.1031	-1.0	193.0659, 191.0349	ND	ND	0.023 ± 0.001
Ácido cumárico*	3.45	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>	164.0475	163.0402	-2.3	145.9623, 119.0505, 93.0345	ND	0.104 ± 0.003	ND
Ácido ferúlico*	3.90	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	194.0579	193.0504	-1.0	177.9775, 134.0796, 89.0080	0.172 ± 0.002a	0.168 ± 0.002a	ND

Los datos son mostrados como media ± desviación estándar. Los resultados son expresados como µg/g. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) entre las muestras. \*Identificación confirmada con estándar comercial. ND: no detectado.

En las dos fracciones de HPP se identificaron dos ácidos hidroxibenzoicos, que fueron el hexósido de ácido gálico y ácido vainílico. Es importante señalar que estos polifenoles no se identificaron en la fracción de EPP, lo que indica que estos compuestos pudieron estar unidos a la matriz por medio de enlaces glicosídicos, éter y/o éster.

Los polifenoles que se identificaron en la fracción ácida de HPP fueron la diosmetina, sinensetina, tangeretina, ácido siríngico y ácido sinápico. Estos polifenoles no se identificaron en la fracción alcalina de HPP y tampoco en la fracción de EPP, por lo que se sugiere que se trata de polifenoles que se encuentran atrapados en la matriz de los cítricos por medio de enlaces glicosídicos.

En la fracción alcalina de HPP se identificó la hesperidina en los subproductos de naranja y mandarina en un 92.4% y 96.9%, respectivamente. Es importante mencionar que la concentración de esta flavanona fue mayor en la fracción alcalina de HPP en comparación con la de la fracción de EPP de ambos subproductos de cítricos. Otra flavanona identificada fue la naringina, la cual se encontró en un 7.1% y 3% en los subproductos de naranja y mandarina respectivamente. El contenido de naringina fue similar en la fracción alcalina de HPP y en la fracción de EPP del subproducto de mandarina, mientras que en el subproducto de naranja esta flavanona representó el 34.3% de la fracción alcalina de HPP. Por lo tanto, estos resultados sugieren que los polifenoles presentes en la cáscara se encuentran tanto libres como unidos a la matriz.

#### 4.4.2. Proantocianidinas

De acuerdo con Wu y colaboradores (2018), la fracción de NEPP puede estar compuesta por proantocianidinas unidas a la matriz o proantocianidinas de alto peso molecular que no pueden solubilizarse en los solventes de extracción. En el cuadro 2 se muestra el contenido de proantocianidinas no extraíbles (NEPA) de los subproductos cítricos (1.43 - 1.57 mg/g). Estos resultados difieren de estudios

anteriores, ya que se ha reportado que en las cáscaras de cítricos como la naranja y la mandarina, no se detecta la presencia de NEPA (Pérez-Jiménez y col., 2018). Los resultados obtenidos sugieren que la extracción térmica influyó durante el proceso de decocción de los cítricos, ya que logró mejorar la extracción de estos compuestos.

No se realizó la caracterización de NEPA debido a las complicaciones técnicas asociadas, ya que la extracción de NEPA implica una hidrólisis que conduce a la ruptura de la cadena polimérica y, de acuerdo con Sáyago-Ayerdi y col. (2018), la identificación se realizaría en los productos de hidrólisis y no en la molécula original.

#### 4.5. Identificación y cuantificación de carotenoides totales de las decocciones y de los subproductos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>.

El contenido total de carotenoides de las decocciones de cítricos se muestra en el Cuadro 2. Cabe destacar que en ninguna decocción de cítricos se detectaron carotenoides y esto puede deberse a la temperatura utilizada durante la elaboración de las decocciones (95 °C), ya que se ha reportado que las altas temperaturas, así como el tiempo de extracción prolongado provoca que los carotenoides se degraden y además, se promueve su isomerización cis-trans (Saini y Keum, 2019). Cabe señalar que las decocciones se elaboraron con agua potable, y para la extracción de xantofilas y carotenos, comúnmente se utiliza acetona y hexano.

En todos los subproductos de cítricos se detectaron carotenoides pero se encontraron en mayor cantidad en el subproducto de toronja, seguido del de mandarina y, por último, el de naranja. Los resultados indican que algunos carotenoides pueden ser protegidos por la matriz de estos cítricos para que no se degraden térmicamente durante el proceso de decocción.

Las muestras de las decocciones y de los subproductos de cítricos se analizaron por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup> ya que se trata de un análisis de mayor

sensibilidad en comparación con el ensayo espectrofotométrico UV/VIS; sin embargo, tampoco se identificaron carotenoides en las decocciones de cítricos.

En cuanto a los subproductos de cítricos, se identificaron ocho carotenoides (Cuadro 6) y los subproductos de naranja y mandarina fueron los que tuvieron mayor cantidad de estos componentes en comparación con el subproducto de toronja. Esto último concuerda con lo reportado por Goldenberg y colaboradores (2018), que señalan una baja cantidad de carotenoides en los frutos de toronja.

En el subproducto de naranja se identificó a la violaxantina como el carotenoide mayoritario, mientras que en el subproducto de mandarina, los carotenoides mayoritarios fueron la criptoxantina, violaxantina y luteoxantina. La presencia de estos carotenoides se ha reportado en el jugo, pulpa y cáscara de estos cítricos, por lo que los resultados obtenidos concuerdan con la literatura (Goldenberg y col., 2018).

#### 4.6. Identificación y cuantificación de fitoesteroles totales de las decocciones y de los subproductos por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup>.

Se realizó la cuantificación de fitoesteroles totales en las decocciones y subproductos de cítricos (Cuadro 2). En las decocciones de cítricos no se detectó la presencia de estos compuestos; lo cual se puede atribuir a las características hidrofóbicas de los fitoesteroles, por lo que no son fácilmente extraídos en agua durante el proceso de decocción. Sin embargo, en los subproductos de cítricos tampoco se detectaron fitoesteroles extraíbles (Cuadro 2). Estos resultados muestran diferencias a lo reportado en la literatura, ya que Jorge y colaboradores (2016) reportaron que las semillas de cítricos poseen un alto contenido de fitoesteroles. Por lo que se esperaba que los subproductos de cítricos evaluados en este estudio mostraran un contenido considerable de este tipo de compuestos bioactivos, ya que las decocciones fueron preparadas utilizando el fruto completo (incluyendo cáscara y semilla), por lo que el subproducto estaba conformado por estos componentes.

Las muestras se analizaron por medio de UPLC-DAD-ESI-QToF MS<sup>E</sup> para poder identificar, con mayor precisión y sensibilidad, los fitoesteroles que pudieran estar presentes. No obstante, en las decocciones no se detectó la presencia de algún fitoesterol. En los subproductos se detectaron algunos fitoesteroles libres (Cuadro 6), los cuales fueron  $\beta$ -campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol. De acuerdo con Decloedt y colaboradores (2016), estos son los fitoesteroles más abundantes en las plantas. En los tres subproductos de cítricos, el  $\beta$ -sitosterol fue el fitoesterol mayoritario y por su parte, el  $\beta$ -campesterol se encontró en mayor cantidad en los subproductos de naranja y toronja.

Dirección General de Bibliotecas UFRQ

Cuadro 6. Perfil de carotenoides y fitoesteroles de los subproductos de cítricos.

Compuesto	Tiempo (min)	Fórmula molecular	Masa esperada (Da)	Masa observada (Da)	Error (ppm)	Fragmentos	Naranja	Mandarina	Toronja
<b>Carotenoides</b>									
Violaxantina	3.58	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>4</sub>	600.8418	601.4019	2.3	93.3812	13.294 ± 0.028a	8.391 ± 0.028b	0.538 ± 0.043c
Astaxantina	3.85	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>4</sub>	596.8414	597.3912	-1.8	147.3964	2.481 ± 0.039b	3.495 ± 0.582a	0.038 ± 0.000c
Zeaxantina + luteína	4.11	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	568.8836	569.4104	2.1	135.2867	1.039 ± 0.012b	4.583 ± 0.475a	0.181 ± 0.001c
Cantaxantina	4.53	C <sub>40</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	564.8248	565.8938	2.0	203.1044	ND	1.988 ± 0.567a	0.399 ± 0.002b
β-Criptoxantina	6.19	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O	552.8529	553.5103	-2.5	461.5823	5.902 ± 0.044b	20.399 ± 0.194c	0.461 ± 0.004a
β-Caroteno	9.74	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	536.8723	537.5829	0.9	123.1941	3.485 ± 0.101b	4.391 ± 0.938a	1.491 ± 0.021c
<i>cis</i> -Fitoeno	10.98	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>	544.9437	545.4948	3.2	81.3955	ND	0.093 ± 0.001	ND
<i>trans</i> -Fitoeno	11.31	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>	544.9435	545.5039	-3.6	81.3846	0.058 ± 0.001b	0.104 ± 0.011a	ND
<b>Fitoesteroles</b>									
β-Campesterol	1.11	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	400.6837	383.2841	0.9	81.2931, 91.2995	5.183 ± 0.348a	2.049 ± 0.038b	3.183 ± 0.035c
Stigmasterol	1.12	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	412.6951	395.3941	1.4	81.3544, 91.3039	3.040 ± 0.481a	1.048 ± 0.465b	0.731 ± 0.061c
β-Sitosterol	1.23	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	414.7142	397.2949	-1.2	91.3013, 95.2994	7.102 ± 0.193a	3.182 ± 0.039c	5.680 ± 0.024b

Los datos son mostrados como media ± desviación estándar. Los resultados son expresados como µg/g. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) entre las muestras. \*Identificación confirmada con estándar comercial. ND: no detectado.

## 5. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en este estudio, se demostró que las decocciones elaboradas con cítricos enteros (pulpa, cáscaras y semillas) son bebidas ricas en compuestos polifenólicos, principalmente flavanonas. No obstante, carecen de carotenoides debido a que estos compuestos se degradan a las altas temperaturas alcanzadas durante el proceso de decocción, así como de fitoesteroles, ya que estos compuestos hidrofóbicos no son extraídos durante el proceso de decocción.

De manera interesante, el subproducto obtenido durante el proceso de decocción presentó una gran cantidad y variedad de compuestos bioactivos, principalmente compuestos polifenólicos extraíbles como flavanonas, flavonas, flavonoles y ácidos fenólicos. Además, en estos subproductos se identificaron otros compuestos bioactivos como carotenoides y fitoesteroles. Adicionalmente, se encontró un alto contenido de hesperidina y naringina en la fracción no extraíble de los polifenoles, lo que indica que estos compuestos se encuentran unidos a la matriz de los cítricos, principalmente por medio de enlaces éter y/o éster. Por todo lo anterior, se propone que los subproductos obtenidos durante el proceso de decocción de cítricos se utilicen como un ingrediente funcional debido a su alto contenido en compuestos bioactivos extraíbles y no extraíbles.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**Arranz S**, Saura-Calixto F, Shaha S, Kroon P. High contents of nonextractable polyphenols in fruits suggest that polyphenol contents of plant foods have been underestimated. *J Agric Food Chem* **2009**;57:7298-303.

**Ávalos A**, Pérez-Urria C. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca* **2009**;2:119-145.

**Avula B**, Sagi S, Wang Y, Wang M, Gafner S, Gafner S, Manthey J, Khan I. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of limonoids and flavonoids in seeds of grapefruits, other citrus species, and dietary supplements. *Planta Med* **2016**;82:1058-1069.

**Ballistreri G**, Fabroni S, Romeo F, Timpanaro N, Amenta M, Rapisarda P. Anthocyanins and other polyphenols in citrus genus: biosynthesis, chemical profile, and biological activity. En: *Polyphenols in plants: isolation, purification and extraction*. 2a. edición. Londres: Academic press, an imprint of Elsevier, **2019**; 191-215.

**Barreca D**, Bellocco E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G. Distribution of C- and O-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl) glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chem* **2011**;124:576-582.

**Ben Abdelaali S**, Rodrigo M, Saddoud O, Zacarías L, Hajlaoui M, Mars M. Carotenoids and colour diversity of traditional and emerging tunisian orange cultivars (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). *Sci Hort* **2018**;227:296-304.

**Beñatena H**. Clasificación botánica de los citrus cultivados. *Bol Tec* **1972**.

**Bermejo A**, Llosá M, Cano A. Analysis of bioactive compounds in seven citrus cultivars. *Food Sci Technol Int* **2011**;17:55-62.

**Biesalski H**, Dragsted L, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D, *et al.* Bioactive compounds: definition and assessment of activity. *Nutrition* **2009**;25:1202-1205.

**Castro-Vazquez L**, Alañón M, Rodríguez-Robledo V, Pérez-Coello M, Hermosín-Gutierrez I, Díaz-Maroto M, *et al.* Bioactive flavonoids, antioxidant behaviour, and cytoprotective effects of dried grapefruit peels (*Citrus paradisi* Macf.). *Oxid Med Cell Longev* **2016**; 2016.

**Cartaya O**, Reynaldo I. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. Cultivos Tropicales **2001**;22:5-14.

**Cebadera L**, Cámara M, Morales P. Valoración nutricional, compuestos bioactivos y actividad antioxidante de cítricos: clementinas y naranjas pigmentadas. Universidad Complutense Madrid. **2017**.

**Chasquibol N**, Lengua L, Delmás I, Rivera D, Bazán D, Aguirre R, *et al*. Alimentos funcionales o fitoquímicos. Clasificación e importancia. Rev Per Quim Ing Quim **2003**;5:9-20.

**Decloedt A**, Van Landschoot A, Vanhaecke L. Fractional factorial design-based optimisation and application of an extraction and UPLC-MS/MS detection method for the quantification of phytosterols in food, feed and beverages low in phytosterols. Anal Bioanal Chem **2016**;408:7731-7744.

**Del Caro A**, Piga A, Vacca V, Agabbio M. Changes of flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage. Food Chem **2004**;84:99-105.

**Drago M**, López M, Sainz T. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Rev Mex Cienc Farm **2006**;37:58-68.

**Fallico B**, Ballistreri G, Arena E, Brighina S, Rapisarda P. Bioactive compounds in blood oranges (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck): Level and intake. Food chem **2017**;215:67-75.

**Favela-Hernández J**, González-Santiago O, Ramírez-Cabrera M, Esquivel-Ferriño P, Camacho-Corona M. Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. Molecules **2016**;21:247.

**Ferguson** L, Zhu S, Harris P. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cell. *Mol Nutr Food Res* **2005**;49:585- 693.

**Ferreira** S, Silva A, Nunes F. *Citrus reticulata* Blanco peels as a source of antioxidant and anti-proliferative phenolic compounds. *Ind Crop Prod* **2018**;111:141-148.

**Fraga** C, Galleano M, Verstraeten S, Oteiza P. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Asp Med* **2010**;31:435-445.

**García** D. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes* **2004**;27:1-12.

**García-Villalba** R, Espín J, Aaby K, Alasalvar C, Heinonen M, Jacobs G, *et al.* Validated method for the characterization and quantification of extractable and nonextractable ellagitannins after acid hydrolysis in pomegranate fruits, juices, and extracts. *J Agric Food Chem* **2015**;63:6555-6566.

**Gmitter** F, Hu X. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary citrus species (*Rutaceae*). *Econ Bot* **1990**;44:267-277.

**Goh** R, Pua A, Liu S, Lassabliere B, Leong K, Sun J, *et al.* Characterisation of volatile and non-volatile compounds in pomelo by gas chromatography-olfactometry, gas chromatography and liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Essent Oil Res* **2019**;31:1-12.

**Goldenberg** L, Yaniv Y, Porat R, Carmi N. Mandarin fruit quality: a review. *J Sci Food Agric* **2018**;98:18-26.

**Holst** B, Williamson G. Nutrients and phytochemicals: from bioavailability to bioefficacy beyond antioxidants. *Curr Opin Biotechnol* **2008**;19:73-82.

**Jorge N**, Silva A, Aranha C. Antioxidant activity of oils extracted from orange (*Citrus sinensis*) seeds. *Anais Acad Brasil Ci* **2016**;88:951-958.

**Kennedy J**, Jones G. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J Agric Food Chem* **2001**;49:1740-1746.

**Levaj B**, Dragović-Uzelac V, Bursać Kovačević D, Krasnići N. Determination of flavonoids in pulp and peel of mandarin fruits. *Agric Conspec Sci* **2009**;74:221-225.

**Leyva E**, Navarro-Tovar G, Loredó-Carrillo S, Santos M. Biosíntesis y actividad biológica de fitoestrógenos y fitoesteroides. *Bol Soc Quím Méx* **2011**;5:35-43.

**Martín D**. Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *RIAA* **2018**;9:81-104.

**Olives A**, Cámara M, Sánchez M, Fernández V, López M. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and  $\beta$ -carotene in vegetables. *Food Chem* **2006**;95:328-336.

**Oomah B**, Cardador-Martínez A, Loarca-Piña G. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J Sci Food Agric* **2005**;85:935-942.

**Ordoñez-Gómez E**, Reátegui-Díaz D, Villanueva-Tiburcio J. Polifenoles totales y capacidad antioxidante en cáscara y hojas de doce cítricos. *Sci Agr* **2018**;9:113-121.

**Peñarrieta J**, Tejeda L, Mollinedo P, Vila J, Bravo J. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Rev Boliv Quim* **2014**;31:68-81.

**Pérez-Jiménez** J, Saura-Calixto F. Fruit peels as sources of non-extractable polyphenols or macromolecular antioxidants: analysis and nutritional implications. *Food Res Int* **2018**;111:148-152.

**Pérez-Jiménez** J, Arranz S, Taberner M, Díaz-Rubio M, Serrano J, Goñi I. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Res Int* 2008;41:274-285.

**Prado** A, Manion B, Seetharaman K, Deschamps F, Barrera D, Mara J. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch]. *Ind Crop Prod* **2013**;45:64-73.

**Quatrin** A, Pauletto R, Maurer L, Minuzzi N, Nichelle S, Carvalho, J. Characterization and quantification of tannins, flavonols, anthocyanins and matrix-bound polyphenols from jaboticaba fruit peel: A comparison between *Myrciaria trunciflora* and *M. jaboticaba*. *J Food Compos Anal* **2019**;78:59-74.

**Reynoso-Camacho** R, Rodríguez-Villanueva L, Sotelo-González A, Ramos-Gómez M, Pérez-Ramírez I. Citrus decoction by-product represents a rich source of carotenoid, phytoesterol, and extractable and non-extractable polyphenols. *Food Chem In press*.

**Rincón** A, Vásquez A, Padilla F. Chemical composition and bioactive compounds of flour of orange (*Citrus sinensis*), tangerine (*Citrus reticulata*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) peels cultivated in Venezuela. *ALAN* **2005**;55:305-310.

**Saini** R, Keum Y. Microbial platforms to produce commercially vital carotenoids at industrial scale: an updated review of critical issues. *J Ind Microbiol* **2019**;46:657-674.

**Sánchez** A, Cozzi R, Cundari E, Fiore M, Ricordy R, Gensabella G. Extracto de frutos enteros de *Punica granatum* L. como agente protector del daño inducido por el

peróxido de hidrógeno. Rev Cubana Plant Med **2005**;10.

**Sáyago-Ayerdi** S, Mercado-Mercado G, Ramos-Romero S, Lluís-Torres J, Pérez-Jiménez J. Analysis and characterization of polyphenol extracts. En: Advances in technologies for producing food-relevant polyphenols. Boca Raton: CRC Press, Taylor et Francis Group. **2018**;193-220.

**Singleton** V, Orthofer R, Lamuela-Raventos R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol **2009**;299:152-178.

**Solleiro** J, Mejía O. Producción de cítricos e innovación: una oportunidad para México. Tecno Agro **2019**.

**Sung** J, Suh J, Wang Y. Effects of heat treatment of mandarin peel on flavonoid profiles and lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. JFDA **2019**;27:729-735.

**Theile** D, Hohmann N, Kiemel D, Gattuso G, Barreca D, Mikus G, et al. Clementine juice has the potential for drug interactions—in vitro comparison with grapefruit and mandarin juice. Eur J Pharm Sci **2017**;97:247-256.

**Tomás-Barberán** F. Los polifenoles de los alimentos y la salud. Alim Nutri Salud **2003**;10:41-53.

**Wang** Y, Qian J, Cao J, Wang D, Liu C, Yang R, et al. Antioxidant Capacity, Anticancer Ability and Flavonoids Composition of 35 Citrus (*Citrus reticulata* Blanco) Varieties. Molecules **2017**;1114.

**Wu T**, Guan Y, Ye J. Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Food Chem* **2007**;100:1573-1579.

**Wu T**, Phuong N, Van Camp J, Smagghe G, Le T, Raes K. Analysis of non-extractable polyphenols (NEPP). En: *Non-Extractable Polyphenols and Carotenoids*. **2018**; 46-67.

**Yilmaz E**, Guner B, Ok S. Valorization of Grapefruit Seeds: Cold Press Oil Production. *Waste Biomass Valorization* **2019**;10:2713-2724.

**Zurita J**, Díaz-Rubio M, Saura-Calixto F. Improved procedure to determine non-extractable polymeric proanthocyanidins in plant foods. *Int J Food Sci Nutr* **2012**;63:936-939.